HANDBUCH
DER
TECHNIK UND METHODIK
DER
IMMUNITÄTSFORSCHUNG.

Unter Mitwirkung von

Dr. A. Boehme, Marburg a. L.; Prof. Dr. Calmette, Lille; Prof. Dr. Casper, Breslau; Dr. J. Citron, Berlin; Reg.-Arzt Dr. R. Doerr, Wien; Geh. Obermedizinalrat Professor Dr. P. Ehrlich, Frankfurt a. M.; Dr. M. v. Eisler, Wien; Professor Dr. E. Friedberger, Königsberg i. Pr.; Prof. Dr. R. Graßberger, Wien; Prof. Dr. M. Jacoby, Berlin; Prof. Dr. E. Joest, Dresden; Privatdozent Dr. W. Knoepfelmacher, Wien; Prof. Dr. W. Kolle, Bern; Prof. Dr. R. Kraus, Wien; Dr. B. Kreissl, Wien; Prof. Dr. R. Kretz, Prag; Dr. Krumbein, Bern; Dr. Inmann, London; Dr. C. Levaditi, Paris; Dr. J. Leuchs, Berlin; Dr. E. Loewenstein, Beelitz b. Berlin; Dr. Th. Madsen, Kopenhagen; Prof. E. Metschnikoff, Paris; Prof. Dr. M. Neißer, Frankfurt a. M.; Prof. Dr. R. Paltauf, Wien; Dr. W. Paul, Wien; Privatdozent Dr. E. P. Pick, Wien; Dr. Cl. v. Pirquet, Wien; Dr. O. Porges, Wien; Dr. C. Prausnitz, London; Dr. E. Přibram, Wien; Dr. Raebiger, Halle a. S.; Prof. Dr. Roemer, Marburg a. L.; Reg.-Arzt Dr. V. K. Ruß, Wien; Prof. Dr. H. Sachs, Frankfurt a. M.; Prof. Dr. A. Schattenfroh, Wien; Dr. Cl. Schilling, Berlin; Dr. J. Schwoner, Wien; Prof. Dr. Sobernheim, Berlin; Dr. R. v. Stenitzer, Wien; Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Uhlenhuth, Berlin; Dr. R. Volk, Wien; Geh. Medizinalrat Dr. A. Wassermann, Berlin; Dr. Weidanz, Berlin; Dr. A. Wladimiroff, Petersburg

herausgegeben von

PROF. DR. R. KRAUS in Wien UND DR. C. LEVADITI in Paris.

Erster Band.

ANTIGENE.

Mit 1 lithograph. Tafel, 2 farbigen Tafeln, 1 Kurve und 126 teils farbigen Abbildungen im Text.

SEMPER BONIS ARTIBUS

VERLAG VON GUSTAV FISCHER IN JENA.
1908.

Inhaltsverzeichnis.

Vorwort.

Von

Professor R. Paltauf.

In den 25 Jahren, die seit der ersten, experimentell durch Metschnikoff begründeten Lehre von der Ursache und dem Mechanismus der Immunität vergangen sind, hat die Immunitätsforschung ganz außerordentliche Fortschritte gemacht; man kann mit Recht sagen, daß die von ihr verfolgten Probleme, die aus ihr entwickelten Hypothesen auf das Gesamtgebiet der Medizin sich erstrecken. Das war nicht immer so der Fall; zunächst besaß die Forschung mehr theoretisches Interesse; selbst dort, wo sie sich auf praktischem Gebiete betätigte, war sie empirischen Pfaden gefolgt. Die Pasteurschen Schutzimpfungen bewegten sich vollständig im Rahmen der Jennerschen Kuhpockenimpfung, konnten ebenfalls nur prophylaktisch angewendet werden, woran selbst die postinfektionell geübte Schutzimpfung gegen Wut nichts änderte, so sehr sie seinerzeit das allgemeinste Interesse erregte. Selbst im Anfang der 90er Jahre waren Lehre und Vorstellung von Krankheitserregung und -Heilung noch auf einen so kleinen Kreis von Forschern beschränkt geblieben, daß Kochs prinzipiell höchst bedeutsame Entdeckung der Giftgewöhnung als therapeutisches Agens zur Heilung geradezu nicht erfaßt wurde; den Ärzten schwebte das Tuberkulin als ein Heilmittel etwa nach Art des Chinin vor, das man, sobald die Diagnose fest stand, auch zu verordnen und anzuwenden habe; daran scheiterte die praktische Verwertung damals.

Enorm wuchs die Bedeutung der Immunitätsforschung an, als mit der Einführung der durch v. Behring und Roux begründeten Serotherapie wichtige Interessen der praktischen Medizin sich verbanden und die ideale Bestrebung der Medizin als Heilkunst, die ätiologische Therapie, der Erfüllung zugeführt schien. Geradezu lawinenartig schwoll die Zahl der Publikationen neuer experimenteller Tatsachen an, als Ehrlichs berühmte Hypothese ein ausgedehntes Feld für korrekte Fragestellung und experimentelle Arbeit schuf, Pfeiffers Antikörper und Grubers und Durhams Entdeckung den Kliniker wie den Bakteriologen zu gemeinsamer Arbeit im Laboratorium vereinte.

Mit der Kenntnis der Präzipitine und Cytotoxine wuchs der von der Immunitätsforschung inaugurierte Zweig der Biologie weit über den anfänglichen Rahmen hinaus; wir erfuhren hiemit Kenntnis von Vorgängen physiologischer Natur, welchen die uns früher bekannten auf dem patho-

logischen Gebiete der Infektionskrankheiten von Mensch und Tier als eine Art Spezialerscheinung sich unterordnen. Es dürfte keinem Zweifel unterliegen, daß es der antigenen Körper eine große Zahl gibt, daß auch im physiologischen Leben der Entstehung und Entwicklung der durch sie angeregten korrelativen Substanzen eine Bedeutung zukommt; wissen wir doch, daß dem jungen, kindlichen Organismus solche fehlen, die des Erwachsenen regelmäßigen Bestand ausmachen; ob dieselben stete Eigenschaften der Art und Spezies ausmachen oder ob sie auch Einfluß auf die Eigentümlichkeit der Konstitution und der Individualität nehmen, ist noch zu wenig erforscht; auf dem Gebiete der Infektionskrankheiten dürften wir wohl in ihrer Entwicklung, Menge und Regeneration das Rätsel für den höchst wechselhaften Verlauf zu suchen haben.

Es ist überflüssig, die spezielle Nutzanwendung aufzuzählen, welche die verschiedensten Gebiete der Medizin aus der Immunitätsforschung gezogen haben, doch sei zur Vervollständigung des Umfanges noch an die Präzipitine erinnert, deren Heranziehung außer zur Lösung praktischer Fragen in der gerichtlichen Medizin, in der Physiologie der Ernährung usw. auch auf dem Gebiete der Biochemie, speziell der Chemie der Eiweißkörper, zu bemerkenswerten Resultaten geführt hat (Obermayer und Pick).

Es ist aber nicht nur die ausgedehnte Berührung der Gebiete, die vielfache Verwendbarkeit für spezielle Fragen und Probleme, welche die Ergebnisse der Immunitätsforschung in alle Zweige der Medizin einbürgerte, sondern auch die Methodik: Maß und Gewicht, in denen wir Zusammensetzung und Aufbau der anorganischen und der organischen Materie kennen, beherrschen auch die Beziehungen zwischen den Antigenen und ihren reaktiven Körpern; und wo sich Abweichungen finden, sind dieselben durch die uns bisher unbekannten, wahrscheinlich celloidale Natur der reagierenden Körper bedingt. Dadurch erhalten die Beziehungen der Antigene zu ihren Reaktionsprodukten die Feinheit und Exaktheit chemischer Reaktionen, ja übertreffen in der Empfindlichkeit dieselben: denn die Substanzen zeigen noch spezifische Reaktionen in solchen Verdünnungen, in denen die bekannten chemischen Methoden zum allgemeinen Nachweis derselben, z. B. Eiweißreaktionen, längst versagen würden; minimale Mengen eines Antigens, einige Hunderstel Kubikzentimeter Serum lösen das Entstehen eines Präcipitins aus, das auf eine vieltausendfache verdünnte Eiweißlösung typisch reagiert. Die quantitativen Verhältnisse sind häufig genug nicht nur ausschlaggebend für die Feststellung spezifischer Reaktionserscheinungen wie z. B. bei der Pfeifferschen oder Gruberschen Reaktion, sondern der Nachweis von Antikörpern überhaupt hängt nicht so selten von der Dosierung des Antigens ab: zu große Giftdosen, zu massives Infektionsmaterial können das Vorhandensein von Schutzstoffen völlig verdecken.

Allerdings haben wir es nie mit bekannten Stoffen zu tun, im Gegenteil, ihre Zusammensetzung ist uns gänzlich unbekannt; gegenüber den Reaktionen mit reinen chemischen Körpern scheint da nun ein großer Unterschied zu bestehen, auch bezüglich der Methodik, welche dementsprechend nicht als gleichwertig mit den analytischen Methoden betrachtet wird, daher auch ihre Erfolge nicht allgemein derselben Anerkennung sich erfreuen. Mit Unrecht! Diese physiologischen und biologischen Reaktionen haben uns eine solche Fülle von Tatsachen kennen gelehrt, die wir überhaupt mit anderen Methoden nicht erfahren hätten, die typisch und konstant, oft in der sinnfälligsten Form, im Tierkörper, wie in der Eprouvette ab

laufen, so daß darin allein bereits der Wert dieser Technik und Methodik begründet ist; es sei aber auch erinnert, daß dieselbe auch Bestätigungen und sozusagen greifbare Beweise für auf anderem Wege, z. B. in der Zoologie und Entwicklungsgeschichte eruierte Anschauungen geliefert hat, wie z. B. die Präzipitinreaktion völlig mit der phylogenetischen Reihe übereinstimmt, in welcher die betreffenden Tiere zu einander stehen (Nucall). Allerdings sind wir vielfach auf das Tierexperiment angewiesen, so daß wir äußerst komplizierte Verhältnisse zu berücksichtigen haben; und auch die Eprouvettenversuche erheischen bei der eigentümlichen komplexen Natur der reagierenden Substanzen vielfache Kautelen: Menge und Konzentration, Art der Lösungsmittel oder der Suspensionsflüssigkeit, Dauer der Einwirkung usw. sind nicht belanglos und bei der wahrscheinlich kolloidalen Natur der reagierenden Substanzen darf es nicht wundern, daß die Reihenfolge, in der man die Körper aufeinander einwirken läßt, von ausschlaggebender Bedeutung sein kann. Um so mannigfaltiger müssen die Kautelen im Tierversuch sein; nicht nur, daß sich Versuche in vitro nicht direkt auf das Tier übertragen lassen, sondern es spielen Ort und Art der Applikation, Menge, Art, Konzentration der Lösung etc., die äußeren Verhältnisse des Versuchstieres und endlich der lebende Organismus an sich eine bedeutende Rolle. Diesen Umständen müssen eben Technik und Methode angepaßt sein und sie sind es; nur dem Fernstehenden kann es den Eindruck machen, daß die physiologischen und biologischen Methoden nicht exakt seien. Wir werden aber dieser Methoden nicht entraten können; denn nicht nur, daß die Reindarstellung der wirksamen Substanzen nicht gelingen will, sondern soweit eine solche versucht ist, so geht dieselbe mit enormen Verlusten an Wirksamkeit einher.

Eine weitere Eigentümlichkeit ist die, daß, wenn auch diese große Gruppe der Antigene und ihrer Antikörper, ihre Reaktionen bestimmten Grundgesetzen folgen, es doch so zahlreiche Verschiedenheiten gibt, daß man nie, selbst nicht bei Körpern derselben Gruppe, z. B. den Toxinen von dem Verhalten des einen Toxines auf ein analoges bei einem andern schließen darf. In zahlreichen Einzelpublikationen finden sich diese Tatsachen zerstreut, denn nur teilweise sind sie in Lehrbücher und zusammenfassende Darstellungen der Immunitätslehre aufgenommen. Im Handbuch von Kolle und Wassermann mußte in den Abschnitten über Krankheitserregung und über Immunität, bei den einzelnen Krankheitserregern sowie in einzelnen zusammenfassenden Kapiteln auch die Technik und Methodik einbezogen werden, konnte aber doch nur in den besonderen Abschnitten der Herstellung und Auswertung von Impf- und Schutzstoffen eine eingehendere Darstellung erfahren; eine Gesamtdarstellung der tierischen oder der pflanzlichen Antigene und ihrer Antikörper fehlt ebenso wie zusammenfassende Übersichten über die chemischen Methoden der Darstellung der Immunisierungsmethoden etc. Alle jene, welche in der Klinik oder im chemischen Laboratorium sich mit einschlägigen Arbeiten beschäftigen wollen, sind nicht selten darauf angewiesen, sich die bisher bekannten Tatsachen und Methoden aus zahlreichen, manchmal schwer zugänglichen Spezialarbeiten zu sammeln.

So machte sich im Laufe der Jahre das Bedürfnis geltend, die Methodik auf dem immer anwachsenden Gebiete der Immunitätsforschung in einem solchen Ausmaße zur Darstellung zu bringen, daß dieselbe sowohl als ein Nachschlagewerk im Laboratorium, als auch zur Anleitung zu eigenen Arbeiten dienen könnte. Besonders wertvoll schien eine der-

artige Zusammenfassung auch für den weiteren Fortschritt in dem Wissenszweige; die Antigene sowohl als ihre reaktiven Substanzen sind an sich oft sehr komplexer Natur auch in der Richtung, daß ein Antigen gleichzeitig mehrere solche enthält, dementsprechend auch die Antikörper wieder mehrfach sind (z. B. die häufige Kombination Bakteriolysin, Agglutinin, Präzipitin oder Antitoxin und Präzipitin); demnach geht es selten an, sich nur mit der Verfolgung eines Phänomens zu beschäftigen, ohne auf die Eventualität anderer und ihrer Kombinationswirkung Rücksicht zu nehmen. Ein Handbuch der Methodik erlaubt die Aussicht, daß die Orientierung und das Studium auch der anderen Erscheinungen als gerade der in Aussicht genommenen, leichter und die Arbeit dadurch fruchtbringender werde.

So haben sich zur Abfassung eines derartigen Handbuches eine größere Anzahl von zum größten Teil auf dem Gebiete bereits bekannter Autoren zusammengetan, die es gestattete, daß sowohl die Übersichten und allgemeinen Kapitel als auch die Einzelabschnitte über die einzelnen Antigene und ihre Antikörper von solchen verfaßt werden, die nicht nur auf dem einschlägigen Gebiete eingehende eigene Erfahrung besitzen, sondern die Immunitätslehre zu ihrem Arbeitsgebiete überhaupt gewählt haben. Die Herausgeber, Prof. R. Kraus (vom k. k. serotherapeutischen Institut in Wien) und Dr. C. Levaditi (Institut Pasteur in Paris), haben in ganz richtigem Verständnis von der Bedeutung eines Zusammenschlusses von Fachmännern aus den verschiedenen Ländern und Instituten, welche an der Entwicklung der jungen Wissenschaft tätigen Anteil genommen haben, einen solchen erreicht; die Altmeister und Begründer der Forschung E. Metschnikoff und P. Ehrlich haben dem Werke wertvolle Beiträge geliefert, und unter den Mitarbeitern finden sich hervorragende Forscher, Angehörige von Instituten für Serumforschung und Serumtherapie, für Infektionskrankheiten oder experimentelle Medizin wie der Institute in Paris, Lille, Frankfurt a. M., Marburg a. L., Kopenhagen, Wien, Berlin, Petersburg, der hygienischen Universitätsinstitute Bern, Halle, Königsberg, Wien, der bakteriologischen Institute an den tierärztlichen Hochschulen Breslau und Dresden und der k. k. Impfstoffgewinnungsanstalt in Wien.

Die Differenzen der Anschauungen über das Wesen des Vorganges bei der Reaktion der Antigene mit ihren Antikörpern, namentlich bei der Neutralisierung von Toxin und Antitoxin, welche vor einigen Jahren in einer zeitweise sogar recht lebhaften Diskussion gestanden sind, hat sich zwar nicht ausgeglichen, ebenso wenig als wie die Grundfragen des Immunitätsproblems — ob celluläre oder extracelluläre Vorgänge das Wesen der Immunität ausmachen — entschieden sind. Jetzt hat der kritische Streit eine Abschwächung erfahren und einer mehr objektiven Betrachtung der experimentell festgelegten Tatsachen Platz gemacht; vielleicht weil keiner der scharf vertretenen Standpunkte sich als der allein richtige erwiesen hat, vielleicht auch weil man erkannt hat, daß die Basis unseres Systems noch nicht heranreicht, um die in Frage kommenden Vorgänge bereits vollständig durchschauen zu können und daß die Lösung des Problems erst möglich sein wird, wenn wir mehr Kenntnisse über die fast an vitale Vorgänge heranreichenden Reaktionen der Fermente und der kolloidalen Substanzen gesammelt haben werden. Diese Etappe ist zweifellos für die Abfassung des Handbuches günstig, denn sie sicherte eine mehr oder weniger abgeklärte Darstellung der strittigen Fragen.

Die Einteilung des Handbuches ist durch den Gegenstand bereits gegeben; dasselbe zerfällt in zwei Bände, von denen der erste die Antigene, der zweite Band die Antikörper behandelt; allgemeine Übersichten über die Darstellung und Gewinnung der bakteriellen Antigene und der Toxine gehen den Einzeldarstellungen voraus, welche mit einer Zusammenstellung der chemischen und physikalischen Methoden zur Darstellung der Antigene schließen.

Jene bakteriellen Antigene, welche als Impfstoffe praktische Verwendung besitzen, werden mit Rücksicht darauf noch besonders behandelt, so daß der 2. Teil des I. Bandes die Technik und Methodik der Schutzimpfungen (aktive Immunisierung) enthält; ebenso finden die zu diagnostischen Zwecken verwendeten Antigene (Tuberkulin, Mallein) auch von der Seite aus noch eine besondere Beschreibung.

Der 1. Teil des II. Bandes enthält die Antitoxine; ein allgemeiner Teil, welcher die Methoden der Immunisierung, der Auswertung der Antikörper und die chemischen Methoden zur Darstellung derselben enthält, eröffnet den Band. Die 2. Abteilung wird die anderen Antikörper enthalten. Zur Vervollständigung ist auch ein Abschnitt „Über Lipoide und Kolloide“, jene Substrate, in welchen die Antigene sowohl erscheinen, als denen auch die Antikörper angehören, zur möglichsten allgemeinen Orientierung vorgesehen.

Mögen die für die Wissenschaften begeisterten Herausgeber und Mitarbeiter in einer freundlichen Aufnahme und ausgedehnten Verbreitung des Handbuches eine Entlohnung für ihre Bemühungen finden!

Einleitung.

Über Antigene und Antikörper.

Von
Paul Ehrlich
in Frankfurt a. Main.

Die Stoffe, mit denen die Immunitätsforschung arbeitet, Antigene und Antikörper, sind übereinstimmend negativ charakterisiert durch den Umstand, daß sie chemisch völlig unbekannte Gebilde darstellen. Mag darin ein prinzipielles Kriterium gelegen sein, das die Antigene und Antikörper von dem großen Reich der chemisch definierten Substanzen trennt, oder mag dieses Unterscheidungsmerkmal nur ein Ausdruck unserer vorläufigen Unfähigkeit, chemisch weiter vorzudringen, sein, Tatsache ist, daß es bisher trotz zahlreicher Bemühungen nicht gelungen ist, durch Vorbehandlung von Tieren mit Giften bekannter chemischer Konstitution Antikörper zu erzeugen oder andererseits die Antigene chemisch zu analysieren. Die Erzeugung von Antikörpern ist ja in der Tat der einzige sichere Maßstab, den wir kennen, um Substanzen in die Klasse der Antigene einzureihen. Ein wesentlicher Faktor, der zudem der chemischen Darstellung der Antigene im Wege steht, ist ihre hohe Labilität, die sich schon bei geringfügigen Einflüssen physikalischer und chemischer Art dokumentiert. Wenn somit die experimentelle Immunitätsforschung der chemischen Methodik im allgemeinen entbehrt, so kann man andererseits mit um so größerer Bewunderung den hohen Stand der Erkenntnis anerkennen, auf dem sich dieses Forschungsgebiet befindet. Versagten die Hilfsmittel des Chemikers, so haben sich Beobachtung und biologische Experimentierkunst mit um so größerem Eifer und Erfolg vereint, um in ein dunkles Gebiet Licht und Aufklärung zu bringen.

Die wichtigste Eigenschaft jedes Antigenes ist diejenige, durch den entsprechenden Antikörper gebunden zu werden, Zu jedem Antigen gehört ein Antikörper, zu jedem Antikörper ein Antigen. Woran erkennt man aber, daß eine Bindung zwischen Antigen und Antikörper eingetreten, mit anderen Worten, daß überhaupt ein Antikörper vorhanden ist? Der einfachste Fall ist naturgemäß dann gegeben, wenn dem Antigen irgend welche sinnfällige funktionelle Wirkung zukommt. Man ist dann in der Lage, aus der Neutralisation dieser Wirkung durch das fragliche Serum auf das Vorhandensein eines Antikörpers in letzterem zu schliessen. Es ist daher kein Zufall, daß die fundamentale Entdekkung der Antikörper durch von Behring die Antitoxine betrifft.

Die Toxine sind ja Antigene, welche durch die von ihnen ausgeübten Giftwirkungen charakterisiert sind. Man hat ihnen neben der Fähigkeit der Antitoxinbildung noch zwei Fundamentaleigenschaften vindiziert, die Giftwirkung nach Verlauf einer Inkubationszeit und die hohe Labilität. Jedoch kann letztere nicht mehr als ein durchgreifendes Charakteristikum angesehen werden, seitdem es Kyes gelungen ist, in Form der Lecithide des Schlangengifts sehr stabile Toxine darzustellen, die sich noch dazu von den übrigen bekannten Toxinen durch die Löslichkeit in fettlösenden Solventien unterscheiden. Auch die Inkubationszeit ist durchaus nicht immer vorhanden, wie das Studium gewisser hämolytischer Gifte, insbesondere der Lecithide, sowie der akut wirkenden Vibrionentoxine (R. Kraus), des Rauschbrandgiftes (Eisenberg) etc. gezeigt hat. Als allein wesentliches Kriterium für die Toxinnatur eines Giftes bleibt der antigene Charakter, d. h. die Antitoxin auslösende Fähigkeit.

Solange uns eine struktur-chemische Kenntnis der Toxine fehlt, sind wir für die Toxinanalyse auf biologische Reaktionen angewiesen. Die eine Eigenschaft der Toxine, ihre Giftigkeit, ist ja dem biologischen Experiment ohne weiteres zugänglich. Es ist nur notwendig, die Säfte oder Sekrete pflanzlichen oder tierischen Ursprungs auf Giftwirkungen zu prüfen, sei es, daß man sich als Indikators des lebenden Tierkörpers oder der isolierten Zelle bedient. Bei vielen Toxinen (Nervengiften etc.) ist ja das Experiment in vitro von vornherein ausgeschlossen. Wenn es aber möglich ist, die toxische Wirkung auch im Reagensglas zur Erscheinung zu bringen, so bietet dieses Vorgehen so mannigfache Vorteile, daß es kein Wunder ist, daß der Reagensglasversuch heute einen mächtigen Pfeiler für den Aufbau der Immunitätslehre bildet. Daß es am zweckmäßigsten ist, solche Zellen zum Studium der Toxine zu wählen, welche die eingetretene Schädigung oder das Aufhören der Lebenserscheinungen durch sinnfällige Kriterien erkennen lassen, liegt auf der Hand, und so ist es gekommen, daß die roten Blutkörperchen unter den Testobjekten der Immunitätsforscher einen so hervorragenden Platz einnehmen.

Die quantitative Bestimmung der Giftigkeit, also des Toxins, ist eine Art Titrierung. Der Unterschied ist nur dadurch bedingt, daß die zu beobachtende Reaktion nicht, wie bei der chemischen Titration sofort, sondern allmählich nach Verlauf eines mehr oder weniger langen Inkubationsstadiums eintritt. Daraus ergiebt sich die Notwendigkeit, verschiedene Mengen der Toxinlösung in Einzelversuchen zu prüfen und die Reihe so lange fortzusetzen, bis man zu der minimalen Toxinmenge gelangt ist, welche den gesuchten Effekt (Tod der Versuchstiere, Hämolyse etc.) gerade noch vollständig bewirkt. Eine solche Methodik bringt es natürlich mit sich, daß die Versuche recht langwierig werden und auch oft, besonders bei Tierversuchen große Ansprüche finanzieller Art stellen.

In analoger Weise muß verfahren werden, wenn es sich darum handelt, die Toxine durch ihre zweite bekannte Eigenschaft, die Fähigkeit der Antitoxinbindung zu bestimmen. Man wird dann danach trachten müssen, zu einer bestimmten Antitoxinmenge eben so viel Toxin zuzusetzen, daß jede Giftwirkung gerade neutralisiert ist. Umgekehrt ist bei der Bestimmung des Antitoxins, von dem wir als einzige Eigenschaft nur die neutralisierende Wirkung kennen, die kleinste Antitoxinmenge festzustellen, welche eine gegebene Menge des Toxins gerade neutralisiert. Die Grundlagen dieser Forschungsmethoden bildet natürlich die An-

schauung, daß sich Toxin und Antitoxin, wie Antigen und Antikörper überhaupt direkt mit einander zu einem inerten Reaktionsprodukt verbinden. Diese Anschauung, welche von mir von Anfang an vertreten worden ist, ist zwar zuerst zahlreichen Anfeindungen begegnet, hat sich aber heute, besonders durch die mannigfachen Erfahrungen des Experimentes in vitro so sehr als die richtige bewährt, daß sie als eine gesicherte Basis gelten kann. Und ich darf dem noch hinzufügen, daß Vorstellungen, nach denen es sich um eine Zerstörung des Toxins durch das Antitoxin handeln sollte, die Spitze abgebrochen ist, zumal seitdem sich gezeigt hat, daß bei den Reaktionen zwischen Antigen und Antikörper häufig schon durch einfache Mittel eine gewisse Reversibilität zu demonstrieren ist, daß es sogar bei dem stabileren Schlangengift nach den interessanten Versuchen Morgenroths gelingt, durch besondere Maßnahmen die beiden Komponenten aus der neutralen Toxin-Antitoxin-Verbindung zu restituieren.

Von größter Bedeutung für das weitere methodische Vordringen war nun die Erkenntnis der Tatsache, daß die beiden Funktionen, welche wir bei den Toxinen kennen, die Giftigkeit und die Fähigkeit der Antitoxinbindung sich durchaus nicht entsprechen. Ich habe zuerst gezeigt — und dabei kam mir insbesondere die fortgesetzte Untersuchung eines und desselben Toxins zu statten —, daß Giftigkeit und Antitoxinbindungsvermögen durchaus nicht parallel verlaufen, daß hingegen die Toxizität eine äußerst variable Größe ist, die schon beim Lagern der Gifte eine fortgesetzte Abnahme aufweist. Wenn man nun diese von einander vollkommen unabhängigen Eigenschaften der Toxine in verschiedenen Atomgruppierungen des Giftmoleküls lokalisiert, so ergibt sich ohne weiteres die Anschauung, welche ich über die Konstitution der Toxine hege. Ich nehme im Toxinmolekül eine haptophore und eine toxophore Gruppe an. Während die erstere, ausgezeichnet durch eine höhere Stabilität, eine Verwandtschaft zu einer entsprechenden haptophoren Gruppe des Antitoxins besitzt, ist die stabile toxophore Gruppe die Trägerin der toxischen Wirkung. Ihr Verlust führt zu den von mir Toxoide benannten Modifikationen, welche nur noch das Bindungsvermögen, ohne giftig zu sein, besitzen. Daraus ergibt sich für die Methodik die wichtige Konsequenz, daß man durch die Toxizitätsbestimmung nur die in der Giftlösung enthaltenen intakten Toxinmoleküle ermitteln kann, die Toxoide entgehen bei diesem Verfahren dem Nachweis, und man erfährt nur die Anzahl der toxophoren Gruppen. Wird dagegen beabsichtigt, die Gesamtheit der vorhandenen haptophoren Gruppen, also die Summe der Toxine und Toxoide festzustellen, so muß man das Antitoxinbindungvermögen quantitativ bestimmen. Von größter Tragweite für die Praxis gestaltet sich diese Forderung aber, wenn es sich darum handelt, den Antitoxingehalt eines Serums zu ermitteln, wie es bei der Wertbestimmung der Heilsera zu geschehen hat. Wollte man prüfen, wie viel Antitoxin notwendig ist, um eine bestimmte Anzahl von tödlichen Toxindosen zu neutralisieren, so würde man, je nachdem die Toxinlösung reich oder arm an Toxoiden ist, zu weit niedrigeren oder höheren Antitoxinwerten gelangen, als es der Wirklichkeit entspricht. Tatsächlich ist in früheren Jahren in dieser irrigen Weise verfahren worden, bis durch meine Untersuchungen eine rationelle Basis für die Serumprüfung geschaffen war.

Da nun zur Wertbestimmung des antitoxischen Serums nur die haptophoren Gruppen als Reagens dienen dürfen, deren Neutralisation aber nur an dem Ausbleiben der von der toxophoren Gruppe ausgeübten

Wirkung zu erkennen ist, so mußte allerdings in letzter Instanz die Funktion der toxophoren Gruppe als Indikator dienen. Aber die zu verwendende Giftmenge konnte nicht mehr nach tödlichen Dosen, sondern nach haptophoren Gruppen determiniert werden. Dazu bedarf es eines Maßstabs für das Antitoxin, der natürlich nur willkürlich angenommen werden konnte. Dieser Maßstab ist die Immunitätseinheit. Unter Immunitätseinheit wird diejenige Menge Antitoxin verstanden, welche imstande ist, eine größere Anzahl von tödlichen Dosen eines gerade zur Verfügung stehenden Giftes zu neutralisieren. So bedeutet beim Diphtherieheilserum die heute fast allgemein angenommene Immunitätseinheit diejenige Antitoxinmenge, die bei meinen ersten Diphtherie-Studien imstande war, 100 für Meerschweinchen tödliche Dosen des damals von mir benutzten Diphtheriegiftes völlig zu neutralisieren. Mit Hilfe dieser einmal gewählten Standardmenge gelingt es, alle anderen Sera zu bestimmen. Es ist nur notwendig, den neutralisierenden Effekt des Standardserums und des zu prüfenden Serums gegenüber einer beliebigen Giftlösung zu vergleichen. Voraussetzung ist natürlich, daß das Standardserum konserviert und zu geeigneter Zeit durch ein neues ersetzt wird. Die Konservierung des Standardantitoxins hat sich nach den von mir angegebenen Maßnahmen (Ausschluß von Licht, Wärme, Sauerstoff und Wasser) in Vakuumapparaten aufs Beste bewährt, so daß heute die Wertbestimmung der Heilsera zu den genauesten Methoden gehört, mit denen die Immunitätslehre arbeitet. Es ist ein Maßsystem, bei dem es sich um eine quantitative Messung relativer Werte handelt, und dem, ähnlich wie den Maßsystemen der exakten Naturwissenschaften, eine unveränderliche willkürlich gewählte Größe als Einheit zugrunde liegt.

Für die weitere Analyse der sich zwischen Toxin und Antitoxin abspielenden Reaktionen steht im Vordergrund die von mir eingeführte Methode der partiellen Absättigung des Toxins durch das Antitoxin. Das Verfahren besteht darin, daß zu einer bestimmten Toxinmenge steigende Mengen des Antitoxins zugesetzt werden und die Toxizität dieser Gemische bestimmt wird. Mit Vorteil bedient man sich zur Registrierung der Versuchsresultate der graphischen Darstellung. Man trägt auf der Abszissenaxe die Mengen des zugefügten Antitoxins ein und kann dann auf der Ordinatenaxe die jeweilige Giftigkeit notieren, ein Verfahren, das von Arrhenius und Madsen geübt wird. Ich selbst gebe einer anderen Darstellungsweise den Vorzug, dem sogenannten „Giftspektrum". Der Unterschied besteht nur darin, daß als Ordinate nicht die noch vorhandene Giftigkeit, sondern die fehlende, bereits neutralisierte Toxinmenge fungiert. Mathematisch ausgedrückt, ist das Giftspektrum die graphische Wiedergabe der Differentialquotienten von der nach dem zuerst erwähnten Verfahren erhaltenen Absättigungskurve. Trotz dieser prinzipiellen Gleichartigkeit gebe ich dem Giftspektrum deshalb den Vorzug, weil es Abweichungen von einem regulär kurvenmäßigen Verlauf markanter in Erscheinung treten läßt. Man ist dann von irrigen Analogieschlüssen, zu denen die Absättigungskurven in gewissen Teilen ihres Verlaufs leicht führen können, besser geschützt. Ich erinnere in dieser Beziehung nur an die von Arrhenius und Madsen auf Grund solcher äußerlicher Ähnlichkeiten gezogenen Konsequenzen, nach denen die in den Giftlösungen enthaltenen wirksamen Stoffe einheitlicher Natur sind und nach dem einfachen Schema der reversiblen Reaktionen mit dem Antitoxin, wie Borsäure und Ammoniak, reagieren sollen. Wenn ein solcher Schluß schon bei einer völligen Analogie der Absättigungskurven nicht

gerechtfertigt erscheinen würde, so stimmen die auf Grund des Massenwirkungsgesetzes zu berechnenden Formeln doch in der Regel nur in einem Teil des Reaktionsverlaufs mit den beobachteten Werten überein. Und daß die Differenzen zwischen Beobachtung und Berechnung nicht etwa auf die Grenzen der Methodik und auf Versuchsfehler ohne weiteres zurückgeführt werden können, zeigen insbesondere die sogenannten Prototoxoidzonen, welche darauf beruhen, daß gewisse Antitoxinmengen Bestandteile der Giftbouillon binden, ohne die Giftigkeit der letzteren herabzusetzen. Besonders eklatant werden diese Verhältnisse, wenn man sich des von mir angewandten genetischen Verfahrens bedient. Untersucht man nämlich ein und dieselbe Giftbouillon in verschiedenen Stadien des Lagerns, so kann man, wie ich es für das Diphtheriegift beschrieben habe, mittelst der Methode der partiellen Absättigung typische Änderungen des Reaktionsverlaufs nachweisen, die mit Evidenz darauf hinweisen, daß nicht eine gleichartige Toxoiddurchsetzung der Giftlösung beim Lagern eintritt, sondern daß sich in ihrer Avidität verschiedenartige Giftmodifikationen bilden, welche auf bereits in der nativen Giftlösung vorhandene Aviditätsdifferenzen der Giftkomponenten hinweisen.

Ich bin weit entfernt, das Vorhandensein einer gewissen Reversibilität bei den sich zwischen Antigenen und Antikörpern abspielenden Reaktionen in Abrede zu stellen oder die Mitwirkung des Massenwirkungsgesetzes, das ja als solches ein allgemeines Naturgesetz darstellt, zu leugnen. Ich bestreite nur, daß die Reaktionen vollkommen reversible sind, und glaube aus mannigfachen Erfahrungen schließen zu dürfen, daß das Charakteristikum der Neutralisationserscheinungen und der von Antigenen und Antikörpern ausgeübten Wirkungen in vivo in einer sekundären Verfestigung besteht. Dieses Prinzip der sekundären Verfestigung stellt nicht etwa eine nachträglich angenommene Hilfshypothese dar, sondern ergibt sich bereits mit aller Evidenz aus den im Jahre 1898 angestellten Untersuchungen von Dönitz.

Die mathematische Behandlungsweise aber erscheint mir, solange wir von einer Isolierung der reagierenden Stoffe noch so weit entfernt sind, nicht angängig zu sein. Bin ich ja doch der erste gewesen, der das quantitative, zahlenmäßige Prinzip auf Fragen der Immunitätsforschung in Anwendung gebracht hat. Aber so wertvolle Dienste die Zahl auch leisten kann, so sind ihrer Bedeutung in den biologischen Wissenschaften doch ziemlich enge Grenzen gesetzt. Wenn zudem aus äußerlichen Analogieen und unter zu Grundelegen der durch nichts bewiesenen Hypothese, daß es sich um vollkommen reversible Reaktionen zwischen einheitlichen Substanzen handelt, mathematische Formeln für den Reaktionsverlauf konstruiert werden, so glaube ich vor den aus solchem Vorgehen gezogenen Schlüssen ernstlich warnen zu müssen. Die Frage, ob die Reaktionen zwischen Antigen und Antikörper als einfache reversible Reaktionen, wie diejenigen der Chemie angesehen werden dürfen, ist übrigens bis zu einem gewissen Grade der experimentellen Prüfung zugängig. Wir besitzen in dem sogenannten Danysz-Dungernschen Kriterium ein Verfahren, das wenigstens beim positiven Ausfalle erlaubt, so einfache Verhältnisse auszuschließen. Das Phänomen besteht darin, daß Toxin-Antitoxingemische giftiger werden, wenn man das Toxin zu der gleichen Antitoxinmenge in zeitlich getrennten Fraktionen zufügt. Bei einfachen, den reversiblen Reaktionen analogen Verhältnissen dürfte die Fraktionierung keinen Einfluß auf den endgiltigen Gleichgewichtszustand haben. Diese Methode wird also als wichtiges Hilfsmittel für

Untersuchungen über den Charakter der Reaktionen herangezogen werden müssen. Bisher haben alle daraufhin untersuchten Toxine das DANYSZ-DUNGERNsche Phänomen ergeben, mit Ausnahme des Cobrahämolysins, das aber auch bei der partiellen Absättigung einen regelmäßigen Verlauf zeigt. Beim Cobragift ist man daher berechtigt, einen einheitlichen hämolytisch wirkenden Bestandteil anzunehmen, während bei den meisten anderen Toxinen die Erfahrungen meines Erachtens auf eine Vielheit von antitoxinbindenden Stoffen hinweisen, denen man bei dem methodischen Vorgehen und der Deutung der Versuchsergebnisse Rechnung tragen muß.

Wenn auch die von ARRHENIUS und MADSEN vertretenen Anschauungen insofern von den meinigen differieren, als sie einen anderen Reaktionsverlauf und eine einfachere Konstitution der Giftlösungen gelten lassen wollen, so zeigen sie doch darin eine erfreuliche Übereinstimmung, daß sie rein chemische Beziehungen zwischen Antigenen und Antikörpern annehmen. In dieser Beziehung möchte ich hervorheben, daß ich in der Tat nicht glaube, daß man zur Erklärung der Reaktionen mit einigen Analogieen, welche mit den Einwirkungen kolloidaler Stoffe auf einander bestehen, auskommen kann. Besonders dürfte die Spezifität der Erscheinungen, die sich einerseits auf die Auslösung der Antikörper, andererseits auf die Antikörperbindung erstreckt, auf Grund der der Kolloidchemie entlehnten Anschauungsweise dem Verständnis erhebliche Schwierigkeiten bereiten. Es liegt daher keine Veranlassung vor, die von mir vertretenen Anschauungen, welche der so gut fundierten Strukturchemie entlehnt sind, zu verlassen. Meine Auffassungen, die in ihrer Gesamtheit als „Seitenkettentheorie" bekannt sind, haben es nicht nur ermöglicht, die mannigfachen Erscheinungen des Immunitätsgebietes von einheitlichen Gesichtspunkten aus zu ordnen, sondern haben sich auch als heuristisches Prinzip für den Fortschritt der Wissenschaft von großem Wert erwiesen. Meine Anschauungen fußen auf der Erkenntnis, daß für jede pharmakodynamische oder toxische Wirkung neben der Konstitution des wirksamen Stoffes dem Verteilungsfaktor eine maßgebende Rolle zugeschrieben werden muß. Die distributiven Momente aber werden, soweit die antigenartigen Stoffe in betracht kommen, wesentlich durch chemische Energie geregelt. Alle Antigene sind durch bestimmte chemische Atomgruppierungen im Molekül charakterisiert, haptophore Gruppen, welche nur mit genau angepaßten korrespondierenden Gruppen reagieren können. Ich nenne die letzteren Gruppen Rezeptoren. Wo geeignete Rezeptoren fehlen, bleibt die Wirkung aus.

Die Methode des Rezeptorennachweises ist der Bindungsversuch. Wenn gewisse Tierspezies oder Zellen der Wirkung bestimmter Toxine gegenüber sich refraktär verhalten, so ist damit noch nicht der Schluß gerechtfertigt, daß diesen Zellen oder Organen giftbindende Rezeptoren fehlen. Besonders im Tierkörper können eine Reihe verschiedener Faktoren zusammenkommen und den Immunitätszustand bedingen. Aber auch im Reagensglasversuch kann die Zellimmunität trotz Bindung des Giftes durch mangelnde Wirksamkeit der toxophoren Gruppe herbeigeführt werden. Für Rezeptorenstudien kann daher nur die fehlende Absorption des wirksamen Prinzips durch die unempfindlichen Zellelemente als Kriterium gelten. Die vergleichende Bestimmung der Wirksamkeit der Giftlösung vor und nach der Absorption muß selbstverständlich an einer empfindlichen Zellart erfolgen. Zur Kontrolle ist eine solche Tier- oder Zellart heranzuziehen, welche der toxischen Wirkung unterliegt. Im Tierversuch kann man die Bindungsfähigkeit bis zu einem

gewissen Grade an der Schnelligkeit des Verschwindens des toxischen Prinzips aus der Blutbahn messen, oder man untersucht die neutralisierende Wirkung der einzelnen Organe. Im Reagensglasversuch, bei dem es sich meistens um hämolytische Gifte handelt, ist freilich eine Schwierigkeit dadurch gegeben, daß bei den empfindlichen Blutarten mit dem Vorgang der Hämolyse gleichzeitig die Produkte der Wirkung in Lösung geraten und eine etwaige hemmende Funktion derselben nicht ohne weiteres auszuschliessen sein dürfte. Außerdem ist ja von vornherein zu erwarten, daß mit der Giftwirkung auch ein Giftverbrauch vergesellschaftet ist. Man kann sich dann auf zweierlei Art helfen. Die Blutzellen binden nämlich die Toxine auch dann, wenn sie den Blutfarbstoff verloren haben und ihr Protoplasma, das Stroma, durch physikalische oder chemische Einflüsse stabilisiert ist. Man kann also, wenn man die Rezeptoren untersuchen will, statt der Blutzellen die aus ihnen gewonnenen Stromata benützen. Dann kann man aber auch die Wirkung der toxophoren Gruppe ausschalten, sei es, daß man sich der Toxoid-Modifikationen bedient, oder die Wirkung bei Intaktsein der toxophoren Gruppe eliminiert. Die Verwendung der Toxoide ist indes in vielen Fällen dadurch nicht möglich, daß meist diejenigen Faktoren, welche einen deletären Einfluß auf die toxophore Gruppe ausüben, gleichzeitig auch einen mehr oder minder großen Verlust der Avidität der haptophoren Gruppe bedingen. Besser ist es daher, die Wirksamkeit der toxophoren Gruppe durch Einflüsse aufzuheben, welche nach Wiederherstellung der normalen Verhältnisse keine dauernde Hemmung bedingen. An erster Stelle steht hier die Einwirkung niedriger Temperatur, da sich gezeigt hat, daß die Mehrzahl der Toxine bei 0° nicht wirken, aber durch die auch in der Kälte bestehende Reaktionsfähigkeit der haptophoren Gruppe gebunden werden.

Noch einfacher liegen die Versuchsbedingungen freilich dann, wenn haptophore und toxophore Gruppe gleichsam von einander abgetrennt und an verschiedene Stoffe gebunden sind. In diesem differenzierten Zustande finden sich die beiden Komponenten bei der großen Zahl der im Serum teils normaler Weise vorhandenen, teils durch immunisatorische Eingriffe erzeugten Cytotoxine, deren Studium durch die grundlegenden Arbeiten Bordets über die immunisatorisch erzeugten Hämolysine die Wege geebnet wurden. Wir haben es hier mit Antikörpern zu tun, die aber dadurch vor den Antitoxinen einen großen Vorteil besitzen, daß sie, wie die Toxine auf das empfindliche Substrat, sinnfällige Wirkungen auf die zugehörigen Antigene ausüben, eine Gruppe von Antikörpern, zu denen auch die Agglutinine und Präzipitine gehören. Bei den Cytotoxinen wird die haptophore Gruppe durch den thermostabilen, Amboceptor oder Immunkörper genannten, Bestandteil repräsentiert, während das thermolabile Komplement der Träger der toxophoren Gruppe ist. Die Spaltung des komplexen Cytotoxins in die beiden Komponenten wird hier durch den Bindungsversuch bei 0° in sehr deutlicher Weise ermöglicht, da unter diesen Verhältnissen nur der Amboceptor, nicht das Komplement von den empfindlichen Zellen gebunden wird. Da ferner der Amboceptor auf die Zelle keinerlei ersichtliche Wirkung ausübt und dabei doch durch seine strenge Spezifität im Verhalten zur Zelle als Vermittler der Komplementwirkung die wesentliche Rolle der haptophoren Gruppe spielt, so liegen bei diesen komplexen Hämolysinen und Cytotoxinen die Bedingungen für Bindungsversuche am allergünstigsten. Auch die Spezifität der Erscheinungen ist hier in einfachster Weise der experimentellen Analyse zugänglich. Sie ist nicht im morphologisch-zoologischen Sinne zu deuten, sondern als

der Ausdruck chemischer Beziehungen zwischen den Zellreceptoren und den haptophoren Gruppen aufzufassen.

Für derartige Studien über den Zusammenhang zwischen Rezeptoren und Spezifität kommt an erster Stelle das von mir und MORGENROT eingeführte Prinzip der wechselseitigen elektiven Absorption in Betracht. Die Hämolysine z. B. sind ja immunisatorisch durch Vorbehandeln von Tieren mit einer bestimmten Blutart gewonnen. Wenn sie trotzdem auch auf einige andere nahe verwandte Blutarten wirken, so ist der Grund dafür einfach darin zu suchen, daß die letzteren einige Rezeptorentypen mit der zur Immunisierung verwandten Blutart gemeinsam haben. Aber schließlich bleibt in der Regel doch ein Rest von Rezeptoren, welche für jede Species eigentümlich ist, und wenn man die Ambozeptoren an eine andere Blutart bindet, so wird daher eine Quote frei bleiben, welche dann streng spezifisch reagiert. Man kann also auf diese Weise eine Vielheit von Rezeptoren und Ambozeptoren differenzieren. Dieses Verfahren, das mutatis mutandis auf alle Reaktionen von Antigenen und Antikörpern anzuwenden ist, muß natürlich stets unter strikter Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse geübt werden. Es genügt nicht, nur qualitativ festzustellen, daß nach der Absorption einer gewissen Ambozeptormenge die eine der vorher beobachteten Wirkungen vorhanden ist, die andere fehlt, sondern es muß durch quantitativen Vergleich ermittelt werden, daß die eine Funktion in unversehrter Stärke geblieben, während die andere ganz erloschen ist, oder daß zum mindesten eine deutliche Disproportionalität in den relativen Werten vor und nach der Absorption besteht. Das gleiche gilt übrigens auch für alle anderen Eingriffe, durch welche eine Vielheit von wirksamen Stoffen erwiesen werden soll, wie es besonders zur Stütze der Auffassung einer Pluralität von Komplementen in zahlreichen Versuchen geschieht. Wenn die quantitativen Verhältnisse in der erörterten Weise berücksichtigt werden, so sind die Versuchsergebnisse ganz eindeutig, und die Vorwürfe, welche von manchen Seiten, besonders von BORDET, gegen diese Art des methodischen Vorgehens erhoben worden sind, verlieren bei quantitativem Arbeiten jede Berechtigung.

Schwieriger gestalten sich die Bedingungen für die Analyse der Reaktionen zwischen Ambozeptor und Komplement. So viele gewichtige Gründe auch dafür sprechen, daß sich Ambozeptor und Komplement zu dem wirksamen Komplex vereinigen*), so schwierig ist das Problem der Darstellung des cystotoxischen Reaktionsproduktes. Es kommt hier zunächst die große Labilität der beiden Komponenten als hemmendes Moment in Betracht, die ja überhaupt die Analyse der Immunstoffe auf so enge Grenzen beschränkt. Dann aber geht aus den bisherigen Erfahrungen so viel hervor, daß die Reaktion des freien Amboceptors mit dem Komplement eine recht unvollkommene ist, so daß immer nur bei einem ziemlich großen Überschuß einer Komponente eine wesentliche Menge des komplexen Produktes entstehen dürfte, während nach der Bindung des Ambozeptors an die Zelle eine Aviditätssteigerung eintritt, welche die Bindung des Komplements ermöglicht. Die Synthese des wirksamen Cytotoxins erscheint daher, soweit die Serumstoffe in Betracht kommen, vorläufig fast aussichtslos. Von um so größerem Interesse muß daher die Bearbeitung eines Gebietes erscheinen, daß in zahlreichen

*) BORDET nimmt bekanntlich an, daß das Komplement direkt an die Zelle angreift, eine Auffassung, für die meines Erachtens jeder Beweis fehlt.

Punkten eine große Analogie mit den Wirkungen der Cytotoxine aufweist, die Analyse der Schlangengifte. Bei der Hämolyse durch Schlangengift spielt letzteres in der Tat insofern die Rolle eines Ambozeptors, als es, an und für sich unwirksam, als komplettierenden Agens des Lecithins bedarf. Auf Grund dieser von Kyes entdeckten Basis war der methodischen Bearbeitung eine weite Perspektive eröffnet. Denn durch die Stabilität beider Koponenten, von denen eine sogar in das Reich der chemisch bekannten Stoffe gehört, und weiter durch den Umstand, daß der Schlangengiftambozeptor, wenn überhaupt, so nur in äußerst geringem Grade mit den Blutzellen reagiert, dagegen ein ausgesprochenes Vereinigungsbestreben mit dem Lecithin aufweist, waren die technischen Schwierigkeiten beseitigt. Und so ist es hier Kyes gelungen, das Reaktionsprodukt auf chemischem Wege als analysenreine Verbindung zu isolieren. Dieses aus Lecithin und Schlangengift dargestellte „Lecithid" ist eine sehr stabile Substanz mit den Löslichkeitsverhältnissen der fettartigen Stoffe. Dabei ist das Lecithid ein echtes Antigen, wie die gelungene Antikörpererzeugung dartut. Da es andererseits mit dem Antitoxin des nativen Cobragiftes nicht mehr reagiert, das letztere aber auch nach der Neutralisierung durch Antitoxin sich noch mit dem Lecithin kuppelt, so sind hier die Möglichkeiten für die Lösung einer Reihe von Fragen über die Beziehungen zwischen Antigenen und Antikörpern unter besonders günstigen Umständen gegeben. Man ist hier in der Lage, das freie Toxin der neutralisierenden Wirkung des Antitoxins nach Belieben durch die Überführung in das Lecithid zu entziehen. Ich erinnere in dieser Hinsicht nur an den Morgenroth auf diesem Wege gelungenen Nachweis, daß die neutrale Verbindung von Cobragift und Antitoxin durch Salzsäure in die beiden Ausgangskomponenten gespalten werden kann. Daß nach dem Abstumpfen der Salzsäure, wie es zur Prüfung der Gemische notwendig ist, die ursprünglichen Bedingungen, welche die neutralisierende Wirkung ermöglichten, nicht mehr restuirt werden, wird eben durch die bereits während der Salzsäuregegenwart herbeigeführte Lecithidbildung bedingt.

Aber schon die chemische Analyse des Lecithids, das in der elementaren Zusammensetzung einem Monostearyllecithin entspricht, hat gezeigt, daß hier das Gebiet gelegen ist, wo die Erscheinungen des Immunitätsgebietes am ehesten mit dem großen Kreise der reinen Chemie tangieren dürften, und man kann in dieser Richtung besondere Hoffnungen hegen, in die chemische Eigenart der Antigene und Antikörper einen näheren Einblick zu gewinnen.

Jedenfalls zeigt schon heute die beträchtliche Summe des vorhandenen Tatsachenmaterials, wie fruchtbar sich das auf strukturchemischen Anschauungen basierende heuristische Prinzip für die Analyse der reagierenden Stoffe bewiesen hat, obgleich die rein chemische Methodik so ganz versagte. Das Studium der Spezifitätserscheinungen hat es sogar ermöglicht, so feine Methoden zum Nachweis bestimmter antigenartiger Stoffe auszuarbeiten, wie sie die chemische Analyse nicht kennt. Ich darf in dieser Hinsicht auf die Differenzierung der Eiweißantigene durch die Präzipitinreaktion hinweisen und an die Bindung (Ablenkung) der Komplemente durch die an Eiweißantigene gebundenen Amboceptoren erinnern. Hier handelt es sich um Methoden von größter Präzision, die zudem lediglich auf dem Kriterium indirekter Reaktionen beruhen.

Wenn ich zum Schluß noch kurz auf die biologische Quote der Entstehung der Antikörper eingehen darf, so handelt es sich hier

natürlich um ein Gebiet, das der methodischen Erforschung am schwierigsten zugänglich ist. Aber auch hier kann die von mir in der Seitenkettentheorie zum Ausdruck gebrachte Konzeption als ein wertvolles Leitmotiv betrachtet werden, das zu einer Reihe von experimentell prüfbaren Fragestellungen Anlaß gegeben hat. Ich bin mir bewußt, daß ein Teil der die Antikörperbildung bedingenden Erscheinungen in das Gebiet der Physiologie des Reizes fällt, wie es auch neuere Untersuchungen von Pfeiffer und Wassermann gezeigt haben, aber ich glaube doch, daß die Spezifität der Antikörpersekretion ihre einfachste Erklärung findet in der von mir vertretenen Auffassung, daß die Antikörper normale Bestandsteile des Organismus darstellen, die im Zellprotoplasma als Rezeptoren die Giftwirkung, resp. Antigenbindung vermitteln und durch die Wirkung der spezifischen Bindung, zuweilen in Kombination mit einem Reize, im Übermaß neugebildet und in die Blutbahn secerniert werden. Vorgänge, welche denen der Antikörperbildung analog sind, spielen sich nach meiner Auffassung während des normalen Zellstoffwechsels fortdauernd ab, und in der Behandlung der Immunitätsvorgänge als eines Kapitels der allgemeinen Ernährungsphysiologie stimme ich mit den Anschauungen Metchnikoffs vollkommen überein, dessen scharfsinnigen Beobachtungen unsere Wissenschaft so viel verdankt, und dessen Lehre von der Phagozytose durch die Entdeckung der Opsonine und cytotropen Substanzen in letzter Zeit zu neuer Blüte gelangt ist.

Der experimentellen Erforschung ist die eine sich aus der Seitenkettentheorie ergebende Anschauung ohne weiteres zugänglich, welche die Identität des Antikörper bindenden und bildenden Bestandteiles des Antigens betrifft. Man braucht nur nachzuweisen, daß die Bindung der Antikörper die antigene Funktion aufhebt, wie dies seit von Dungern in zahlreichen Fällen geschehen ist. Dagegen dürfte der in gewissem Sinne umgekehrte Weg, welcher darin besteht, daß die Antikörperbildung auch beim Fehlen einer bindenden Funktion der Antigene versucht wird, nicht zu eindeutigen Resultaten führen. Denn wenn auch, wie es von verschiedenen Seiten beschrieben worden ist, die Erzeugung von Antikörpern trotz fehlender Bindungskraft gelingt, so ist zunächt zu berücksichtigen, daß die immunisierende Kraft einen weit feineren Indikator für das Vorhandensein von Rezeptoren darstellt, als der Bindungsversuch. Dann ist aber auch zu bedenken, daß die Reaktionsfähigkeit der haptophoren Gruppen im Reagensglasversuch durch mannigfache Umstände (Aviditätsverminderung, mechanische Hemmungen etc.) behindert sein kann, während sie im tierischen Organismus noch in Erscheinung tritt.

Endlich können die Veränderungen, welche im Organismus nach einmaliger Immunisierung verbleiben, auch auf Grund der durch die Seitenkettentheorie gegebenen Vorstellungen methodisch verfolgt werden. Die Bindungsfähigkeit der Organe, die Schnelligkeit der Reaktion, die Änderungen der Giftempfindlichkeit gehören zu diesen Faktoren, welche dem Experiment zugänglich sind, und deren Analyse zu Resultaten geführt hat, welche nach der Seitenkettentheorie im Vorhinein zu erwarten waren. Nach alledem ist die Seitenkettentheorie wohl geeignet, einerseits die feststehenden Tatsachen der Immunitätslehre in ein einheitliches Gefüge zusammenzufassen, andererseits aber auch der weiteren methodischen Forschung als eine zweckmäßige Grundlage zur Auffindung neuer Fragestellungen zu dienen.

Einiges über die Methodik und Technik der Immunitätsforschung.

Von

El. Metschnikoff

in Paris.

Je komplizierter eine biologische Erscheinung ist, desto wichtiger ist es, die Technik ihrer Untersuchung derart zu gestalten, daß der Überlegung ein möglichst geringer Spielraum bleibt.

Die Immunitätserscheinung ist ein Vorgang, welcher sich im lebenden Organismus abspielt. Die Technik der Erforschung der Immunität hat deshalb zur Pflicht, sich soweit wie möglich an die Prozesse im lebenden Körper zu halten. Von diesem Prinzip ausgehend, habe ich meine erste Immunitätsarbeit an einem durchsichtigen niederen Tiere — einer Daphnie — gemacht.

Die unmittelbare Wahrnehmung der Erscheinungen unter dem Mikroskope hat am lebenden Tiere gezeigt, daß die Infektion des Organismus mit pathogenen Keimen eine heftige und heilbringende Reaktion seitens amöboider Blutkörperchen hervorruft. In einem so wenig komplizierten Organismus, wie derjenige der Daphnien, haben sich die lebenden Phagozyten als Immunitätsträger herausgestellt.

Erst nachdem der Kampf zwischen den Infektionserregern und den Leukozyten in seinen verschiedenen Stadien bei lebenden Daphnien direkt ermittelt wurde, konnte man daran denken, die so sehr komplizierten Immunitätserscheinungen höherer Tiere auf dasselbe Prinzip zurückzuführen.

Es war dabei natürlich nicht möglich, den Vorgang unter so einfachen und dem Auge direkt zugänglichen Bedingungen zu ermitteln. Der Überlegung mußte unabweislich offene Pforte gelassen werden, was zu unzähligen Mißverständnissen geführt hat.

Zur Zeit als die Phagozytentheorie der Immunität der heftigsten Opposition Front halten mußte, erlaubte der Gedanke an die unmittelbar gesehenen Erscheinungen bei Daphnien den Weg zu finden, auf die meisten Einwendungen Antwort zu geben.

Es war ein Leichtes auch bei den verschiedensten Wirbeltieren die Aufnahme pathogener Bakterien durch lebende Leukozyten direkt unter

dem Mikroskope zu beobachten; aber man durfte daraus noch nicht schließen, daß die Vorgänge im lebenden Körper mit den letzteren durchaus identisch sind.

Auf den früher erhobenen Einwand, daß Phagozyten nur Totengräber sind, indem sie erst die ohne ihr Zutun abgetöteten Infektionskeime aufnehmen, hätte man leicht antworten können auf Grund der Beobachtungen in vitro, welche zeigten, daß Leukozyten zweifellos lebende Bakterien gierig auffressen. Das Hauptprinzip, welches wir hier besonders hervorheben, erlaubte dies aber nicht. Es wäre möglich, daß Leukozyten, sowohl wie Infektionserreger, im lebenden Organismus sich ganz anders verhalten als in einem Exsudat, oder Bluttropfen unter dem Deckglase. Die Leukozyten, aus ihren natürlichen Bedingungen entfernt, könnten dabei ganz besonders erregt werden, etwa wie ein abgeschnittener Schwanz einer Schlange oder Eidechse. Diese krankhafte Aufregung könnte zur Aufnahme solcher Körper führen, welche unter natürlichen Bedingungen stets vermieden werden.

Andererseits könnten die Bakterien im lebenden Tierkörper andere Stoffe erzeugen, als in einem hängenden Tropfen. Es ist Tatsache, daß Leukozyten in vitro sich anders verhalten können, als im lebenden Organismus. Wir haben oft gesehen, daß in physiologischer Kochsalzlösung suspendierte Leukozyten der Meerschweinchen massenhaft die virulentesten, aus dem Blute stammenden Milzbrandbazillen aufnahmen, während im Meerschweinchenkörper keine Spur von Phagozytose zu beobachten war.

Unter solchen Verhältnissen mußte der Nachweis, daß Phagozyten imstande sind lebende und virulente Bakterien aufzufressen, auf einem anderen Wege gesucht werden. Es mußte festgestellt werden, daß Infektionserreger, welche nicht in vitro, sondern im lebenden immunen Körper von Leukozyten aufgenommen wurden, lebendig und infektionsfähig sind. Dieser Nachweis ist zum ersten Male bei immunen Tauben erbracht worden, aus deren Exsudate milzbrandbazillenhaltige Leukozyten isoliert wurden, wobei die eingeschlossenen Bazillen weiter fortgezüchtet und mit Erfolg eingeimpft wurden. Bei einem solchen Verfahren konnte man nicht mehr daran zweifeln, daß Leukozyten lebendige Infektionserreger aufnehmen.

Da demnach Exsudate immuner Tiere, welche nur intraphagozytäre Bakterien enthalten, für empfängliche Tiere derselben Spezies virulent sind, mußte man schließen, daß Phagozyten imstande sind, virulente Infektionserreger in sich aufzunehmen.

Des weiteren hat sich ergeben, daß viele Bakterien, welche in Leukozyten enthalten sind, aus dem immunen Organismus entfernt und in vitro gehalten, sich vermehren und üppige Kulturen geben. Diese Tatsache hat zur Annahme geführt, daß Phagozyten keineswegs als Totengräber, sondern als Vertilger virulenter Keime wirken.

Es mußte nun noch die Frage entschieden werden, ob pathogene Mikroorganismen auch in der Blutflüssigkeit des lebenden immunen Tieres abgetötet werden. Die allgemein anerkannte Tatsache, daß das defibrinierte Blut und das Blutserum eine mehr oder weniger starke bakterizide Wirkung ausüben, wurde von vielen Forschern so aufgefaßt, daß auch das Blutplasma des lebenden Organismus imstande ist die Infektionserreger abzutöten. Es wurde dagegen eingewendet, daß die Erfolge der Versuche, welche eine bakterizide Wirkung der aus dem Tierkörper entnommenen Flüssigkeiten beweisen, keineswegs auf die Vorgänge im lebenden Organismus direkt angewendet werden können.

Um eine definitive Lösung zu gewinnen, hat man sich von vielen Seiten bemüht, aus dem entnommenen Blute ein wirkliches Blutplasma darzustellen. Die Ergebnisse derartiger Versuche führten aber zu ganz widerspruchsvollen Schlußfolgerungen, indem einige Autoren die bakterizide Wirkung dem Blutplasma absprachen, während die meisten Forscher eine solche mit Entschiedenheit befürworteten. Nun ist es kaum zu leugnen, daß alle in vitro dargestellten Plasmaarten dem Blutplasma des lebenden Tieres mehr oder weniger ähnlich, aber durchaus nicht identisch sind.

Unter solchen Verhältnissen blieb nichts anderes übrig, als, anstatt der Versuche in vitro, das Schicksal direkt in den Blutkreislauf immuner Tiere eingeführter Bakterien zu verfolgen. Dazu mußten die zartesten, d. h. am leichtesten abzutötenden Bakterien gewählt. Als solche wurden von J. Bordet und Levaditi Choleravibrionen genommen, welche durch ihre Umwandlung in Körnchen am besten eine bakterizide Wirkung bekunden. Es stellte sich dabei heraus, daß im immunisierten Tierkörper Choleravibrionen kreisen, ohne sich zu Körnchen umzugestalten, während sie in dem präparierten „Blutplasma“ solcher Tiere eine Körnchenmetamorphose binnen weniger Minuten erleiden.

Die angeführten Beispiele mögen genügen, um zu zeigen, daß das Hauptprinzip der Methodik, resp. der Technik der Untersuchungen über die Immunität, darin bestehen muß, die Vorgänge im lebenden Organismus stets im Auge zu behalten und nie daran zu gehen, die Erscheinungen in vitro sofort auf die Verhältnisse im Tierkörper zu übertragen.

I.

Allgemeines über bakterielle Antigene, deren Antikörper bakteriolytische, agglutinierende, präzipitierende Eigenschaften aufweisen.

Von

M. Neisser

in Frankfurt a. M.

Der Entdeckung und Erforschung der künstlich erzeugten aktiven Immunität (JENNER, PASTEUR, KOCH) folgte die Serologie, die an VON BEHRINGS wunderbare Entdeckung anknüpft und das Studium der aktiven Immunität außerordentlich gefördert hat. Erst als die Serologie die immunisatorisch entstandenen Veränderungen nach den verschiedensten Richtungen hin in bequemer Weise zu studieren ermöglichte, konnten mannigfaltige Methoden der aktiven Immunisierung rationell ausgearbeitet werden. Aber die Prinzipien der aktiven Immunisierung sind vor der Serologie festgelegt worden. Seit der Zeit als PASTEUR das als allgemeines Naturgesetz erkannt hat, was JENNER im Spezialfall beobachtet und verwertet hatte, — die Entstehung der Immunität durch Einverleibung des künstlich abgeschwächten Infektionserregers — seit dieser Zeit ist nur ein im wesentlichen neues Prinzip der Immunisierung entstanden und auch das fällt in die Zeit vor der Entstehung der Serologie. Es lag außerhalb des PASTEURschen Gedankenkreises; er, der so lange dafür kämpfen mußte, daß es die lebende Hefezelle sei, die Gährung hervorruft, mußte auch glauben, daß die Immunitätswirkung an das Leben der Infektionserreger gebunden sei. TOUSSAINT (1880) war es wohl zuerst, der dieses Dogma umzustürzen versuchte, ohne aber bei seiner unvollkommenen Technik beweisende Versuche liefern zu können. Er stellte Immunisierungsversuche mit Milzbrandblut an, das er durch Filtration, durch Erwärmung oder durch Phenolzusatz von den Infektionserregern zu befreien suchte. Aber erst SALMON und SMITH[57]) und CHAMBERLAND und ROUX[11]) zeigten einwandsfrei, daß eine Immunisierung auch durch abgetötete Bakterien möglich sei, ja daß die durch Filtration von allen corpusculären Elementen befreiten Kulturflüssigkeiten befähigt seien, Immunität hervorzurufen. Diese Prinzipien der Immunisierung gelten auch heute noch. Freilich ist mancher technische Fortschritt zu verzeichnen: die Abschwächung der Infektionserreger, die von

JENNER und PASTEUR durch geeignete Tierpassagen oder auf physikalischem Wege erreicht wurde, hat VON BEHRING[4]) durch chemische Mittel zuerst versucht. Durch ROB. KOCH ist die mechanische Zertrümmerung der Bakterien in die Immunitätslehre eingeführt worden. Auch in der Immunisierungstechnik, in der Wahl der zu immunisierenden Tiere, in den Vorstellungen über den Immunisierungsprozeß sind große Fortschritte zu verzeichnen; in diesem Abschnitt soll indessen nur die Herstellung der bakteriellen Antigene, soweit ihre Antikörper als Agglutinine, Praecipitine und Lysine bekannt sind, behandelt werden.

Dosierung.

Bei der Immunisierung darf nicht so vorgegangen werden, daß beliebige Mengen eines beliebig virulenten Impfstoffes irgendwie einverleibt werden, sondern man muß mit einem Impfstoff von einigermaßen bekannter Stärke arbeiten, der quantitativ unter fortlaufender Kontrolle des Impfresultates verabfolgt wird. Die Dosierungsfrage spielt deshalb eine bedeutende Rolle. Handelt es sich um größere Kulturmengen, so wird man nach „Agarkulturen“ rechnen; dabei ist dann natürlich vorausgesetzt, daß man ungefähr gleich große Agarflächen benutzt. Man wird also Röhrchen gleicher Weite mit gleichen Mengen Agars beschicken und sie dann bei gleicher Neigung zur Erstarrung bringen. Die Beimpfung geschieht dann (nach GOTSCHLICH und WEIGANG[27]) am besten und gleichmäßigsten durch Übergießen der schrägen Fläche mit einer dichten Bouillonaufschwemmung einer jungen Agarkultur (5 cc Bouillon auf eine Agarkultur). Der Grad der Dichtigkeit der Aufschwemmung ist nach den Versuchen dieser Autoren nicht sehr wesentlich, da die Zahl der Keime auf den geimpften Röhrchen die gleiche blieb, auch wenn die Aufschwemmung, mit der geimpft wurde, um das 20fache verdünnt war. Folgende Zahlen der Autoren seien angeführt. Die Ernte zweier 20stündigen Cholerakulturen (Reagenzgläser von 15 mm Weite beschickt mit 5 cc Agar), die mit der dichten Aufschwemmung (5 cc Bouillon auf eine 20-stündige Agarkultur) übergossen waren, ergab 23966 und 23103 Mill. lebende Keime. Zwei ebensolche Röhrchen, aber mit 20fach verdünnter Aufschwemmung übergossen, ergaben: 23776 und 21582 Mill. lebender Keime. Man kann auch Agar in Röhrchen gleicher Weite, welche genau senkrecht aufgestellt werden, wagerecht erstarren lassen, die Flächen mit gleicher Tropfenzahl einer Bouillonkultur beimpfen und diese kleineren Flächen dann abspülen. Freilich muß man womöglich gleichen Agar benutzen, und gerade das stößt bei Immunisierungen, die sich ja häufig über Wochen und Monate hinziehen, auf Schwierigkeiten. Die gleichmäßige Besäung von Agarplatten in Petrischalen, deren Oberfläche bei der üblichen Größe auf 60—65 qcm zu schätzen ist (gegenüber 12 bis 13 qcm einer schrägen Agarfläche von 9 cm Länge und 1,4 cm Breite), ist schwieriger und unsauberer. Es empfiehlt sich daher in solchen Fällen die Verwendung der Massenkulturen auf KOLLEschen Schalen, deren Oberfläche auf 12—13 Agarröhrchen zu schätzen ist. Man beimpft die KOLLE-Schalen mit größeren Mengen (etwa 10 cc) einer dichten Bouillonkultur oder Bouillonaufschwemmung. In allen Fällen hat ein sorgfältiges Abschwemmen der gewachsenen Kultur mit einer großen langen Platinöse zu erfolgen. Ein Durchsieben durch ein feines ausglühbares Nickeldrahtnetzchen (z. B. von der Firma Ratazzi & May, Frankfurt-Bockenheim), das man sich in Filterform biegt, ist sehr zu

empfehlen. Eine recht zweckmäßige, wenn auch umständliche Art der Dosierung ist die Centrifugalmethode nach Ehrlich, wie sie R. Otto für die Tauruman-Prüfung ausgearbeitet und in seiner Monographie über die staatliche Prüfung der Heilsera [52]) beschrieben hat. Centrifugen-Gläschen (F. & M. Lautenschläger) mit dünn ausgezogenem, graduiertem Endstück, das beim Centrifugiren in ein Stück sehr starkwandigen Vaccumschlauches gesteckt wird, werden mit der Abschwemmung gefüllt und zentrifugiert. Irgend eine konservierte Bakterienaufschwemmung wird jedesmal mit zentrifugiert und dient als Standard der Konzentration. Die Tourenzahl der Zentrifuge ist dabei im einzelnen Falle gleichgültig, da ja nur der Vergleich der Standardaufschwemmung maßgebend ist, durch den man eben erfährt, in welchem Verhältnis die Dichtigkeit der fraglichen Aufschwemmung zur Dichtigkeit der Standardaufschwemmung steht. Durch entsprechende Verdünnung stellt man dann jedesmal die gleiche Konzentration her. Eine sehr schnell laufende Zentrifuge ist allerdings notwendig. Besonders wird sich diese Art der Kulturdichtigkeitsvergleichung für Bouillonkulturen eignen, über deren Dichtigkeit man sonst nicht leicht Aufschluß erhalten kann. Zu berücksichtigen ist freilich, daß die Zentrifugierung alles Corpusculäre in das Sediment bringt, tote wie lebende Bakterien eventl. auch ausgefallene Salze etc.

Schließlich kann man auch die Dichtigkeit auf optischem Wege annähernd bestimmen, wie neuerdings von Zelikow [71]) angegeben worden ist. Aus flüssigen Kulturen wird man im allgemeinen entweder direkt mit der Spritze ansaugen oder mit der Pipette, welche durch ein vorgeschobenes Wattestückchen gesichert wird, entnehmen. Für manche Fälle, zumal für kleinere Flüssigkeitsmengen, mag vielleicht das Verfahren von Forster in Betracht kommen, der geaichte Platinspiralen mit einem Flüssigkeitsinhalt von 2 bis etwa 100 mg verwendet. Diese Spiralen werden nach einer Angabe, die ich dem Straßburger Hygienischen Institut verdanke, folgendermaßen hergestellt: dünner Platin-Iridiumdraht wird um einen Drahtstift (vgl. H. Bloch [5]), [Beiträge zur Bakterienflora der Straßburger Wasserleitung]) von etwa 2 mm Stärke mit gleichem Tourenabstand von etwa $^1/_2$ mm gewickelt, und so eine Spirale von 2—16 Touren hergestellt. Das Ende der letzten Tour wird einwärts gebogen, derart, daß die untere Öffnung halbiert wird; auch das obere Ende wird einwärts gebogen. Der obere Draht führt nach einem rechtwinkligen Knick zum Halter. Die Spirale wird bis zum Knick eingetaucht und muß vollständig gefüllt bleiben. Tarierung erfolgt durch Entnahme aus abgewogener Wassermenge und Wägung des Gewichtsverlusts. — Kleinere Mengen der Agarkultur werden nach dem Vorgang R. Pfeiffers [51]) mit der Öse entnommen. Eine gut geschlossene Öse wird tariert, ihre Höhlung mit der Kulturmasse gleichmäßig gefüllt und gewogen. Pfeiffers Normalöse enthält 2 mg Kulturmasse, eine Agarkultur 15 solcher Ösen = 30 mg, feucht gewogen. Die Art der Füllung ist Übungssache, und es ist wichtig, daß man sich eine bestimmte Art der Füllung angewöhnt.

Eine kleine Abänderung der Pfeifferschen Methode, die mir gute Dienste geleistet hat, stammt von Shiga [60]). Ein stärkerer Platindraht wird breit geklopft und dann so zu einer Öse geformt, daß ein kleines Zylinderchen entsteht. Diese Zylinderöse wird mit Agarkulturmasse reichlich und vollständig gefüllt und die an den beiden Öffnungen überstehende Kulturmasse mit einem starken Platindraht abgestrichen. Auch eine solche Öse tariert man ein für allemal aus. Tavel verwendet kleine

Platinlöffelchen, die mit Wasser geaicht sind. — Die Wägung der getrockneten Bakterienmasse ist von R. Koch für das quantitative Arbeiten mit Tuberkelbazillen eingeführt worden; die Bazillenmasse wird dabei zwischen Fließpapier schnell getrocknet und in diesem Zustand gewogen. G. Cruz [17]) macht dichte Abschwemmungen von Agarkulturen, tötet bei 65° ab, trocknet im Wasserbade und im Exsiccator und wägt. In ganz gleicher Weise werden entsprechende unbewachsene Agarröhrchen abgeschwemmt, getrocknet und gewogen. Die Differenz der beiden Werte ergibt das Gewicht der gewachsenen Bakterienmasse. Gosio [26]) trennt in gewachsenen Bouillonkulturen durch Zusatz von agglutinierendem Serum den Baktierienniederschlag von der Flüssigkeit, tötet bei 65° ab und wägt gleiche Volumina des Sediments und der Flüssigkeit nach völliger Trocknung. Die Differenz ergibt das Gewicht der Bakterien.

Die zur Immunisierung notwendige Menge des Impfstoffs variiert so sehr nach der Bakterienart, dem Kulturmedium, dem Tier, der Applikationsweise, daß sich allgemein giltige Angaben nicht machen lassen, nur das läßt sich sagen, daß die immunisatorisch wirksame Virusmenge zwischen einer minimalen und einer maximalen Menge liegt, von denen die letztere durch die Virulenz bezw. die Giftigkeit des Impfstoffs gegeben ist; denn Dosen, welche zu schwererer oder dauernder Erkrankung des Tieres führen, sind immunisatorisch unverwertbar. Die wirksame Minimalmenge ist für junge und alte Tiere etc. verschieden, besonders aber verschieden je nachdem es sich um eine Ersteinspritzung oder um eine Reinjektion handelt. Von welcher Bedeutung die Applikationsweise ist, wurde schon betont. Innerhalb der Grenze der Wirksamkeit ist die Menge des Impfstoffs von nicht sehr großer Bedeutung. So wies z. B. Ascher [2]) nach, daß die subkutane Einverleibung von 3 oder 1, von $^1/_2$ oder $^1/_4$ Agarröhrchen, von $^1/_5$ oder $^1/_{10}$ Öse Choleravibrionen die gleiche immunisatorische Reaktion beim Kaninchen hervorruft. Bedeutungsvoll sind die Feststellungen Friedbergers [22]), der zuerst zeigte, mit wie geringen Mengen Impfstoffs gelegentlich erhebliche Immunprodukte zu erzielen sind. Die intravenöse Einverleibung von $^1/_{5000}$ Öse Choleravibrionen ergab bei Kaninchen noch deutlich nachweisbare Erhöhung des bakteriziden Serumtiters, die Einspritzung von $^1/_{100}$ Öse brachte die gleich hohen immunisatorischen Effekte wie $^1/_{20}$ Öse hervor. Friedberger und Dorner [23]) zeigten, daß auch kleine Mengen roter Blutkörperchen zur Erzielung immunisatorischer Hämolysine ausreichen. Sie konnten mit 1 mg bis $^1/_2$ mg einer 5%igen Ziegenblutaufschwemmung (entsprechend etwa 300000 – 900000 Blutkörperchen) bei Kaninchen eine 5—20fache Steigerung des Serum-Hämolysins hervorrufen (vgl. auch Dorner [19])).

Ausführliche Tabellen über die Antikörperbildung nach Vaccinierung mit kleinsten Dosen bringen Friedberger und Moreschi [24]). Sie zeigten, daß, wenn das Antigen bei der Herstellung nicht übermäßig geschädigt wird, die Dose von $^1/_{100}$ bis $^1/_{500}$ Öse pro 1 kg Tier (Kaninchen) bei intravenöser Einspritzung zu reichlicher Antikörperbildung genügt; auch erheblich größere Dosen bieten keinen wesentlichen Vorteil. Was durch diese Arbeit für die einmalige Verabreichung des Impfstoffes — und nur so haben Friedberger und Moreschi immunisiert — festgestellt ist, muß für mehrfache Immunisierungen erst noch bewiesen werden.

Für die Erlangung bakterizider Cholerasera genügt die einmalige Einspritzung von Choleravibrionen, auch agglutinierende Sera anderer

Bakterien von leidlicher Stärke kann man so erhalten; so ergibt z. B. die einmalige subkutane Einspritzung von zwei bei 60° abgetöteten Typhuskulturen bei Kaninchen in der Regel Sera mit einem Titer bis etwa 1 : 2000. In den meisten Fällen wird man aber mehrfach spritzen müssen, und dann kommen verschiedene Schemata in Betracht. Einmal kann man die einmalige Einspritzung gleichsam in mehrere kleinere Teile zerlegen; man spritzt dann eine zeitlang (z. B. 5 Tage lang) jeden Tag eine kleine Menge des Impfstoffes; oder aber man impft am ersten, dritten und fünften Tage. Natürlich müssen dann die Dosen so klein gewählt werden, daß erhebliche Fiebersteigerungen oder andere Krankheitserscheinungen nicht auftreten. Es empfiehlt sich dies Verfahren in der Laboratoriumspraxis besonders dann, wenn man mehrere Tiere mit verschieden großen Impfstoffdosen behandelt hat und merkt, daß die kleinsten Dosen, die man gewählt hat, augenscheinlich zu wenig wirksam sind. Man gibt dann eben dieselben Dosen mehrfach im Laufe mehrerer Tage.

Eine zweite Art des Vorgehens besteht darin, daß man die Reininjektion macht, wenn die aktive Antikörperproduktion beginnt, indem man sich vorstellt, daß dann die Bildungsstätten der Antikörper im akuten Reizzustand sind und besonders leicht auf die Zuführung von Antigen antworten werden. Man wird dann die Reinjektion am vierten, fünften oder allenfalls am sechsten Tage nach der Ersteinspritzung vornehmen und im gleichen Zwischenraum ein- oder zweimal wiederholen. Will man in einem weiteren Stadium oder auf dem Höhepunkt der Antikörperbildung reinjizieren, so wählt man den achten bis zehnten Tag; hierbei ist nur zu berücksichtigen, daß der schon reichlich vorhandene Antikörper die Zuführung größerer Mengen Antigens bedingt; es ist ferner zu berücksichtigen, daß unangenehme Nebenwirkungen durch die größere Menge des Antigens oder durch das Zusammentreten des schon vorhandenen Antikörpers mit dem neu zugefügten Antigen auftreten können. Es ist vorläufig nicht zu entscheiden, ob es dabei z. B. zu echter Agglutination oder Präzipitation in vivo und dadurch bedingten Verstopfungs- und Gerinnungserscheinungen kommt oder ob durch Bindung von Antigen und Antikörper in vivo Erscheinungen analog der Komplementablenkung (Bordet-Gengou-Moreschi) auftreten. — Schließlich kann man die erste Antikörperbildung abklingen lassen und reinjizieren, nachdem das Tier völlig normal scheint; in einem solchen Tier reagieren die Antikörperbildungsorte auf kleine Antigenmengen unverhältnismäßig stark, man bedarf also nur geringer Mengen von Antigen und läuft auch nicht Gefahr durch Reagieren von Antikörper und Antigen im Tier störende Nebenerscheinungen zu erleben. Natürlich dauert diese Art der Immunisierung sehr lange, da man nur etwa alle 14 Tage bis 4 Wochen eine Reinjektion machen kann.

Man kann diese Schemata auch kombinieren, indem man z. B. mehrere Tage hintereinander (oder dreimal in zweitägigen Intervallen) kleinere Mengen gibt und die Reinjektion in etwa gleicher Weise nach ein paar Wochen wiederholt. Allgemeinste Voraussetzung ist aber, daß man nicht reinjiziert, wenn das Tier irgendwie erheblich krank ist. Temperaturmessung und Wägung sind deshalb für eine planvolle Immunisierung von großem Werte und ebenso wichtig ist die Kontrolle des Impferfolges. Man entnehme deshalb jedem zu immunisierenden Tiere vor der ersten Einspritzung etwas Blut und vergleiche den Titer mit dem etwa acht Tage nach der entsprechenden Einspritzung entnommenen Blute.

Virulenz.

Bei Verwendung lebender Kulturen zur Immunisierung ist es von großer Wichtigkeit, sich über die Virulenz zu orientieren. Der Immunisator muß deshalb mit der Technik der Virulenzprüfung bei den verschiedenen Tierarten vertraut sein. In vielen Fällen ist es wichtig, einen Stamm von maximaler Virulenz zu besitzen, immer aber wird es nötig sein, darauf zu achten, daß die Virulenz der Kultur im Laufe der Immunisierung nicht wesentlich herabgeht; andererseits ist auch eine Steigerung der Virulenz während der Immunisierung nicht angezeigt, weil dadurch die Dosierung erschwert wird. Vielerlei Verfahren sind angegeben worden, um die Virulenz zu steigern und die einmal vorhandene Virulenz konstant zu halten. Wofern Tierpassagen gemacht werden, überzeuge man sich kulturell immer von der absoluten Reinheit der aus dem Tiere wiedergewonnenen Kultur, denn es kann durch die Impfung des Passagetieres eine latente Infektion mit einem anderen Bakterium (z. B. einer Pasteurella) mobil werden und zu Verunreinigung oder zu einer vollständigen (scheinbaren) Änderung der Kultur kommen. Gerade bei den Pasteurella-Arten, z. B. bei der Hühnercholera, kann durch Kaninchenpassagen oder dergleichen eine „Veränderung" durch Herauszüchten einer anderen Pasteurellaart aus dem Passagetier besonders verhängnisvoll werden. Aber auch bei Nährbodenpassagen, zumal bei Verwendung flüssiger Nährboden oder von Nährboden mit Zusatz von sterilem Serum oder Blut, ist besondere Vorsicht und dauernde Kontrolle der Reinheit erforderlich. Denn es entstehen sonst durch die Immunisierung mit allmählich sich verunreinigenden oder gänzlich veränderten Kulturen wahre Immunitätsmonstra. Zur Erhaltung der Virulenz ist bei Choleravibrionen Meerschweinchenpassage (1—2 mal wöchentlich intraperitoneal) angebracht. Ebenso, wenn auch weniger oft nötig, bei Typhusbazillen; bei Milzbrandbazillen empfiehlt Cienkowsky [13]) Murmeltierpassage, für das Virus der Maul- und Klauenseuche ist nach Löffler [37]) Passage durch junge etwa 6 Wochen alte Ferkel von immer gleicher Rasse nötig. Streptokokken erhält man virulent, indem man Herzblut von Mäusen, die der Infektion erlegen sind, auf sterilem Papier antrocknet und kalt aufbewahrt, oder indem man Gelatinestichkulturen im Eisschrank aufhebt (Petruschky), aber auch Fortzüchtung in Blutserumgemischen ist möglich. Um Rinderpestblut für kürzere Zeit virulent zu erhalten, ist einmalige Passage durch Schafe (Kolle, Turner) erlaubt. Zu berücksichtigen ist übrigens, daß nicht nur die Höhe der Virulenz, sondern auch die Qualität der Virulenz von Bedeutung ist. Man weiß heute, daß eine Virulenzänderung eines Stammes nicht gleichmäßig für die verschiedenen Tierarten einzutreten braucht. Schon Pasteur zeigte beim Schweinerotlauf, daß durch Kaninchenpassagen die Pathogenität der Rotlaufbazillen für Kaninchen gesteigert, für Schweine aber sehr verringert wird (während übrigens die immunisierenden Eigenschaften unverändert bleiben). Voges konstatierte, daß man Hühnercholerabazillen durch Meerschweinpassagen für Meerschweine hochvirulent machen kann, während die Hühnerpathogenität sinkt. Durch Zieselmauspassagen scheinen Rotzbazillen ihre Virulenz für Kaninehen zu ändern (Referat Baumgarten Bd. 6, S. 237). Für Streptokokken zeigte Neufeld [48]), daß Mauspassage ihre agglutinativen Eigenschaften wesentlich verändern kann. Diese qualitative Änderung der Virulenz ist immunisatorisch bedeutungsvoll und wird z. B. bei der Herstellung von Antistreptokokkenseris berücksichtigt.

Zahlreich sind die Versuche, um die etwa verloren gegangene Virulenz eines Stammes wieder zu heben. So hat schon Chauveau[12]) (1889) avirulenten Milzbrand wieder Meerschwein-virulent gemacht, indem er ihn dauernd auf Nährböden mit Zusatz von frischem Blut züchtete. Arloing und Cornevin regenerierten die Virulenz von Rauschbrandmaterial durch Zugabe von Milchsäure, Nocard durch Trimethylamin, Roger[54]) durch Kulturen des Prodigiosus oder durch Extrakte aus faulendem Fleisch, Trombetta[61]) will Staphylokokkuskulturen durch gleichzeitige Einverleibung von Proteus wieder virulent gemacht haben, Monti[43]) gibt das gleiche für Pneumokokken, Streptokokken und Staphylokokken bei Zugabe von Proteusfiltraten an. Pane[49]) regeneriert die verloren gegangene Kaninchenvirulenz von Pneumokokken, indem er die Pneumokokken gleichzeitig mit Milzbrandblut einspritzte; die Tiere sollen dann an Pneumokokken zugrunde gehen, die durch Kaninchenpassagen vollvirulent gemacht werden können. Das Gleiche ist auch für die Kombination Streptokokken-Diphtheriebazillen angegeben worden. Man wird auf alle diese komplizierten Virulenz-Regenerationsverfahren in der Regel nicht zurückgreifen, sondern eher zum Ziele kommen, wenn man aus einer größeren Anzahl von Kulturen von vornherein diejenige aussucht, welche eine gewisse steigerungsfähige Virulenz besitzt, und wenn man sich damit gleichsam ein Virus fixe herstellt, das man durch geeignete Nährböden oder gelegentliche Tierpassagen konstant erhält.

A. Wassermann[64]) hat nachgewiesen, daß gelegentlich nicht die Virulenz, sondern das Bindungsvermögen für die spezifischen Antistoffe maßgeblich für die Verwendbarkeit eines Antigens zu immunisatorischen Zwecken sei. Je mehr bindende Gruppen ein Antigen besitzt, um so besser wird es selbst Antikörper hervorrufen.

In manchen Fällen ist eine völlig avirulente Kultur mit Vorteil zur Immunierung verwendet worden (cf. M. Neisser, s. Lubowski[37a]).

Polyvalenz.

Ein weiteres wichtiges Prinzip ist das der Polyvalenz. In die Praxis der Immunitätslehre ist es wohl zuerst von Denys und van de Velde eingeführt worden. Ausgehend von der bekannten Unwirksamkeit eines mit einem Streptokokkenstamme hergestellten (also monovalenten) Serums gegen manche andere Streptokokkenstämme, immunisierten sie Pferde mit einer Anzahl aus verschiedenen Streptomykosen stammenden Streptokokkenstämme. Sie brachten so das erste polyvalente Serum in den Handel. Über den allgemeinen Wert des Prinzips der Polyvalenz läßt sich kein Urteil abgeben, es wird für die verschiedenen Bakterienarten verschieden sein, und es wird auch wesentlich sein, welchen Zwecken das Serum dienen soll. Immerhin kommt auch für die hier zu behandelnden Sera das Polyvalenzprinzip in Betracht. Außer der Methode, den Impfstoff von verschiedenen Krankheitsbildern zu nehmen und damit zu immunisieren, kommt noch die Verwendung multipartialer (Wassermann[66]) Sera inbetracht. Dabei werden verschiedene Stämme aus denselben Krankheitsbildern verwendet, da die Erfahrung gezeigt hat, daß die aus identischen Krankheitsbildern stammenden Kulturen dem monovalenten Serum gegenüber nicht gleichmäßig zu reagieren brauchen. Lipstein[35]) zeigte das für Diphtherie, seitdem ist es auch für Staphylokokken, Typhusbazillen, Schweineseuchebazillen etc. festgestellt. Das dritte Prinzip der Polyvalenz, das auf die Hämolysinarbeiten von Ehrlich und

MORGENROTH zurückzuführen ist, kommt für die hier zu behandelnden Sera weniger in Betracht. WECHSBERG[68]) zeigt nämlich, daß verschiedene Tierarten, mit demselben Bakterium immunisiert, verschiedene Antikörper liefern. Es lag deshalb nahe, zur Herstellung möglichst vielseitig wirkender Sera zwar einen Stamm, aber verschiedene Tierspezies zu verwenden. So hat RÖMER[55]) anfangs sein Pneumokokkenserum, Schreiber das Landsberger Schweineseuchenserum (vgl. auch SCHUBERT[58]) hergestellt. Bei diesen Herstellungsarten wird man Serummischungen verschiedener Tiere vornehmen müssen und dadurch stets die Hochwertigkeit durch Mischung mit weniger hochwertigem Serum herabsetzen; wenn dadurch die Wirkungsbreite des Serums gegenüber vielerlei Stämmen vergrößert wird, so wird man die Einbuße an Hochwertigkeit gern in Kauf nehmen. Über die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten der polyvalenten Sera weiß man noch nichts.

Es fehlt heute an einer geeigneten Nomenclatur, um in prägnanter Weise die verschiedenen Herstellungsarten der Sera auszudrücken. Es giebt Sera, die mit einer bestimmten Kultur von einem Tier gewonnen werden, es werden aber auch Sera hergestellt mit verschiedenen Kulturen derselben Art oder mit verschiedenen Kulturen verschiedener Arten; ebenso braucht nur ein Tier immunisiert zu werden oder es werden Sera verschiedener Individuen derselben Tierspezies oder schließlich Sera von verschiedenen Tierarten gemischt. Bezeichnet man die Antigene mit der Endung „gen“, so giebt es monogene und polyhomöogene Sera. Immunisiert jemand z. B. mit dem Originalstamm Shiga, so würde ich das ein monogenes Serum nennen. Zieht er es aber vor, verschiedene sichere Shiga-Kruse-Stämme zu benutzen, so würde ich das Serum ein polyhomöogenes nennen. Werden Stämme zur Immunisierung benutzt, die zur selben Gruppe gehören, ohne daß ihre Gleichheit bisher sicher erwiesen ist, so nenne ich dieses Serum ein polygenes. Ein Dysenterieserum würde ich also polygen nennen, (*γένος* Stamm), wenn es mit den verschiedenen Typen des Dysenteriebazillus z. B. Shiga, Flexner etc. hergestellt ist. Auch die Streptokokkensera, die mit verschiedenen Stämmen hergestellt sind (Scharlach, Sepsis, Erysipel etc.) würde ich polygen nennen, oder wenn jemand mit Paratyphus-Bazillus B, Bazillus Aertryck, Mäuse-Typhusbazillus etc., dasselbe Tier immunisierte oder wenn mit den verschiedenen Pasteurellaarten immunisiert wird. Die Sera endlich, die entstehen, wenn ein Tier mit Stämmen immunisiert wird, deren Verschiedenheit sichersteht, möchte ich poikilogen nennen (z. B. wenn gegen Schweinepest und Schweineseuche gleichzeitig immunisiert wird, oder gegen Typhus und Ruhr oder dergleichen). — Wird nur ein Tier geimpft, so nenne ich das Serum monother (*θηρίον*). Wird ein Mischserum von Tieren der gleichen Spezies verwendet, so nenne ich es polyhomöother. Werden dagegen Tiere verschiedener Spezies mit einem Stamm immunisiert und diese Seragemische verwendet, so würde ich das ein poikilotheres Serum nennen. Das Schema wäre also das folgende:

Monogen: Immunisierung mit einer Kultur

Polyhomöogen: Immunisierung mit mehreren Kulturen derselben Spezies.

Polygen: Immunisierung mit verschiedenen Stämmen einer Gruppe, deren völlige Gleichartigkeit nicht erwiesen ist.

Poikilogen: Immunisierung mit verschiedenen Stämmen, deren Ungleichartigkeit sicher erwiesen ist.

Monother: Das Serum stammt von einem Tier.

Polyhomöother: Das Serum stammt von mehreren Tieren der gleichen Spezies.

Poikilother: Das Serum stammt von verschiedenen Tieren verschiedener Spezies.

Homogene und nichthomogene Flüssigkeiten.

Man hat wohl gemeint, bei der Erzeugung von bakteriellen Antikörpern streng zwischen der Immunisierung mit den Leibern der Bakterien und der Immunisierung mit der durch Filtration von körperlichen Bestandteilen freien Kulturflüssigkeit oder Aufschwemmung unterscheiden zu können. Es enthält aber jede Kulturflüssigkeit, in der Bakterien gewachsen sind, abgestorbene Bakterienleiber (Gotschlich-Weigang) in großer Menge, enthält ebenso Auflösungsprodukte dieser abgestorbenen Leiber. Dieser normale Auflösungsprozeß läßt sich, wie noch zu beschreiben ist, außerordentlich steigern, es ist aber von vornherein wahrscheinlich, daß auch die Qualität des Auflösungsprozesses beeinflußbar ist, daß also die Auflösungsprodukte auch nach der Züchtung und nach der Art der Auflösung qualitativ verschieden sind. Die verschiedenen Arten der Antigenherstellung unterscheiden sich in manchen auch prinzipiellen Punkten; ob aber homogene oder nichthomogene Flüssigkeiten benutzt werden, ist seit den grundlegenden Arbeiten von Roux und Chamberland nichts prinzipiell Neues; es ist klar, daß man im allgemeinen danach streben wird, mit homogenen Flüssigkeiten zu immunisieren, da ja körperliche Elemente der Resorption größere Schwierigkeiten bereiten.

Die gebräuchlichsten Mittel zur Entfernung der korpuskulären Elemente sind das Zentrifugieren und das Filtrieren. Die Zentrifuge ist das schonendste, aber auch unsicherste Mittel zur Herstellung homogener körperfreier Flüssigkeiten. Wir haben noch keine Zentrifuge im Gebrauch gesehen, mittelst deren es gelingt, alle toten oder gar lebenden Keime aus der Kulturflüssigkeit auszuschleudern. Selbst bei scheinbar klarstem Aussehen des Abgusses zeigt das Kulturverfahren, wofern lebende Keime verwendet werden, leicht die in dem Abguß noch vorhandenen Keime und bei toten Kulturen läßt eine sorgfältige mikroskopische Untersuchung, am besten im hängenden Tropfen, dasselbe erkennen. Es ist deshalb die Zentrifugiermethode zur Entscheidung rein theoretischer Fragen, welche über die Wirkung völlig körperfreier Flüssigkeiten Aufschluß geben sollen, nicht ausreichend, sie ist ebensowenig allein anwendbar, wenn lebende stark pathogene Bakterien ausgeschleudert werden sollen, um den Abguß immunisatorisch, z. B. beim Menschen, zu gebrauchen. Aber sie ist vorzüglich da am Platze, wo für praktische Immunisierungen eine fast körperfreie Flüssigkeit gewünscht wird. Wir benutzen für kleine Flüssigkeitsmengen die vorzügliche Theleniussche Zentrifuge (Mechaniker Wötzel, Soden a. T.), welche 4000 bis 5000 Umdrehungen macht, für etwas größere Mengen die kleine Runnesche elektrische (Gleichstrom-) oder Wasserzentrifuge (etwa 4 Atm. Druck), deren Umdrehungszahl durchschnittlich 1800 beträgt; für große Mengen benutzen wir eine große elektrische Zentrifuge von F. & M. Lautenschläger. Man kann das Zentrifugieren in manchen Fällen durch Zusatz kleinster Mengen eines agglutinierenden Serums außerordentlich erleichtern und braucht dazu nicht einmal immer ein künstlich hergestelltes Immunserum, da einzelne Normalsera manche Bakterienarten

recht hochgradig agglutinieren. Man bedenke dabei aber, daß durch den Zusatz des wirksamen Serums auch in der Flüssigkeit freie Antigene besetzt werden. Weniger empfiehlt sich der Zusatz fein verteilter Substanzen oder die chemische Erzeugung von Fällungen und Niederschlägen; denn diese fein verteilten Substanzen haben stark adsorbierende Eigenschaften. Es würde damit das Zentrifugieren ziemlich auf ein Filtrieren herauskommen.

Die Filtration ist das sicherste Mittel zur Entfernung körperlicher Teilchen. Sie ist aber eine viel eingreifendere Methode als das Zentrifugieren wegen der Adsorptionserscheinungen, die gerade bei eiweißhaltigen und eiweißartigen Substanzen eine so große Rolle spielen. Und für diese Oberflächenanlagerungen kommt nicht nur die Größendifferenz zwischen Filterpore und zu filtrierendem Gegenstand in Betracht, sondern auch die Länge und das Material der Filterkanäle. Schon durch das Zentrifugieren gehen sicherlich außer den körperlichen Elementen immunisatorisch wertvolle Bestandteile verloren, denn wir wissen, wie leicht Bakterien manche Stoffe, z. B. Komplemente des Serums adsorbieren. Bei der Filtration aber summieren wir die Adsorption durch die Bakterien und die durch den Filterkanal und werden uns deshalb über Verlust an gelösten oder halbgelösten Substanzen nicht wundern dürfen. Zur Technik der Filtration sei nur soviel bemerkt, daß ein vorheriges Zentrifugieren oder ein Filtrieren durch Papier die Kerzenfiltration erleichtert und schon deshalb zu empfehlen ist. Die verschiedenen Filterkerzen und Filterverfahren (unter negativem Druck, unter positivem Druck, durch Gelatinefilter etc.) werden im speziellen Teil der Technik behandelt werden. Wir selbst benutzen im allgemeinen für etwas größere Flüssigkeitsmengen die Reichel-Kerzen in der Lautenschlägerschen Ausstattung, für kleinere Mengen die Chamberland-Kerze F des Instituts Pasteur, für ganz kleine Mengen die Silberschmidtschen Mikrofilter.

Abtötung durch Hitze.

Die Anwendung entsprechender Temperaturen ist das einfachste und das am längsten angewendete Mittel, um einen Impfstoff von lebenden Keimen zu befreien; aber der Hitze kommt außer der Abtötung sicherlich noch eine andere Bedeutung zu. Sie bewirkt eine Aufschließung der Bakterienkörpersubstanzen, die damit leichter resorbirbar und assimilirbar werden. Und es ist möglich, daß die Hitze dabei nicht nur beschleunigend auf die auch sonst erfolgende Auflösung wirkt, sondern daß direkt durch die Hitze neue Faktoren der Auflösung in Wirksamkeit treten. Seit dem wir wissen (Müller und Jochmann)[44]) daß die Leukocyten bei 55° ein peptisches Vermögen entfalten, das ihnen sonst in dem Maße nicht zukommt, wird die Verwendung solcher Temperaturen auch von diesem Standpunkt aus für die Bakterienauflösung rationell erscheinen. Ja es mag sein, daß erst durch die Hitze manche Substanzen des Bakterienleibes zu Antigenen werden. Es ist jedenfalls durch vielerlei Untersuchungen festgestellt, daß die Immunisierung mit erhitzten Bakterien quantitativ der Immunisierung mit lebenden Bakterien häufig nicht nachsteht; dagegen scheinen die Antigene durch die erhöhte Temperatur eine qualitative Änderung zu erfahren, derart, daß die Antikörper, welche mit erhitzten Antigenen erzeugt werden, nicht den Antikörpern, welche mit nativen Antigenen hervorgerufen werden, völlig gleichen. Daß die Erwärmung den Bakterieninhalt reichlicher in

Lösung gehen läßt, geht daraus hervor, daß erwärmte und geschüttelte Kulturen in der zentrifugierten oder filtrierten Flüssigkeit reichliche Mengen von Antigen zeigen, während die abzentrifugierten und gut gewaschenen Leiber viel schwächer immunisatorisch wirken. (Buxton und Torrey[10]) ferner de Rossi[56]).

Bei der Abtötung durch Hitze wird man natürlich die zur Abtötung gerade notwendige Wärmeinwirkung wählen, um nicht durch übermäßige Erhitzung den Impfstoff unnötig zu schädigen. Allgemein giltige Angaben lassen sich nicht machen, da sporenhaltiges Material sich anders verhält als sporenloses und da auch die einzelnen Bakterienarten recht verschieden thermoresistent sind (z. B. Tuberkelbazillen einerseits, Meningokokken andererseits). Die einfache Erwärmung im Reagensglas durch Einstellen einer Agarkulturaufschwemmung oder einer Bouillonkultur in das Wasserbad ist zur sicheren Abtötung aller Keime unzuverlässig, weil Flüssigkeitsspritzer an dem aus dem Wasser herausragenden Teil des Reagensglases der Erwärmung entgehen und so lebende Keime enthalten können. Für größere Flüssigkeitsmengen empfiehlt sich deshalb mehrstündige Erwärmung im entsprechend temperierten Wärmeschrank unter Anwendung eines Schüttelapparates; für kleinere Mengen genügt es, wenn die Flüssigkeit in ein Fläschchen gegoßen wird, das — sofern es sich um Temperaturen bis etwa 70° handelt — mit Kork und Siegellack verschlossen, beschwert und dann in das entsprechend erwärmte Wasserbad völlig versenkt wird. Auch hier ist öfteres Umschütteln ratsam. Es ist ferner zweckmäßig den Korken erst aufzusetzen, nachdem das Fläschchen etwas angewärmt ist, da sonst die durch die Erwärmung ausgedehnte Luft den Korken heraustreibt. Recht zweckmäßig für kleine Flüssigkeitsmengen sind die versenkbaren, starkwandigen Reagensgläser mit Patentgummiverschluß von Leune (Paris, Rue du Cardinal-Lemoine 28b). Von der Sterilität der erwärmten Kultur hat man sich jedesmal durch Überimpfen einiger Tropfen in Bouillon zu überzeugen. Vaccins, welche für die Anwendung beim Menschen bestimmt sind, wird man erst einen oder mehrere Tage zur Anreicherung im Brutschrank lassen und dann erst durch Überimpfen auf Sterilität kontrollieren, und in manchen wichtigen Fällen genügt auch dieser Sterilitätsbeweis noch nicht: es muß der Tierversuch angestellt werden. Um einen gewissen Anhalt über die notwendigen Temperaturen zu haben, seien hier einige Zahlen aus der Praxis mitgeteilt. Für Choleravibrionen genügt 1 Stunde 58° (Kolle), für Typhusbazillen wendet Kolle 1 Stunde 60°, Wright $^1/_2$ Stunde 60° an. Für Pest wird eine Stunde 65° angegeben, für Ruhr wählt Kruse 1 Stunde 55°, Kikuchi 44° (und nachfolgende Abtötung überlebender Keime durch Chloroform). Lignières[34]) erhitzt Hühnercholerabazillen für 5 Tage auf 42—43°. Es ist im allgemeinen zur sicheren Abtötung richtiger, die Zeit zu verlängern, aber die Temperatur möglichst niedrig zu wählen. Wir wählen gewöhnlich 1 Stunde 57°. Im übrigen lassen sich auch mit hocherhitzten Bakterien Immunstoffe erzeugen, wenn auch viel weniger reichlich; und wirklich schützende Stoffe wird man so kaum erzielen. Immerhin hat z. B. Gengou[25]) mittels des Komplementablenkungsverfahrens im Serum von Meerschweinen, die mit abgetöteten Tuberkelbazillen (100° 5 Minuten) immunisiert waren, einen Immunkörper nachgewiesen. Malvoz (zitiert bei Defalle) und Defalle[18]) haben gezeigt, daß man Hefen und Sporen von Bakterien auf 115° erhitzen und damit noch Immunprodukte erzielen kann.

Die mit hocherhitzten vegetativen Formen der Bakterien angestellten Versuche erstreckten sich fast ausschließlich auf die Agglutination und sie betrafen die Frage, ob Bakterien, welche durch Erhitzung inagglutinabel gemacht sind (z. B. bei 75°), auch nicht mehr agglutinogen sind. Es hat sich dabei gezeigt, daß man mit inagglutinablen Bakterien sehr wohl Agglutinin hervorrufen kann. In dieses theoretisch wichtige Gebiet gehören auch die Versuche von M. Neisser und Lubowsky[45]) über die Frage, ob mit agglutinierten Bakterien noch ein Agglutinin zu erzeugen sei. Die Antwort läßt sich dahin geben, daß, wofern die Agglutination mit einem sehr großen Überschuß von Agglutinin und wiederholt vorgenommen wurde, die abzentrifugierten und mit dem Agglutinin völlig gesättigten Bakterien gar nicht oder fast gar nicht mehr agglutinogen sind. Was für die durch Hitze inagglutinabel gemachten Bakterien gilt, ist auch für Bakterien, die durch Säure inagglutinabel gemacht sind, zutreffend. So hat A. Wassermann[65]) mit $^{n}/_{10}$ Salzsäure Bakterien inagglutinabel gemacht, aber mit solchen Bakterien gleichwohl Agglutinin hervorrufen können.

Abtötung durch chemische Mittel.

Nächst der Abtötung durch Hitze käme die Abtötung durch chemische Mittel in Betracht. Der erste Versuch dieser Art stammt von von Behring[4]), welcher Diphtheriebazillen mit Jodtrichlorid abtötete und damit immunisierte. Je weniger das chemische Mittel die Antigene selbst alteriert, um so brauchbarer wird es zur Erzeugung von Antikörpern sein. In diesem Sinne sind neuere Angaben von E. Levy[30]), sowie von E. Levy und Franz Blumenthal[31]) und von E. Levy, Franz Blumenthal und A. Marxner[32]) von Interesse. Danach sterben die gewöhnlichen Bakterienarten bei 37° in 50%iger Traubenzuckerlösung in 2 bis 4 Tagen, in 25%iger Galaktoselösung in 4—6 Tagen, in 80%igem Glyzerin in etwa 2 Tagen, in 25%igem Harnstoff in 1 Tag ab. Es handelt sich dabei vermutlich um plasmolytisches Absterben infolge großer osmotischer Differenzen. Die erwähnten Verfasser wandten diese Mittel in Kombination mit dem Schütteln an und trockneten schließlich die gewonnenen Massen im Vacuum zu Pulverform; Messungen der damit erzielten Antikörper liegen noch nicht vor; die Verfasser benutzten diese Methoden bisher nur zur Erzeugung von aktiven Immunitäten.

Die bekannten Desinfektionsmittel werden ebenfalls zur Abtötung benutzt; man nimmt im allgemeinen möglichst geringe Dosen und längere Zeiteinwirkung, z. B. Zusatz des 40%igen Formalins im Verhältnis 1 : 100 und 24stündiges Stehen bei 37° oder Zusatz von 10%iger Karbolglyzerinmischung (10 acid. carbol. crist., 80 aq. dest., 20 Glyzerin) im Verhältnis 1:20, oder langes Schütteln und Stehenlassen (24 Stunden) mit Toluol. Gasförmig werden Äther und Chloroform verwendet. Durch entsprechende Erwärmung lassen sich die letzten beiden Mittel nach der Abtötung wieder aus der Flüssigkeit entfernen. Nach den Erfahrungen von Friedberger und Moreschi (l. c.) sind die durch Chloroform abgetöteten Bakterien zur Erzeugung von Agglutininen nicht gut brauchbar, wohl aber zur Erzeugung von Lysinen. Es ist dabei auffallend, daß die Wirksamkeit der durch Chloroformdämpfe abgetöteten und fast unwirksamen Bakterien wiederkehrt, wenn man die chloroformierten Aufschwemmungen einige Tage bei 37° stehen läßt.

Auflösung durch Wasser und Autolyse.

Die Auflösung der Bakterien in der Kulturflüssigkeit erfolgt, wie erwähnt, hauptsächlich dadurch, daß enorme Bakterienmengen beim Wachstum der Kultur zugrunde gehen und dadurch die toten Leiber in dem schwach alkalischen oder neutralen Flüssigkeiten mehr oder weniger vollständig der Auflösung anheimfallen. Je älter die Kultur wird, um so stärker ist der Absterbevorgang, um so reichlicher die Auflösung. Aus der bekannten Arbeit von Gotschlich und Weigang[27]) geht hervor, daß z. B. eine schräge Agarkultur von Choleravibrionen nach 44 Stunden nur noch etwa 12%, nach 68 Stunden nur noch etwa 3% derjenigen Vibrionenmenge lebend beherbergt, die nach 20 Stunden lebend vorhanden war. Nächst der Verwendung älterer Kulturen hat man in der Erhitzung ein Mittel, um die Auflösung zu beschleunigen. Natürlich müssen Temperaturen gewählt werden, welche die Antigene möglichst wenig schädigen. Bereits 1897 hat Rodet Bouillonkulturen nach 8 bis 9tägigem Wachstum für 2—3 Stunden bei 55° erhitzt und dann filtriert. Im Prinzip davon nicht verschieden ist das Verfahren von M. Neisser und Shiga[46]), welche eintätige Agarkulturen in je 10 cc physiol. Kochsalzlösung aufschwemmten, 1 Stunde bei 60° erhitzten, 2 Tage bei 37° stehen ließen und dann durch Reichelkerzen filtrierten. In dieser wasserklaren, sehr wenig giftigen Flüssigkeit wiesen die erwähnten Autoren die Antigen-Anwesenheit nicht nur dadurch nach, daß damit reichliche Mengen Antikörper erzeugt werden konnten, sondern sie zeigten durch direkte Bindungsversuche, daß diese Flüssigkeiten Antikörper zu binden vermögen, also „freie Rezeptoren" der Bakterien enthalten. A. Wassermann[64]) hat dieses Verfahren in 2 Punkten modifiziert. Einmal nimmt er anstatt der von M. Neisser und Shiga benutzten physiologischen Kochsalzlösung destilliertes Wasser, um damit auf plasmolytischem Wege eine stärkere Auflösung des Bakterieninhalts zu erreichen; ferner trocknet er sein klares Filtrat im Vacuum und gewinnt ein grauweißes Pulver, das sich in Glasröhrchen eingeschmolzen gut konservieren läßt. Sein Verfahren ist das folgende: 30 cc aqua dest. pro 1 Massenkultur werden 24 Stunden bei 60° erhitzt und 5 Tage bei 37° gehalten. Nach der Kerzenfiltration erfolgt die Trocknung. Bassenge und Rimpau[3]) wollen die Auflösung noch durch dauernde Verwendung des Schüttelapparates beschleunigen. M. Mayer[41]) schüttelte Choleravibrionen in destilliertem Wasser (5 cc auf 1 Agarröhrchen) 6 bezw. 48 Stunden lang bei 15° und filtrierte durch Pukallfilter. Brieger und Mayer[6]) erreichten auf demselben Wege für Typhusbazillen gute immunisatorische Resultate.

Ein anderes Prinzip der Auflösung beruht auf der Autolyse. Schon lange ist die Selbstvergärung bei der Hefe bekannt; für Bakterien haben wohl zuerst Emmerich und Löw[20]) auf die Selbstauflösung des Pyocyaneus durch seine eigenen Stoffwechselprodukte aufmerksam gemacht, die ja auch für Pneumokokken späterhin oft betont worden ist. Dieser Vorgang, der wohl bei allen Bakterienarten in verschieden hohem Grade auftritt, ist beim Pyocyanens besonders stark ausgeprägt und Emmerich und Löw haben die Pyocyanase für die Auflösung der verschiedensten Bakterienarten verwendet. Anfangs gaben sie Bouillon, später[21]) folgende Nährlösung an: Aq. dest 1000, Asparagin 5,0, Natr. acetic 5,0 Bikaliumphosphat 2,0, Magnesiumsulfat 0,1, Chlornatrium 2,0. Das Verfahren ist das folgende: Es wird 5—6 Wochen bei Zimmertemperatur kultiviert, zuletzt mehrmals täglich gründlich geschüttelt; dann läßt man die Kultur

24 Stunden ruhig stehen, saugt von Bodensatz ab, filtriert durch Berkefeldfilter und dampft im Vacuumapparat bei 20—36° auf $^1/_{10}$ oder mehr des Volumens ein und dialysiert 12—14 Stunden. Weiterhin werden 0,25—0,3% Trikresol zugesetzt; so bleibt die Flüssigkeit ev. wochenlang stehen, damit jede Spur Giftigkeit schwindet. Autolytische Vorgänge benutzten dann E. Levy und F. Pfersdorff [33]) in folgender Form für die Gewinnung des Inhalts von Bakterienleibern. Agarplatten werden abgekratzt, mit der gleichen oder $1^1/_2$ fachen Menge destillierten Wassers versetzt und mit Natriumcarbonat schwach oder deutlich alkalisch gemacht. „In einigen Fällen, bei Bakterien, die Säure entwickeln, kann es zweckmäßig sein, einen Teil der Gemische zu neutralisieren oder ganz schwach anzusäuern. Die so gewonnene Emulsion wurde in ein luftdicht verschlossenes Gefäß übergegossen, mit Toluol versetzt, resp. überschichtet und in den Brutofen bei 37° auf 4—5 Wochen gebracht.“ Conradi [15]) hat im Anschluß an seine Untersuchungen über Autolyse der Organe kurzdauernde Autolyse (48 Stunden) verwendet und verfährt folgendermaßen [16]): „Etwa 10 beschickte Doppelschalen stellt man für 20 Stunden in den Brutschrank bei 37° und öffnet sie nach dieser Zeit durch behutsames Erwärmen des Paraffins. Mit Hilfe eines sterilen Nickelspatels wird nun der Bakterienrasen sämtlicher Schalen vorsichtig abgekratzt und mittelst steriler Pravaz'scher Spritze mit weiter Öffnung aufgesogen. Danach wird das ganze zähflüssige Bakterienmaterial auf mehrere enge sterile Zentrifugierröhrchen verteilt. Man fügt jetzt jedem Röhrchen soviel 0,85 Proz. sterile Kochsalzlösung hinzu, daß diese $^2/_3$ der Gesamtmenge des Bakterienmaterials ausmacht. Dann werden die Zentrifugierröhrchen für 24 höchstens 48 Stunden in den auf 37,5° eingestellten Brutschrank verbracht. Nach dieser Zeit wird die überstehende, gelblich gefärbte, meist klare Flüssigkeit sorgfältig abpipettiert. Die vereinigten Flüssigkeitsmengen versetzt man nun mit der fünffachen Menge 0,85 Proz. Kochsalzlösung und filtriert sie durch Berkefeldsche Tonkerzen.*) Das Filtrat verbleibt solange im Eisschrank, bis seine Keimfreiheit durch Übertragung kleiner Mengen in Bouillonkölbchen festgestellt worden ist. Dann erst wird das Filtrat im Vacuumapparat je nach Ausbeute auf $^1/_{10}$—$^1/_{50}$ seines Volumens bei 35° eingedampft.“

Sicherlich läßt sich mit diesen Autolysaten nach Levy-Pfersdorff oder Conradi gut immunisieren, wenn auch direkte Angaben seitens dieser Autoren nicht vorliegen. Für manche Fälle dürften freilich diese Autolysate durch ihre Giftigkeit nicht verwendbar sein.

Auflösung durch chemische Mittel.

Seit langem hat man versucht, den Auflösungsprozess der immunisatorisch wirksamen Bakterienstoffe durch chemische Mittel zu beschleunigen. Robert Koch hatte bekanntlich 1890 das Glyzerin zur Extraktion des Tuberkulins aus den Tuberkellbazillen derart benutzt, daß er die bewachsenen Tuberkelbazillen-Bouillonkulturen, die ja 4—5% Glyzerin enthalten, bei 60° auf das 10fache eindampfte und auf diese Weise mit einer 40—50%igen Glyzerinlösung die Bakterien auszieht. Solche Glyzerinextrakte verschiedenster Bakterienarten sind dann auch späterhin

*) „Abgesehen von der Filtration durch Tonkerzen kann man auch eine — allerdings nicht unbedingt sichere — Keimfreiheit der Giftlösung durch lange fortgesetztes Zentrifugieren erzielen. Es ist jedoch erforderlich, die zentrifugierte Flüssigkeit stets der Einwirkung von Chloroformdämpfen auszusetzen, um etwa vorhandene Keime abzutöten.“

hergestellt und als Vaccins empfohlen worden (so z. B. von KLEMPERER für Pneumokokken 1891, von GABRITSCHEWSKY für Pestbazillen und Scharlachstreptokokken); zur Herstellung der hier in Betracht kommenden Antigene, deren Antikörper also als Agglutinine, Präzipitine oder Lysine nachweisbar sind, sind die Glyzerinextrakte im allgemeinen selten benutzt worden.

Von weiteren chemischen Lösungsmitteln sei das von ARONSON[1]) zuerst angewendete Äthylendiamin erwähnt. Sein Verfahren ist folgendes: Er trocknet Diphtheriebazillen, erhitzt 1 Stunde auf 55—60°, zerreibt sorgfältig und behandelt die Masse mit $^1/_{10}$ %iger Äthylendiaminlösung. WASSERMANN verfährt auf folgende Weise: Er trocknet 24 Stunden lang bei 60°, darauf bis zur scharfen Trocknung im Exsiccator, zerreibt fein im Achatmörser und extrahiert unter Schütteln mehrere Stunden mit $^1/_{10}$ %iger Äthylendiaminlösung (20 cc der Lösung auf 1 g Bazillenpulver); dann läßt er 24 Stunden stehen, filtriert oder zentrifugiert. — Vielfach sind natürlich die caustischen Alkalien als Lösungsmittel in Anwendung gekommen, wie noch zu beschreiben ist.

Schließlich sei noch auf das Verfahren von F. MEYER und BERGELL[42]) hingewiesen; um die Bakterienleiber löslich zu machen, wandten die Autoren die völlig wasserfreie, flüssige Salzsäure, die bei — 86° siedet, an. Die von Agarkulturen abgeschwemmten Bakterien werden auf der Zentrifuge gewaschen und im Vacuum unterhalb 40° gut getrocknet. Danach wird mit gut getrockneter, wasserfreier Salzsäure, die durch flüssige Luft kondensiert war, versetzt, die Salzsäure alsdann verdampft und der Rückstand mit Kochsalzlösung auf der Schüttelmaschine extrahiert und durch Berkefeldfilter filtriert.

Mechanische Verfahren.

Durch ROB. KOCH ist ein neues methodisches Prinzip in die Immunisiertechnik eingeführt worden, die Aufschließung der bakteriellen Leibessubstanzen durch mechanische Zerkleinerung. Man kann sich vorstellen, daß manche Bakterien durch ihre starke Hülle gegen die Auflösung durch chemische Agentien weitgehend geschützt sind; die außerordentliche Resistenz der Bakteriensporen gegen Säure, Farben etc. läßt erkennen, wie groß der Schutz durch eine starke Zellmembran sein kann. Wenn es gelingt, diese Hüllen der Bakterien zu zerreißen, wird der nachfolgende Auflösungsprozeß ungleich vollständiger sein. ROB. KOCH hat das Zerreiben der getrockneten Bakterien angewendet. Er trocknete Tuberkelbazillen und zerrieb sie sorgfältig im Achatmörser, eine freilich mühsame und nicht ungefährliche Arbeit. Seit dieser Zeit sind dann Kugelmühlen und andere Zerreibungsmaschinen für diesen Zweck angewendet worden. Die von der Firma F. & M. Lautenschläger z. B. hierfür in den Handel gebrachte Kugelmühle enthält eine Anzahl Tonkugeln von nicht zu geringem Durchmesser; das Optimum der Zerreibung wird erreicht, wenn nicht mehr als 60 Umdrehungen pro Minute erfolgen; es ist ferner darauf zu achten, daß keine zu starke Erwärmung eintritt (ev. durch Kühlung der ganzen Kugelmühle), damit die Antigene nicht geschädigt werden; und schließlich ist zu beachten, daß kleinste Tonteile sich immer von den Tonkugeln ablösen. Die Hauptmasse dieser Tonpartikelchen ist nicht schwer zu entfernen, sie aber vollständig zu entfernen ist schwer möglich. Auch sei wiederum an die Adsorptionseigenschaft dieser feinst verteilten Partikelchen erinnert.

Ein vielfach verwendetes mechanisches Hilfsmittel ist das Schütteln[37a]. Es gibt eine große Zahl von verschiedenen Schüttelapparaten, die elektrisch oder mit Wasserkraft oder durch kleine Heißluftmotore betrieben werden. Man schüttelt entweder die bakterienhaltige Flüssigkeit ohne weiteren Zusatz oder aber unter Hinzufügung von sterilen Glasperlen oder Sand oder dergleichen. Von F. & M. Lautenschläger stammt ein Schüttelapparat, der in den Brutschrank eingebaut ist und dauerndes Schütteln bei 37° ermöglicht. Das Schütteln ist auch angewendet worden, um in theoretisch wichtigen Versuchen die Geißeln der Bakterien von den Bazillenleibern zu trennen und damit ein Geißelagglutinin einerseits, ein Körperagglutinin andererseits, (Cilioagglutinin — Somatoagglutinin) herzustellen. Man wird dabei jedenfalls nicht zu intensiv schütteln dürfen, um nicht auch die Bakterienleiber zu reichlich zur Auflösung zu bringen. L. BRIEGER und F. MEYER[6]) haben gezeigt, daß einfache Schüttelextrakte, auch bei Zimmertemperatur hergestellt, immunisatorisch gut wirksam sind bei fehlender Giftigkeit.

E. BUCHNER[8]) stellte 1897 gemeinschaftlich mit M. HAHN[28]) die Zymase durch Zerreiben mit Kieselgur und Auspressen unter hohem hydraulischem Druck (400—500 Atmosphären) her. Aus 1 kg Preßhefe waren 500 cc Preßsaft, der sehr stark albuminhaltig war, zu gewinnen. MARTIN HAHN[28]) verwandte dieses Verfahren, um Vaccins aus Choleravibrionen, Typhusbazillen, Tuberkelbazillen etc. herzustellen; er zerrieb z. B. Typhusbazillen mit Kieselgur und Quarzsand, verarbeitete die Masse mit 20% Glyzerin und Kochsalzlösung bis zur Teigkonsistenz, preßte mit der BUCHNERschen Presse aus und erhielt so gelbliche „Plasmine". Eine 1 malige Einspritzung von 1 cc rief sehr starke Agglutininbildung hervor. MACFADYAN und ROWLAND[39]) schwemmen Typhusagarkulturen mit kleinen Kochsalzmengen ab, zentrifugieren in einem zylindrischen Gefäß (14,5 × 8 cm) bei 18 000 Umdrehungen pro Minute und waschen auf diese Weise mehrfach; den Bodensatz mischen sie mit feinem sterilen Silbersand und bringen das Gemisch in einen stark gekühlten Zylinder für 3—4 Stunden, der in schnelle Umdrehungen (5000 Touren pro Minute) versetzt wird; das so behandelte Gemisch wird unter hydraulischem Druck durch Kieselgur gepreßt. Später beschreiben die Verfasser[40]) ausführlich ein Verfahren, bei welchem die Bakterien zunächst ebenfalls gewaschen und dann getrocknet werden; das Trocknen machen sie auf der Außenseite einer Chamberlandkerze, durch deren Innenraum sie Luft saugen. Der abgeschabte Trockenrückstand wird ohne Zusatz von Silbersand durch flüssige Luft bei — 180 bis — 190° hart gefroren, und in diesem Zustand mit einer besonderen Maschine, welche sie abbilden, fein gemahlen. Zum Schluß wird der so gewonnene Brei noch einmal scharf zentrifugiert und nun die klare Flüssigkeit benutzt. Neueste Verbesserungen an dieser Maschine sollen es möglich machen, daß beim Zerreiben Verstauben des lebenden Materials nicht vorkommen kann. Es scheint, daß auf diese Weise besonders wirksame Vaccins gewonnen werden.

Schließlich hat LÖFFLER ein Verfahren angegeben, das an Einfachheit nichts zu wünschen übrig läßt und darauf basiert, daß auch selbst sehr labile Fermente dann durch Hitze nicht geschädigt werden, wenn ihnen zuvor das Wasser vollständig entzogen wurde. Dementsprechend trocknet LÖFFLER[36]) Bakterien, soweit es sich nicht um sporentragendes Material handelt, für 2—3 Stunden bei 120° und erhält so etwa 18—30 Proz. Trockensubstanz; die trockene Masse wird zu feinem Pulver zerrieben und in physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt; mit solchem Material sind Agglutinine, Präziptine und Lysine erzeugbar.

Die Brauchbarkeit des Löfflerschen Trocknungsverfahrens ist unter anderem von Friedberger und Moreschi dargetan, welche die verschiedenen Arten der Antigendarstellung inbezug auf ihre Fähigkeit, Antikörper hervorzurufen, verglichen. Mit dem Löfflerschen Verfahren gelangten die Verfasser zu besonders guten immunisatorischen Resultaten. In derselben Arbeit berichten die Autoren[24]) über ein anderes mechanisches Verfahren, nämlich über das wiederholte Einfrieren und Auftauen von Bakterien. Da dieses Verfahren allein bekanntlich zur Abtötung der Bakterien nicht führt, so wurde vorherige Hitzeabtötung angewendet, und das wiederholte Einfrieren und Auftauen sollte nur zur besseren Aufschließung des Bakterieninhaltes dienen. Die Versuche zeigten aber, daß dies Verfahren keine Vorteile bietet. Neuestens hat Perrone[50]) lebende Kulturen für 12 Stunden bei — 15° bis — 17° eingefroren und damit sehr erhebliche Agglutinine hervorgerufen.

Auflösung durch tierische Säfte.

Schließlich hat man als Auflösungs- bezw. Extraktionsmittel statt der Chemikalien auch dem Tierkörper entstammende Stoffe benutzt, indem man von der Anschauung ausging, daß eine derartige Auflösung die dem Tierkörper adaequatesten Antigene in Freiheit setze. Die ersten derartigen Versuche stammen wohl von Roux und Chamberland[11]), welche gegen malignes Ödem mit dem filtrierten Ödem von Tieren, die dieser Krankheit erlegen waren, impften. Kleine Mengen genügten bereits, um eine Schutzwirkung zu erzeugen, große Mengen waren giftig. Neufeld[47]) gab dann 1900 die interessante Tatsache an, daß Pneumokokken durch Galle sehr schnell aufgelöst würden; mit diesen aufgelösten Kulture ließ sich gut und gefahrlos immunisieren. Schließlich hat Bail in den letzten Jahren wiederum die Exudate oder Ödeme von Tieren, die der experimentellen Infektion mit dem betreffenden Bakterium erlegen waren, zur Immunisierung mit gutem Erfolg benutzt. Für Immunisierung mit Hühnercholera- oder Milzbrandbazillen scheinen die Ödeme, für Immunisierung mit Dysenteriebazillen die Exudate besonders wirksam zu sein. Bails Schüler Kikuchi[29]) gibt für die Gewinnung des Dysenterie-Immunstoffes folgendes Verfahren an: Meerschweine werden durch intraperitoneale Injektion von lebenden Dysenterie-Bazillen getötet, das Exudat mehrerer Tiere gesammelt, 4 Stunden zentrifugiert, mit einigen Tropfen Toluol geschüttelt, 4 Stunden im Eiskasten gelassen; danach wird die Flüßigkeit abgesaugt und in offene Schalen zur Verdunstung des Toluols ausgegossen. Jedesmal ist Prüfung auf Sterilität nötig, um sich zu vergewissern, ob alle Keime abgetötet sind. Diese Flüssigkeiten sind durch Zentrifugieren von fast allen Bakterienleibern zu befreien, aber es ist auch für die praktischen immunisatorischen Zwecke nicht nötig, daß alle Bakterienleiber entfernt sind. Weil[69]) gibt für das Hühnercholera-„Agressin" folgendes Verfahren an: Meerschweinchen werden durch intraperitoneale Injektion kleiner Mengen des Hühnercholera-Bazillus (1 Tropfen Bouillonkultur + 5 cc Bouillon) getötet; das Exudat wird durch Papierfiltration etwas geklärt und unter Zusatz von $1/2$ % Carbolsäure zentrifugiert, dann 3 Stunden auf 44° erhitzt, wobei diese Temperatur nicht überschritten werden soll. Man erhält so meistens sterile Exudate, deren Sterilität aber erst erwiesen werden muß. A. Wassermann und Citron[67]) (s. auch Citron[14]) haben dann dieselben immunisierenden Substanzen aus den Bakterien extrahiert, außerhalb des Tierkörpers, indem sie Agarkulturen in Kaninchen-

serum abschwemmten (10—12 cc Serum für 1 Kolle-Schale) gegen Licht geschützt in den Schüttelapparat brachten und bei Zimmertemperatur 1—3 Tage schüttelten. Danach wurde carbolisiert ($^1/_2$ % Phenol), klar zentrifugiert und 3 Stunden auf 44° erhitzt. Auch mit solchen Extrakten sind gute immunisatorische Wirkungen erzielt worden. Man kann auch zu weiterer Immunisierung von Ziegen, die bereits eine künstliche Grundimmunität besitzen, das frisch abgelassene Blut oder Serum dieser Tiere zur Bakterienextraktion verwenden.

Ausfällungsmethoden.

An die Extraktionsmethode wären dann die Ausfällungsmethoden anzuschließen, die meistens mit Extraktion verbunden sind. Schon Rob. Koch hat Alkoholfällungen seines Tuberkulins zur Immunisierung benutzt. Rodet und Courmont[53]) haben aus Staphylokokkenkulturen durch Alkoholfällung immunisierende Substanzen hergestellt. Wheeler[70]) und Vaughan[62]) wandten eine verdünnte Lösung von Natriumhydroxyd in absolutem Alkohol an, um bei Extrahierung von Colibazillen die giftigen Substanzen von den immunisierenden zu trennen. Der giftige Anteil löste sich im alkalischen Alkohol, der ungiftige, immunisierende blieb zurück. H. Buchner[9]) hat dann aus den Bakterien Albuminate hergestellt, deren Herstellungsweise den später als Vaccins benutzten Antigenen im wesentlichen gleich ist. Buchner digerierte mit schwacher Kalilauge auf kochendem Wasserbad und fällte durch Ansäuerung. Der bekannteste Typus dieser Art von Vaccins ist der Impfstoff von Lustig und Galeotti[38]). Sie versetzten Pestagarkulturen mit 0,75 %iger bis 1 %iger steriler Kalilauge für 10—24 Stunden bei 10—20°, filtrierten durch Papier unter Luftdruck und säuerten vorsichtig mit 1 %iger Essigsäure (oder auch Salzsäure) an. Der flockige Niederschlag wird abfiltriert, gründlich gewaschen und in schwacher Natriumcarbonat-Lösung gelöst; diese Lösung kann schließlich, allerdings mit Verlust von wirksamen Substanzen, durch Chamberlandkerzen filtriert werden. Außer der Essigsäure haben Lustig und Galeotti Ammoniumsulfat nach vorheriger Neutralisierung der alkalischen Bakterienlösung angewendet, indem sie mit der gesättigten Ammoniumsulfatlösung fällten, dann filtrierten, mit der gesättigten Ammoniumsulfatlösuug wuschen und schließlich dialysierten. Sie bevorzugen aber die Ausfällung mit Essigsäure bezw. Salzsäure. Tavel stellte das Choleravaccin nach Lustig und Galeotti in folgender Weise her: (Siehe K. Schmitz[57a]). Die Agarschalen werden nach 3—4 tägigem Wachstum mit 1 %iger sterilisierter Kalilauge abgeschwemmt. Nach 2—3 Stunden erfolgt allmähliche Ansäuerung mit 1 %iger Essigsäure unter ständigem Rühren; man läßt absitzen, pipettiert ab, versetzt mit sterilem Wasser und wiederholt das, bis die Flüssigkeit nur noch ganz schwach saure Reaktion zeigt. Erst dann wird steril filtriert und bis zur völlig neutralen Reaktion gewaschen. Der Rückstand wird in Schalen gesammelt, im Vacuum getrocknet, pulverisiert und in 1 %iger Sodalösung kurz vor dem Gebrauch gelöst. L. Brieger[5a]) verwendete das Ammoniumsulfat zur Ausfällung von immunisierenden Substanzen der Bakterien in folgender Form: „Reinstes, kristallinisches Ammoniumsulfat in Substanz, welches seiner sauren Reaktion halber als solches für den vorliegenden Fall unbrauchbar ist, wird durch tropfenweisen Zusatz einer äußerst verdünnten Lösung von Ammoniumbikarbonat und ein wenig Am-

moniumkarbonat unter fortwährendem Schütteln soweit abgestumpft, daß das Magma schwach, aber deutlich alkalisch reagiert und ein ganz leichter Ammoniakgeruch wahrgenommen wird. Darauf gießt man die von der Oberfläche einer 3—4 Tage alten Typhusagarkultur sorgsam abgekratzten und mit destilliertem Wasser abgespülten, möglichst virulenten lebenden Typhusbakterien. Alsdann schüttelt man das Gemenge einigemale recht kräftig, wobei der leichte Ammoniakgeruch verschwindet. Ein Teil des Ammoniumsulfats muß ungelöst bleiben. Die Typhusbakterien ballen sich alsdann zusammen. Nach ruhigem Stehen während 1—4 Tagen im dunklen nicht erwärmten Raume werden die Bakterien abfiltriert, wobei das Hineingeraten von Salzteilchen vermieden werden muß. Der zwischen Fließpapier gut ausgepreßte Bakterienniederschlag wird in Wasser, dem einige Tropfen äußerst verdünnter Natronlauge sofort zugesetzt werden, suspendiert und dann im Schüttelapparat $^1/_2$ Stunde lang durchgeschüttelt. Es verteilen sich nun die zusammengeballten Bakterien allmählich gleichmäßig, wobei häufig genug die Reaktion sauer wird. Durch sorgfältige Überwachung muß aber darauf geachtet werden, daß die ganze Masse sehr schwach alkalisch bleibt, weil sonst leicht das aktive Prinzip zerstört wird. Nachher werden die Bakterien abzentrifugiert und die zurückbleibende gelblich transparente Flüssigkeit wird zweimal hintereinander durch zuverlässige gut ausgekochte Pukallfilter gejagt.“ Die Immunisierung damit ergab (A. Schütze[59]) mäßig gute Agglutininproduktion, keine bakteriolytischen Stoffe. L. Brieger und H. Mayer[7]) veränderten dann das Verfahren in folgender Weise: „Da unsere Prüfung ergeben hatte, daß ein 3—4tägiges Verweilen in conc. alkalischem Ammoniumsulfat nicht genügte, um die Bakterienleiber so zu mazerieren, daß bei der weiteren Behandlung eine vollständige Abgabe der spezifischen Substanz erfolgte, entschlossen wir uns, das Bakterien-Salzgemisch bei 37° mehrere Wochen lang stehen zu lassen. Hierbei war eine tägliche Kontrolle der Reaktion nötig, und sobald sich Säuerung zeigte, wurde mit ganz verdünnter Bikarbonatlösung nachalkalisiert. Nach 8—14tägigem Stehen zeigte sich ein Zusammenballen der Bakterienmassen, nach 3—4 Wochen waren alle Bakterien abgestorben, keine beweglichen Individuen mehr nachzuweisen. Zur Verarbeitung gelangte in jedem Versuch der Bakterieninhalt von 5—8 Kolleschen Schwaden nach dreitägigem Wachstum. Wir ließen die Kolben 8—10 Wochen stehen, dann filtrierten wir die Bakterien durch gehärtete Filter von der Salzlösung ab. Wir brachten daher den Niederschlag in 20—30 cc destilliertes Wasser, welches mit äußerst verdünnter Sodalösung gerade sichtbar alkalisiert wurde, schüttelten dann 1—2 Stunden im Schüttelapparate und ließen dann das Gemisch so lange im Brutschrank bei 37° stehen, bis die Autolyse vollständig eingetreten war. Dies war meist nach 3 Tagen der Fall. Es zeigten sich dann unter dem Miskroskope keine Bakterien mehr, nur noch spärliche Körnchen von Bakterientrümmern; daraus hergestellte Ausstriche auf Agar blieben steril. Die Flüssigkeit war gelbbraun, etwa zähflüssig. Vom 2. Tage ab zentrifugierten wir noch weitere 3 Tage lang täglich eine halbe Stunde in der großen Zentrifuge den Niederschlag von Bakterientrümmern und Nährbodenresten ab und setzten dann die Lösung behufs Schutz vor Fäulnis sehr vorsichtig Chloroformdämpfen aus. — Bedeutend höhere Werte erreichten wir, wenn wir die nicht filtrierten, aber durch häufiges Zentrifugieren sicher von Bakterienleibern ganz befreiten und behufs Konservierung Chloroformdämpfen ausgesetzten Extrakte Kaninchen intravenös injizierten.“

Schließlich ist immer wieder versucht worden, aus den Organen infizierter bezw. einer Infektion erlegener Tiere Vaccins zu gewinnen, und die beschriebenen physikalischen oder chemischen Methoden zur Antigengewinnung aus Kulturen sind fast ausnahmslos auch für eine Antigengewinnung aus Organen benutzt worden. Besonders wichtig ist dabei, daß der Impfstoff während der Verarbeitung nicht durch andere Bakterienarten verunreinigt wird; für solche Zwecke dürfte vielleicht das Löfflersche Trocknungsverfahren am geeignetsten sein.

Literatur.

1) Aronson, Archiv für Kinderheilk., Bd. XXX.
2) Ascher, Centralbl. für Bakt., Bd. XIX, Nr. 4.
3) Bassenge und Rimpau, Festschrift. R. Koch (Fischer, Jena) 1903.
4) Behring, Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
5) Bloch, H., Beiträge zur Bakterienflora der Straßburger Wasserleitung. Inaug.-Diss. Straßburg 1903.
5a) Brieger, L., Deutsche med. Wochenschr. 1902, pag. 477.
6) Brieger, L., und Mayer, M., Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 27.
7) Dies., Deutsche med. Wochenschr. 1903, pag. 309.
8) Buchner, E., Bericht der Chem. Gesellsch. 1897, pag. 117 u. 1110. Patentschrift Nr. 99 508.
9) Buchner, H., Berl. klin. Wochenschr. 1890, Nr. 30.
10) Buxton and Torrey, Journ. of med. Res., April 1906.
11) Chamberland et Roux, Annales de l'Institut Pasteur, Tome I.
12) Chauveau. Ref. Baumgart 1889, Bd. V, pag. 535.
13) Cienkowsky, s. Handbuch Kolle-Wassermann, Artikel Milzbrand, Bd. V.
14) Citron. Zeitschr. für Hyg. 1906, Bd. LII, pag. 238.
15) Conradi, Hofmeisters Beiträge 1901, Heft 3 u. 4.
16) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1903, pag. 27.
17) Cruz, G., Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII, pag. 911.
18) Defalle, Annal. de l'Inst. Pasteur 1902, pag. 756.
19) Dorner, Inaug.-Diss. Königsberg 1905.
20) Emmerich und Löw, Zeitschr. für Hyg. 1899, Bd. XXXI.
21) Dies., Zeitschr. für Hyg. 1901, Bd. XXXVI, pag. 20.
22) Friedberger, Festschr. für v. Leyden, Bd. II.
23) Friedberger und Dorner, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII, pag. 544.
24) Friedberger und Moreschi, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXIX, pag. 453.
25) Gengou, Soc. de Biolog. 1906, pag. 218.
26) Gosio, Zeitschr. für Hyg. 1905, Bd. L, pag. 519.
27) Gotschlich und Weigang, Zeitschr. für Hyg. 1895, Bd. XX, pag. 286.
28) Hahn, M., Münch. med. Wochenschr. 1897.
29) Kikuchi, Archiv für Hyg. 1905, Bd. LII, pag. 381.
29a) Kolle, Deutsche med. Wochenschr. 1905, No. 12.
30) Levy, E., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIII, pag. 701.
31) Levy und Blumenthal, Franz, Med. Klinik 1906, Nr. 16.
32) Levy, E., Blumenthal, Fr., und Marxner, A., Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLII, pag. 265.
33) Levy, E., und Pfersdorff, Deutsche med. Wochenschr. 1902, pag. 879.
34) Lignières, Rev. vétérinaire, 1. VII. 1902.
35) Lipstein, Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV.
36) Löffler, Deutsche med. Wochenschr. 1904, pag. 913.
37) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1906, pag. 1240.
37a) Lubowski, Zeitschr. für Hyg. 1900, Bd. XXXV.
38) Lustig und Gaeotti, Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 15 und 19.
39) Macfadyan und Rowland, Centralbl. für Bakt. 1901. Bd. XXX, pag. 753.
40) Dies., Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV, pag. 618 u. 765.
41) Meyer, M., Deutsche med. Wochenschr. 1904, pag. 56.
42) Mayer, F., und Bergell, Med. Klinik 1906, Nr. 16.
43) Monti, Ref. Baumgarten, Bd. VI, pag. 523.
44) Müller-Jochmann, Münch. med. Wochenschr. 1906.
45) Neisser, M., und Lubowski, Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXX, pag. 483.

46) Neisser, M., und Shiga, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 4.
47) Neufeld, Zeitschr. für Hyg. 1900, Bd. XXXIV.
48) Ders., Zeitschr. für Hyg. 1903, Bd. XLIV, pag. 181.
49) Pane, Ref. Baumgarten, Bd. IX, pag. 41.
50) Perrone, Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLIII, Nr. 4.
51) Pfeiffer, R., Zeitschr. für Hyg., Bd. XI.
52) Otto, R., Die staatliche Prüfung der Heilsera. Fischer, Jena 1906.
53) Rodet et Courmont, Lyon médical 1890.
54) Roger, Ref. Baumgarten, Bd. V, pag. 168.
55) Römer, P., Graefes Arch. für Ophthalmologie, Bd. LIX.
56) Rossi, de, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVII.
57) Salmon and Smith, Proceedings of the Royal society of Washington 1886.
57a) Schmitz, K., Zeitschr. für Hyg. 1906, Bd. LII, pag. 1.
58) Schubert, Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1904.
59) Schütze, A., Deutsche med. Wochenschr. 1902, pag. 478.
60) Shiga, Berliner klin. Wochenschr. 1904, Bd. 4.
61) Trombetta, Ref. Baumgart. 1892, pag. 369.
62) Vaughan, Journ. of med. Res., November 1905.
63) Wassermann, A., Deutsche med. Wochenschr. 1902, pag. 785.
64) Ders., Festschrift für Rob. Koch (Fischer, Jena) 1903.
65) Ders., Zeitschr. für Hyg. 1903, Bd. XLII, pag. 267.
66) Ders., Zeitschr. für Hyg. 1904, Bd. XLVII.
67) Wassermann, A., und Citron, Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 28.
68) Wechsberg, Zeitschr. für Hyg. 1902, Bd. XXXIX.
69) Weil, Archiv für Hyg. 1905, Bd. LII, pag. 416.
70) Wheeler, Journ. Americ. med. Associat., April 1905.
71) Zelikow, Centralblatt für Bakt. 1906, Bd. VIIIL, pag. 476.

II.

Allgemeines über bakterielle Antigene-Toxine, deren Antikörper antitoxische Eigenschaften aufweisen.

Von

Thorvald Madsen

in Kopenhagen.

Die verschiedensten Mikroorganismen produzieren in künstlichen flüssigen Nährmedien Stoffe, welche auf den tierischen Organismus und bestimmte Gewebe schädigend einwirken. Diese spezifischen Produkte, welche zum Unterschiede von anderen giftigen Stoffwechselprodukten (Säuren, Basen, Spaltprodukten der Eiweißkörper etc.) bis heute chemisch nicht definierbar sind, werden Toxine genannt.

Die Wirkung tritt zumeist erst nach einer gewissen Latenzzeit ein, deren Dauer in hohem Maße von der Temperatur abhängig ist. Die Toxine, deren chemische Natur uns durchaus unbekannt ist, diffundieren langsam durch Membranen hindurch; sie sind meist thermolabil, indem sie eine Erwärmung auf mehr als 50—60° schlecht ertragen. Ihr wichtigstes Merkmal ist, daß sie Antigene sind, d. h. daß sie nach Injektion in den tierischen Organismus spezifische Antikörperbildung auslösen.

Darstellung der Toxine.

Zur Darstellung der Toxine kommen flüssige Nährböden in Betracht, in welchen man die Mikroben wachsen läßt, um dann wenn sich nach Verlauf einer gewissen Zeit hinlänglich Toxin gebildet hat, das keimfreie Gift zu gewinnen. Hier werden wir die Methodik nur ganz im allgemeinen besprechen; die Einzelheiten werden in den speziellen Kapiteln für sich erörtert werden.

Wahl der Mikroben. Es ist bei weitem nicht einerlei, welche Mikroben man anwendet, denn die Erfahrung hat uns gelehrt, daß einige Mikroben ein bedeutend größeres toxigenes Vermögen besitzen als andere; dieses Vermögen hält aber nicht immer gleichen Schritt mit der Virulenz, indem stark virulente Mikroben schlechte Toxinerzeuger sein können und umgekehrt. Es könnte nun nahe liegen, den Versuch an-

zustellen, das toxigene Vermögen dadurch zu steigern, daß man die Virulenz durch Tierpassagen vermehrt, dies gelingt auch in einigen Fällen, bei weitem aber nicht konstant. Oft scheint das toxigene Vermögen zuzunehmen, wenn der betreffende Stamm längere Zeit hindurch auf künstlichem Nährboden gezüchtet wird.

Handelt es sich um die Darstellung eines Toxines, so wird es gewöhnlich das Bequemste sein, sich einen Stamm zu verschaffen, der erfahrungsgemäß gutes Toxin bildet; ist dies nicht tunlich, so muß man eine große Menge Stämme durchprüfen und unter diesen denjenigen wählen, der den besten Erfolg gibt; nicht immer braucht man einen Stamm aufzugeben, weil er anfangs nicht brauchbar zu sein scheint. Dies gilt z. B. zuweilen von ganz frischen, aus einem Menschen oder einem Tiere gezüchteten Mikroben, die erst später nach mehrmaligen Umimpfungen die Fähigkeit gewinnen, starkes Toxin zu erzeugen. Anderseits gibt es ziemlich viele Mikroben, die in frischem Zustande am brauchbarsten sind, deren Toxinproduktion aber bald aufhört, wenn sie eine zeitlang außerhalb des Organismus gezüchtet wurden.

Hat man einen guten Toxinerzeuger ermittelt, so entsteht die Frage, wie man dessen toxigene Eigenschaften am besten konserviert. Leider gibt es kein unbedingt sicheres Mittel. Sporenbildner wie der B. tetani und der B. botulin. scheinen in ihrer Dauerform ziemlich konstant zu sein und können sich bei niedriger Temperatur in zugeschmolzenen Reagenzgläschen jahrelang toxigen erhalten. Was die meisten anderen Methoden betrifft, findet sich keine allgemein angenommene vor, und in den verschiedenen Instituten kommen viele voneinander abweichende Verfahren zur Anwendung.

Das Umzüchten geschieht an vielen Orten täglich, teils weil man glaubt, hierdurch die Lebensfähigkeit des Mikroben besser zu erhalten, teils weil man es für weniger zweckmäßig hält, denselben gar zu lange in seinem eignen Toxin wachsen zu lassen; letzterem Umstande hat man sogar so große Bedeutung beigelegt, daß man beim Umzüchten die Menge der Aussaat auf das Minimum beschränkte, damit keine Übertragung des Toxins stattfinden sollte. Gewöhnlich hegt man indes kein Bedenken in dieser Beziehung und impft ziemlich bedeutende Mengen über, um sich ein reichliches Ausgangsmaterial zu sichern. Die Zwischenräume zwischen den Umzüchtungen variieren; am häufigsten wird wohl ein- oder zweimal in der Woche umgezüchtet.

Sehr häufig läßt man die Kultur nach der Umzüchtung 24—48 Stunden im Thermostaten stehen und bringt sie darauf 8—14 Tage bis zur nächsten Umzüchtung in Zimmertemperatur. Jedenfalls wird es zweckmäßig sein, Kulturen einiger vorhergehenden Generationen aufzuheben, um zu diesen Zuflucht nehmen zu können, wenn der Stamm irgendwie durch Infektion, durch Unfall im Thermostaten oder dergleichen mißraten sein sollte.

Zuweilen züchtet man die Kultur auf festem Substrat wie Agar oder Serumagar fort, von welchem darauf die Impfung der Kolben vorgenommen wird. Es wäre aber doch wohl die Frage zu erwägen, ob man nicht meistens vorziehen sollte, die Kultur auf demselben flüssigen Nährboden zu erhalten, den man zur Darstellung des Toxins benützt. Bei Botulismus scheint ein Wechsel zwischen festen und flüssigen Nährböden die günstigsten Resultate zu geben.

Einen oder zwei Tage vor der Impfung der Kolben überzeugt man sich von der Reinheit der Kultur. Impft man größere, weithalsige Kolben, so müssen diese schräg gehalten werden, und der Akt ist in einem Zimmer mit ruhiger Luft vorzunehmen.

Der Nährboden. Der am häufigsten benützte Nährboden ist die gewöhnliche leicht alkalische Kalb- und Rindfleischbrühe mit 1—2% Pepton und $^1/_2$% Chlornatrium.

Vom Rind- oder Kalbfleisch entfernt man das Fett, die Sehnen und die Knochen; man zerteilt es fein mittels einer Fleischhackmaschine und läßt es nebst dem hierdurch gewonnenen Preßsaft die Nacht über mit dem doppelten Gewicht Wasser (gewöhnliches Leitungswasser) stehen. Nach Erhitzung bis auf 100°, wodurch die koagulablen Eiweißstoffe zum größten Teil ausgefällt werden, scheidet man mittels Filtrierens durch Gaze oder Papier die festen Bestandteile ab.

Die filtrierte Flüssigkeit färbt blaues Lackmuspapier rot, und gibt keine Phenolphtaleïnreaktion; nähere Aufschlüsse über ihre Reaktion, deren Kenntnis bei exakten Versuchen von Wichtigkeit ist, erhält man titrimetrisch. Die sauere Reaktion rührt von dem Vorhandensein der primären und sekundären Phosphate des Fleisches her. Bekanntlich findet man keinen scharfen Übergang, wenn man es versucht, eine Lösung dieser Salze mit Natronlauge unter Mithilfe von Lackmus zu titrieren. Nach und nach, wenn man immer mehr Natronlauge zusetzt, erfolgt die Bläuung des Lackmus allmählich und ist schon deutlich ausgesprochen, lange bevor noch alle sauren Salze in normales Salz umgebildet sind, so daß man keinen Zeitpunkt anzugeben vermag, wo die Flüssigkeit neutral reagierte. Diese Erscheinung rührt von den Verschiedenheiten in der Dissociation der drei Wasserstoffe der Phosphorsäure her, die von der Temperatur und der Verdünnung abhängig sind. Die Bläuung des Lackmuspapiers tritt um so früher ein, je verdünnter die Lösung ist. Aus diesen Gründen eignet sich Lackmus nicht besonders als Indikator. Bedeutend besser ist hierzu das Phenolphtaleïn geeignet, welches die Rötung ziemlich scharf anzeigt, wenn alle primären Salze in sekundäre umgebildet worden sind.

Das Titrieren geschieht in der Weise, daß zu 10 ccm der filtrierten, mit ca. 40 ccm destilliertem Wasser verdünnten Flüssigkeit ein paar Tropfen Phenolphtaleïn zugesetzt werden, worauf man ermittelt, wieviele ccm $^1/_{10}$ n.-Natronlauge erforderlich sind, um deutliche Rötung zu geben. In amerikanischen Instituten[15]) geschieht das Titrieren gewöhnlich folgendermaßen: zu 5 ccm Bouillon setzt man 45 ccm destillierten Wassers + 1 ccm 0,2% Phenolphtaleïn in 95% Alkohol gelöst; man erhitzt bis auf den Siedepunkt, und titriert in die heiße Flüssigkeit mit einer $^1/_{20}$ n.-NaOH-lösung. Die rote Färbung gewahrt man am besten in einer weißen Porzellanschale. Unter „Azidität“ versteht man diejenige Menge normaler Natronlauge, die zu 100 ccm Bouillon zuzusetzen ist, um die Rötung mittelst Phenolphtaleïns zu erzielen. Die Reaktion der Bouillon ist gewöhnlich eine solche, daß zur Phenolphtaleïnreaktion 20—30 ccm, meistens aber ca. 25 ccm $^1/_1$ n.-NaOH pro l erforderlich sind*). Von der Reaktion hängt es ab, wieviel NaOH oder Na_2Co_3 man der Bouillon zusetzen muß. Werden keine besonderen Forderungen an die Reaktion gestellt, so pflegt man so viel

---

*) Diese Zahl heißt „der Titer“ der Bouillon.

zuzusetzen, daß deutliche Bläuung des Lackmuspapiers, dagegen keine Rotfärbung durch Phenolphtaleïn erscheint. Dies erzielt man durchweg mit 20—25 ccm $^{1}/_{1}$ n.-NaOH pro l. Zu beachten ist indes, daß der Titer durch das Kochen und namentlich durch die Sterilisierung etwas vermehrt wird, so daß er bis auf 6 steigen kann.

Bei mehreren Mikroben spielt die Reaktion der Bouillon eine sehr wichtige Rolle und ist für den Verlauf der Toxinproduktion maßgebend, weshalb dieses Verhalten mit großer Sorgfalt zu studieren ist. Eventuell muß man eine besondere Untersuchungsreihe mit variierendem Zusatz von Alkali anstellen, um darüber ins reine zu kommen, durch welchen Grad der Alkalenszenz die kräftigste Toxinbildung erzielt wird.

Die Fleischbrühe wird dann noch mit Stoffen versetzt, welche das Wachstum der Mikroben fördern. Gewöhnlich setzt man Pepton und Kochsalz hinzu. (Das Titrieren sollte erst nach Lösung dieser Stoffe geschehen, da das Pepton nicht immer neutral ist, sondern in vielen Fällen leicht alkalisch reagiert.) Man meint, daß das Pepton für eine starke Toxinbildung von Wichtigkeit ist. Wirklich befriedigende Versuche darüber, eine wie große Menge Pepton erforderlich ist, liegen nicht vor, in der Regel wendet man 1—2 % an. Auch lassen sich keine allgemeinen Vorschriften darüber geben, welches Peptonpräparat vorzuziehen ist; oft wird ein bestimmtes Präparat als besonders geeignet empfohlen. Die Erfahrungen aus verschiedenen Instituten lauten sehr verschieden, und es ist nicht leicht zu entscheiden, ob ein gutes Resultat dem Pepton oder aber anderen, bisher unbekannten Faktoren der Toxinbildung zu verdanken ist. Ziemlich oft setzt man Serum (Mensch, Tier) oder Ascitesflüssigkeit zu: sind diese stark bakterizid, so sollte man sie $^{1}/_{2}$ Stunde vorher bis auf 55° C erwärmen.

Zur Sterilisation im allgemeinen bedient man sich jetzt meistens der 15—20 Minuten dauernden Autoclavierung bei 110°—125°. Dieses Verfahren ist unbedingt das beste, um große Mengen von Flüssigkeiten keimfrei zu machen. Man muß sich erinnern, daß die Bouillon bei der starken Erhitzung mehrere Veränderungen erleidet, sie wird dunkler, ihre Azidität nimmt zu, und ein Teil der Kohlehydrate wird gespalten. Will man dies vermeiden, so muß man eine geringere Temperatur benützen, eventuell durch diskontinuierliches Kochen an mehreren aufeinander folgenden Tagen sterilisieren. Gänzlich läßt sich die Erhitzung vermeiden, wenn man durch Porzellankerzen filtriert. Jedenfalls muß man aber die Bouillon, bevor sie besäet wird, 3—4 Tage hindurch im Thermostaten beobachten.

Wenn das Wachstum gleicher Mikroben in verschiedener Bouillon sich oft sehr voneinander abweichend verhält, so rührt das ohne Zweifel davon her, daß das benützte Fleisch große Verschiedenheiten darbietet. Dies erscheint nicht merkwürdig, wenn man bedenkt, auf wie verschiedene Weise die Tiere vor dem Schlachten gefüttert und behandelt werden, und wie das Fleisch später bei weitem nicht immer in derselben Weise aufbewahrt wird. Derjenige Bestandteil des Fleisches, dem man besonders seine Aufmerksamkeit zuwandte, ist der Muskelzucker, der wahrscheinlich zum größten Teil die Quelle der in vielen Kulturen beobachteten Säurebildung ist; um letztere zu vermeiden, unterwarf man die Kohlehydrate einer Gärung (SMITH), entweder einer spontanen, indem man sie ganz einfach bei hoher Temperatur stehen ließ, oder einer künstlichen, indem man vergärende Mikroben wie Hefe, B. coli usw. zusetzte. Um

die schädliche Wirkung gar zu starker Säurebildung zu verhindern, gibt man der Bouillon zuweilen einen Zusatz von sterilem Calcium- oder Magnesiumkarbonat, der die freie Säure nach und nach, wie sie sich bildet, zu binden vermag.

Die großen Schwierigkeiten, welche anfangs die Toxindarstellung darbot, bewirkte, daß das oben geschilderte Verfahren zum Gegenstand zahlreicher Modifikationen gemacht wurde, die im speziellen Teile zur Besprechung kommen werden.

Eine besondere Nährflüssigkeit wurde von L. Martin [11]), ursprünglich zur Präparation des Diphtheriegiftes, angegeben. Die Bouillon wird aus zwei Teilen bereitet, nämlich aus einer Peptonlösung und einem Fleischaufguß.

1. Die Peptonlösung. Man nimmt 5 Schweinsmagen, deren Mucosa und Muscularis fein zerhackt werden; hiervon läßt man 200 g mit 10 g reiner Salzsäure (20 %) und 1000 g Wasser 12—24 Stunden bei 50° C digerieren. Bei dieser Temperatur wandelt das Pepsin der Mucosa das Gewebe in Pepton um. Hierauf erhitzt man die Flüssigkeit bis auf 100° C, wodurch restierendes Pepsin zerstört wird, und filtriert durch Gaze oder durch eine dünne Schicht loser, hydrophiler Watte. Zum Filtrat setzt man 2 g Essigsäure pro l zu, worauf man die Flüssigkeit erhitzt und bei 80° C mit Natronhydrat alkalisiert. Darauf filtriert man durch Papier und mischt mit

2. Fleischinfus. Man mischt 500 g gehacktes Kalbfleisch mit 1 l Wasser und setzt das Gemisch 20 Stunden lang in den Thermostaten bei 35°, wodurch der Muskelzucker vergärt. Man preßt aus und setzt 5 g NaCl zu. 1 Liter dieses Fleischinfuses wird darauf mit 1 Liter des Schweinsmagenextraktes vermischt. Die Mischung wird auf 70° erwärmt, bis die Albuminstoffe koagulieren. Man filtriert durch Papier und alkalisiert. Dies geschieht in der Weise, daß man erst soviel Natronhydrat zusetzt, bis die Flüssigkeit gegen Lackmus neutral ist, worauf man 7 ccm Normalnatronlauge pro Liter zusetzt.

Schließlich verteilt man die Bouillon in Kolben, nachdem man dieselbe vorher mittels Filtration durch Chamberland-Filter sterilisiert hat. Dieses Sterilisationsverfahren ist vorzuziehen, läßt sich aber durch Autoclavierung bei 120° oder dreimaliges Erhitzen auf 100° in eintägigen Zwischenräumen ersetzen.

In Pferdefleischbrühe entsteht häufig starke Säurebildung, wahrscheinlich wegen des starken Glukosegehalts. Deshalb ist das Pferdefleisch trotz seiner Billigkeit für eine große Menge Mikroben zur Toxinbildung weniger brauchbar.

Unter den vielen anderen Nährsubstraten, die man in Anwendung gebracht hat, sind die eiweißfreien von gewissem Interesse für die Frage nach der Eiweißnatur der Toxine. Das bekannteste dieser Substrate gibt Uschinsky [17, 18]) an; es hat folgende Zusammensetzung:

Wasser	1000
Glyzerin	30—40
Chlornatrium	5—7
Chlorcalcium	0,1
Magnesiumsulfat	0,2—0,4
Dikaliumphosphat	2—2,5

Ammonium lacticum	6—7
Natrium asparaginicum	3,4.

Uschinsky gibt an, daß in diesem Substrat folgende Mikroben sehr üppig gedeihen und ihr spezifisches Gift erzeugen: Cholera, Diphtherie, Schweinerotlauf, Peripneumonia bovina, Tetanus, Typhus u. m. Indes gedeihen nicht alle Stämme gleich gut, am besten aber, wenn sie längere Zeit hindurch an ein saprophytisches Leben gewöhnt worden sind. Hat man es mit einer Form zu tun, die in einem solchen Nährsubstrat gar nicht oder nur spärlich wächst, so kann man sie zuweilen daran gewöhnen, wenn man das Substrat erst mit Bouillon vermischt und nach und nach die Form in Flüssigkeiten mit immer weniger Bouillon überführt.

Wie interessant diese Versuche in theoretischer Beziehung auch sein mögen, spielen sie in der Praxis doch nur eine geringe Rolle, da die Toxinbildung bei denselben sehr inkonstant und sehr schwach ist. Es ist nicht einmal entschieden, ob nicht die kleinen Mengen Eiweiß, die bei der Impfung übergeführt werden, eine gewisse Bedeutung haben.

In der Regel tut man wohl daran, größere Mengen des Nährsubstrat auf einmal zu bereiten. Man hat dann einen reichlichen, gleichmäßigen Vorrat, was von Wichtigkeit ist, sowohl wenn das Gift praktisch zur Immunisierung, als auch, wenn es zu theoretischen Untersuchungen gebraucht werden soll. (Testgifte.)

Kulturgefäße. Als Gefäße wendet man gewöhnlich Erlenmeyer Kolben an, in die man $^1/_2$—1 l gießt. Will man Oberflächenkultur bekommen, so muß man die Schicht niedriger, 2—3 cm, machen, oder man benützt auch Fernbachsche Kolben mit breitem, flachem Boden. In gewissen Fällen scheint ein besonders reichlicher Zutritt der Luft auf die Toxinbildung fördernd zu wirken; man saugt dann Luft durch eine seitliche Öffnung im Fernbachschen Kolben; das Saugen findet durch die Öffnung mittels einer Wasserpumpe statt; die Luft tritt durch eine Röhre in einen durchbohrten, den Kolbenhals verschließenden Gummipropfen ein, nachdem sie vorher dadurch angefeuchtet worden ist, daß man sie in einer mit Wasser gefüllten Wasserflasche in Bläschen emporsteigen läßt, und nachdem man sie durch Filtrieren durch einen Wattepfropfen keimfrei gemacht hat (Roux).

Handelt es sich um Anaerobe, so pflegt man der Bouillon Dextrose in einer Menge von 1—2 $^0/_0$ zuzusetzen. Theobald Smith warnt indes davor, 0,5 $^0/_0$ zu überschreiten, wenn es sich um Säureerzeuger handelt.

Das Entfernen des Sauerstoffes der Luft kann ganz einfach dadurch geschehen, daß man die Bouillon kocht und mit einer Schicht flüssigen Paraffins bedeckt. In solcher Bouillon kann der Tetanusbazillus sehr wohl Toxin bilden. In vielen Fällen lassen sich Anaërobe bei freiem Zutritt der Luft züchten, wenn sie mit einem anderen Mikroben in Symbiose leben. Die Luft läßt sich mittels einer Luftpumpe entfernen. Am häufigsten vertreibt man die atmosphärische Luft aber mittels eines anderen Gases und hier kommt vorzüglich der Wasserstoff in Betracht.

Ein Verfahren, das ich lange mit Erfolg benutzte, ist folgendes:

Die vorher gut ausgekochte Bouillon wird in einen großen, starken Kolben mit kreisförmigem Boden gegossen; der Kolben wird mittelst eines zweifach perforierten Kautschukpfropfens verschlossen. (S. Fig. 1.) Durch die eine Durchbohrung führt eine gebogene Glasröhre *a*, deren unteres

Ende, das fast den Boden erreicht, in eine ganz dünne Glaskugel ausgeblasen ist. Das umgebogene Ende hat eine Verengerung, und unterhalb der letzteren befindet sich ein nicht gar zu dichter Watteverschluß. Durch die andere Durchbohrung geht eine kurze Glasröhre *c*, die oben mittels eines Watteverschlusses abgeschlossen ist. Mittels eines kleinen, durchbohrten Kautschukpfropfens ist dieselbe von einer Glasröhre umgeben. Lose über der Glasröhre findet sich ein kleines Reagenzgläschen *d*. Nach der Autoclavierung impft man mit einer PASTEURschen Pipette durch die Röhre *c* hindurch, indem man das ganze Kölbchen schräg hält, worauf man den Watteverschluß wieder anbringt; man gießt ein wenig Quecksilber oder Paraffinöl in die Röhre und setzt das Reagenzgläschen *d* über. Nun schiebt man die Röhre *a* vorsichtig abwärts, so daß man die Glaskugel, welche das Ausfliessen der Bouillon während der Autoclavierung durch die Röhre *a* verhinderte, gegen den Boden des Kölbchens zerdrückt. Darauf untersucht man, ob der Wattepfropfen dieser Röhre trocken ist; ist er es nicht, so trocknet man ihn, indem man ihn vorsichtig mittels einer Gasflamme erwärmt, oder man ersetzt ihn durch einen neuen. Nun wird *a* mittels eines Gummischlauches mit einem Wasserstoffapparate oder mit einer Wasserstoffbombe in Verbindung gesetzt; den Wasserstoff kann man vorher eine Waschflasche mit alkalischer Pyrogalluslösung passieren lassen. Man leitet einen sanften Wasserstoffstrom ein paar Stunden lang durch die Bouillon, indem man diese fortwährend schüttelt (schwingt), um die Luft zu entfernen, wenn Spuren derselben noch vorhanden sein sollten. Wenn Säuredämpfe im Wasserstoff vorhanden sein könnten (wenn dieser aus Zink und Schwefelsäure bereitet wird), so läßt man denselben vorher eine Jod-Jodkaliumlösung passieren. Die Flüssigkeit sollte eine Temperatur von 37—40° haben, da bei dieser das absorbierte Gas leichter vertrieben wird. Hierauf schmilzt man bei *b* zu und setzt den Apparat in den Brutschrank. Der Quecksilberverschluß dient dazu, die gebildeten Gase, die sonst das Kölbchen zersprengen würden, entweichen zu lassen. Durch die Glasröhre *c* hindurch kann man leicht und ohne die Gefahr einer Infektion Proben der Kultur entnehmen.

Fig. 1. Apparat zur Anaerobenzüchtung.

Möglicherweise wird die von TAROZZI und später von WRZOSEK angegebene Methode zur Züchtung obligaten Anaeroben in aerober Weise sich zur Darstellung von Toxinen brauchbar erweisen (s. v. EISLER und PRIBRAM: Tetanustoxin).

Man tut wohl daran, wenn man mit vielen verschiedenen Zubereitungen der Bouillon arbeitet, sich gleich von Anfang an zu gewöhnen, sorgfältige N o t i z e n über die Z u b e r e i t u n g zu machen.

Dies wird sehr erleichtert, wenn man nach amerikanischem Muster[15]) gedruckte Schemata oder Kärtchen gebraucht, auf die man die Nummer der Bouillon und die sonstigen Notizen über das Fleisch, die Behandlung, die Reaktion, das Sterilisationsverfahren usw. einträgt.

Die Temperatur, in welcher die geimpfte Bouillon sich befinden sollte, ist besonders diejenige, bei welcher das Wachstum der Bazillen möglichst lebhaft ist, was gewöhnlich bei ca. 37° stattfindet. Indes hat man noch einen anderen Umstand zu berücksichtigen. Das erzeugte Toxin wird durch diese Temperatur häufig ein wenig abgeschwächt und, wie später zur Besprechung kommen wird, kann eine Steigerung der Temperatur um 1 Grad für die Abschwächung eine weit größere Rolle spielen als für das Wachstum der Mikroben. Oft zieht man deshalb zur Toxindarstellung eine niedrigere Temperatur, 33—35° vor. In einigen Fällen, z. B. hinsichtlich des Botulismus, des Pestbazillus, geben sogar 18—24° die besten Resultate.

Toxinbildung in den Kulturen. Die Kulturen müssen aus dem Thermostaten entfernt werden, sobald die Toxinbildung aufgehört hat; läßt man sie gar zu lange in demselben stehen, so setzt man sich der Gefahr großer Abschwächung aus. Allgemeine Regeln lassen sich nicht geben. Je nach der Kultur und dem Medium kann es Schwankungen von wenigen Stunden bis zu mehreren Monaten geben. Kennt man die Kultur nicht genau, so wird es von Nutzen sein, einige Kölbchen speziell dazu zu verwenden, die durch die Zeitdauer verursachten Änderungen der Toxizität, der Reaktion und dergleichen zu studieren. Einen Anhaltspunkt wird das Wachstum geben können. Solange dieses kräftig ist, der Bodensatz zunimmt und zerstörte Häutchen sich regenerieren, darf man vermuten, daß die Toxinbildung fortschreitet. Beginnende Klärung deutet an, daß das Wachstum bald aufhören wird.

Nach dem Herausnehmen aus dem Thermostaten muß man sich durch sorgfältige Mikroskopie vergewissern, daß man eine Reinkultur vor sich hat. Bei älteren Kulturen ist dies nicht immer leicht, da sie zahlreiche degenerierte und zerfallene Formen enthalten. Es empfiehlt sich, die Reinheit kulturell festzustellen.

Das Toxin läßt sich mitunter schon wenige Stunden nach der Impfung in geringer Menge nachweisen, meistens dauert es aber einen oder mehrere Tage, bis erkennbare Mengen vorhanden sind. Darauf steigt der Toxingehalt bis auf ein Maximum, um dann unter dem Einfluß der später zu besprechenden toxinabschwächenden Faktoren zu sinken. Zuweilen findet Schwankungen des Toxingehalts einer Kultur, als ob derselbe mehrere Maxima zeigte; es ist aber ungewiß, ob dies nicht auf Versuchsfehlern beruht.

Während spärliches Wachstum gewöhnliche spärliche Toxinbildung zurfolge hat, kann man sehr wohl üppiges Wachstum der Mikroben ohne die geringste Spur von Gift antreffen, dessen Produktion durch ganz besondere und bisher unbekannte Verhältnisse bedingt zu sein scheint. Auf diesem Gebiete muß man auf große Unregelmäßigkeiten gefaßt sein. Eine Reihe von Kolben mit demselben Nährsubstrat, und ganz auf dieselbe Weise geimpft und behandelt, werden fast nie dasselbe Resultat geben; die einzelnen Kolben können bedeutende Verschiedenheiten der Toxizität zeigen. Hieraus folgt, daß es äußerst schwierig ist, über den Einfluß eines Faktors auf die Toxinbildung ins reine zu kommen. Hierzu ist vor allen Dingen erforderlich, daß alle anderen Faktoren dieselben sind, also: dasselbe Nährsubstrat, fast gleich-

zeitige Beschickung, dieselbe Menge, gleichartige Behälter, dieselbe Sterilisation, dasselbe Impfmaterial, derselbe Thermostat usw. Ferner darf man sich nicht mit dem Vergleichen einzelner Kolben begnügen, sondern man muß Gruppen von 5—10 Stück miteinander vergleichen. Hier hat man sich klarzumachen, in welchem Maße die einzelnen Kolben derselben Gruppe voneinander abweichen.

Man sieht zuweilen, wie eine Kultur nach und nach ihr toxigenes Vermögen verliert; auch kann es geschehen, daß eine Kultur lange Zeit hindurch kein Toxin erzeugt, dann aber plötzlich wieder solches produziert. Es ist nicht ungewöhnlich, daß derselbe Stamm in einem Institute eine zeitlang bereitwillig Gift bildet, während dies in einem anderen nicht gelingt, wenn in beiden auch ganz dasselbe Verfahren angewandt wird.

Im Laufe der Zeiten hat man zwar weit stärkere Gifte erzielt als diejenigen, mit denen man sich in der ersten Zeit der Immunitätslehre begnügte (Roux u. Yersin); zur Sicherheit ist man aber noch lange nicht gelangt, und die größte Schwierigkeit für alle Institute, die sich die Darstellung von Antitoxinen zur Aufgabe gemacht haben, besteht darin, fortwährend große Mengen starken Toxins darzustellen.

Fig. 2. Apparat zur Toxinfiltration.

Beim Nachweise eines Toxins muß man sich vergewissern, daß eine eventuelle Giftwirkung nicht von anderen toxischen Stoffen als dem eigentlichen Toxin herrührt. Dies gilt z. B., wenn man gezwungen wird, sehr große Mengen einer durch Bakterienwachstum stark veränderten Bouillon zu benutzen, um eine Giftwirkung hervorzubringen. Selbstverständlich ist im Tierexperimente eine sorgfältige Sektion zu unternehmen und durch bakteriologische Untersuchungen festzustellen, daß keine Infektion irgendwelcher Art vorliegt. Eine gute Gegenprobe besteht darin, daß man untersucht, ob die Giftwirkung durch Erhitzen und durch Mischen des Toxins mit seinem spezifischen Antitoxin verloren geht.

Gilt es zu ermitteln, ob sich ein lösliches Toxin findet, so muß man den betreffenden Mikroben natürlich entfernen. Dies geschieht am sichersten durch Filtration durch eine bakteriendichte Porzellankerze, die in einer der bekannten Aufstellungen, z. B. der Martinschen oder der hier wiedergegebenen angebracht ist.

Die Kerze *a* (Chamberland, Marke F) (Fig. 2) ist mittelst eines Gummischlauches *b* mit einer engen Glasröhre *c* verbunden. In letzterer findet sich oben der durch einen Kautschukpfropfen befestigte Behälter *d*. Unten ist die Kerze mittelst eines Gummischlauches *h* mit dem Behälter *e* in Verbindung gebracht, der durch eine gewöhnliche Flasche mit einem Tubus am unteren Ende ersetzt werden kann. Das Saugen geschieht durch *f* hindurch. Das Abzapfen findet durch den Gummischlauch *g* statt, der während des Filtrierens durch einen Quetschhahn verschlossen ist, und dessen Spitze durch ein an einen

Kautschukpfropfen befestigtes Reagenzglas oder durch ein MAASENsches Mundstück beschützt ist. Alle Gummischläuche müssen gut gebunden sein.

Aufbewahrung der Toxine.

Das Toxin wird nach Bedarf auf größere oder kleinere Flaschen verteilt. Muß man ein Gefäß häufig öffnen, um Teile seines Inhalts herauszuholen, so ist ein Syphon wie der (Fig. 3) abgebildete zweckmäßig. Soll das Toxin zum Immunisieren gebraucht werden, so kann man den Glasschlauch *a* ohne gläserne Spitze enden lassen und das gewünschte Quantum direkt in die sterile Injektionsspritze aufsaugen. Darauf verhütet man eine Infektion des Gummischlauches, indem man dessen Spitze in ein Glas mit Karbolwasser eintaucht.

Legt man besonderes Gewicht darauf, die Luft vom Gifte fernzuhalten, so kann man die Flüssigkeit mit Toluol versetzen. Noch größere Sicherheit in dieser Beziehung erreicht man, wenn man die Röhre *b* mit einem Gefäße mit komprimiertem Wasserstoff in Verbindung setzt. Mittels dieses Gases wird so viel der Flüssigkeit herausgepreßt, wie man zu gebrauchen wünscht.

Handelt es sich besonders darum, die Sterilität zu erhalten, so lassen sich die beiden oben beschriebenen Apparate kombinieren, indem man die Filterkerze *a* mittels einer Glasröhre, die durch den Pfropfen des Syphons geht, und die nach beendigter Filtration zugeschmolzen wird, mit dem Syphon in direkte Verbindung setzt.

Fig. 3. Syphon zur Aufbewahrung des Toxins.

Dichte Porzellankerzen haben den Übelstand, daß sie zuweilen größere Mengen Toxin zurückhalten. Vielleicht mag das neue DOULTONsche Filter[4]) größere Leistungsfähigkeit besitzen.

Wegen großer Verluste an wirksamer Substanz konnten GRASSBERGER und SCHATTENFROH[6]) die gewöhnlichen Porzellankerzen nicht benutzen, um das Rauschbrandgift von seinen Sporen zu befreien; bei Anwendung von Klärpulvern erhielten sie aber ein jederzeit äußerst bequem und verläßlich herzustellendes Filter.

Um ganz kleine Mengen toxischen Giftes zu filtrieren, kann man ein sogenanntes Lilliputfilter oder MARTINS[11a]) Modell anwenden.

Ein anderes Verfahren, mittels dessen man zuweilen eine Kultur von Bakterien befreien kann, ist lange andauerndes Zentrifugieren.

OTTO[14]) giebt an, daß im Kgl. Inst. f. experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. folgendes Verfahren gebraucht wird, um Tetanustoxin sporenfrei zu machen: Das frisch gewonnene Gift wird durch Ammoniumsulfat ausgefällt, sofort wieder in Kochsalzlösung gelöst und scharf durchzentrifugiert (eine Stunde mit 4000 Umdrehungen per Minute). Die klare Flüssigkeit wird abgegossen und das Toxin von neuem durch Ammoniumsulfat ausgefällt, sogleich wieder gelöst und zentrifugiert. Nach 3—4-4 maliger Wiederholung dieses Verfahrens, wird ein fast sporenfreies Gift erhalten. Das Gift wird auf Thontellern im Vakuum getrocknet. Sind noch Sporen zurückgeblieben, müssen Ausfällung und Zentrifugieren wiederholt werden (KNORR).

Dieses Verfahren ist selbstverständlich stets ein wenig unsicher.

Unter chemischen Mitteln zur Sterilisation hat man viele verschiedene gebraucht, z. B. Jodtrichlorid (Behring und Wernicke), 0,3 % Trikresol (Aronson), 0,3—0,5 % Phenol.

Sehr bequem ist die von Ehrlich eingeführte Konservierung unter Toluol. Die Kultur wird durch Papier filtriert, wodurch man alle groben Unreinheiten entfernt. Darauf wird soviel Toluol zugesetzt, daß über der Bouillon eine ein paar cm hohe Schicht steht. Die Flaschen werden während der ersten 3—4 Tage einmal täglich gut geschüttelt.

Das Toluol tötet die meisten Keime und bildet eine schützende Schicht, welche teils die Luft abschließt, teils gestattet, daß man mit größerer Sicherheit die Flasche ohne Luftinfektion öffnen kann. Mittels einer Pipette kann man leicht das Toluol durchdringen und die unter demselben befindliche klare Flüssigkeit aufsaugen.

Das Toluol besitzt als Konservierungsmittel viele Vorzüge, auch scheint es gewöhnlich keinen erheblichen Einfluß auf das Gift zu üben, das sich oft lange Zeit hindurch unter demselben erhält. Zu vergessen ist jedoch nicht, daß die Toluolschicht nicht mit absoluter Sicherheit eine Flüssigkeit keimfrei zu erhalten vermag, weshalb man mitunter sieht, daß hierunter aufgehobene Toxinlösung infiziert wird. (Bei intraperitonealen und intravenösen Injektionen der Toluolgifte muß das Toluol wegen seiner Giftigkeit entfernt werden, was durch ein nasses Papierfilter geschieht.)

Die Konzentrierung des Toxins läßt sich durch Eindampfen im Vakuum erzielen, hierbei geht aber oft ein Teil der Giftigkeit verloren. Das auf diese Weise gewonnene Toxinpulver erhält sich bei niedriger Temperatur ganz gut, ist aber keineswegs absolut haltbar.

Unter den Ausfällungsmethoden kommt in der Praxis zunächst die Ausfällung mit dem zehnfachen Volumen absoluten Alkohols und die mit Ammoniumsulfat in Betracht. Letztere, die ziemlich oft angewandt wird, geschieht folgendermaßen: Das Toxin wird in hohe zylindrische Gläser gegossen, und man setzt Überschuß reinen (nicht saueren) Ammoniumsulfats zu, wovon sehr bedeutende Mengen erforderlich sind. Während lebhaften Umrührens scheidet sich das Toxin als eine braune Masse aus und schwimmt an der Oberfläche, wo es sich leicht abschöpfen läßt. Man fährt fort, Ammoniumsulfat zuzusetzen, bis eine kleine Probe mit dem Filtrate anzeigt, daß keine Ausfällung mehr stattfindet. Eventuell wiederholt man den Prozeß des Auflösens und erneuten Ausfällens. Schließlich trocknet man das ausgefällte Ammoniumsulfat auf einem Thonteller im Vakuum über Schwefelsäure. Auf diese Weise läßt sich das Toxin quantitativ ausfällen und ist recht haltbar. Ein solchergestalt ausgesalzenes Toxin zeigt beim praktischen Gebrauch aber gewisse Übelstände wegen des großen Gehalts an Ammoniumsulfat; z. B. verursacht es Tieren ziemlich große Schmerzen bei der Injektion; in größeren Mengen erregt es oft (sterile) Abszesse. Das Salz kann freilich durch Dialyse oder Abpressen entfernt werden (s. v. Eisler und Pribram: Das Tetanustoxin).

Eine Modifikation hat vor kurzem C. J. Martin vorgeschlagen: Die toxische Bouillon wird auf ca. 37° erwärmt und mit Na_2So_4 gesättigt. Das ausgefällte Toxin (das an der Wand des Gefäßes klebt, so daß die konzentrierte Salzlösung sich leicht abgießen läßt) wird in einer geringen Menge destillierten Wassers gelöst — nötigenfalls wiederholt man das Ausfällen — und die Lösung wird bis auf 0° abgekühlt, wodurch ein

großer Teil des Natriumsulfats infolge der Auskristallisierung entfernt wird. Auf diese Weise kann man eine Flüssigkeit erzielen, die das Toxin in ca. 5facher Konzentration bei einer Natriumsulfatkonzentration von ca. 2,5 % enthält, d. h. ungefähr isotonisch mit einer 0,9 % Chlornatriumlösung.

Die von BRIEGER und seinen Mitarbeitern angegebenen komplizierten Methoden zur Reinigung der Toxine durch Ausfällung mittels verschiedener Metallsalze und nachfolgender Zerlegung der entstandenen Doppelverbindungen, können hier trotz ihrer theoretischen Bedeutung nur eben genannt werden. In ihrer gegenwärtigen Form haben sie nur geringe praktische Wichtigkeit, da sie einen großen Verlust an Toxin bewirken.

Mittels der Dialyse lassen sich Salze und Peptone entfernen. Zugleich verliert man einen Teil des Toxins, da die Salze aber bedeutend schneller diffundieren, kann man sich durch rechtzeitige Unterbrechung des Prozesses eine relativ salzfreie und dennoch toxinreiche Flüssigkeit verschaffen. Wünscht man, jegliche Spur von Salz zu entfernen, so wird dies gewöhnlich nur mit einem großen Verlust an Toxin geschehen können. Einzelne Toxine, wie z. B. das Diphtheriegift, scheinen die Membran ohne Nachteil zu passieren, andere, wie das Vibriolysin, werden sehr stark abgeschwächt. Da die Dialyse mit strömendem Wasser für viele Toxine ein eingreifender Prozeß ist, sollte man dieselbe bei möglichst niedriger Temperatur unternehmen und die Dauer des Verfahrens möglichst beschränken.

Von großer Wichtigkeit ist die Beschaffenheit der Membran. Pergament und Kollodium sind zu wenig durchlässig, viel besser eignen sich hierzu tierische Membranen wie Fischblasen, Blinddärme und Schlingen des Dünndarms, am besten solche von jungen Tieren. Werden diese Häutchen sackförmig an einen Glasring oder eine Glasröhre befestigt, so lassen sie sich leicht in ein Gefäß mit fließendem Wasser versenken. Sie besitzen den Vorzug, eine große Oberfläche mit einem großen Volumen zu vereinen. Vor dem Gebrauch muß man mit peinlichster Sorgfalt prüfen, ob die Membran dicht ist, indem man sie, mit Wasser gefüllt, 24 Stunden hindurch hängen läßt, so daß sie einem reichlichen Druck ausgesetzt ist, und darauf überzeugt man sich, daß die äußere Seite keine Feuchtigkeit oder gar Tropfenbildung zeigt.

v. CALCAR[5]) empfiehlt menschliches Amnion, das folgendermaßen steril zubereitet wird: das Amnion wird vom Chorion losgetrennt, 1 Minute lang gut mit Sublimatlösung 1:5000 ausgespült, und bleibt 12 Stunden lang bei 37° in physiologischer Kochsalzlösung stehen. Nachdem man es mit verdünnter Pankreatinlösung übergossen hat, steht es ein paar Stunden im Brutofen und darauf wieder einige Stunden in warmer Kochsalzlösung. Übergießt man jetzt die Häute noch einige Augenblicke mit stark abgekühlter Salzlösung, so läßt sich die oberflächliche, stark geschwollene Epithelschicht leicht entfernen, und man hat eine glashelle Haut. Diese wird in einer Glyzerinlösung aufgehoben, die man vor dem Gebrauch der Haut durch Abspülen mit sterilem Wasser entfernt. Ein derart präpariertes Amnion soll sich vorzüglich zur Dialyse eignen. Was v. CALCARS Behauptung betrifft, man könne die Bedingungen der Dialyse dadurch ändern, daß man die Porenweite der Membran durch Ausspannung der letzteren vergrößere, wären Nachprüfungen sehr erwünscht.

Einige Toxine diffundieren in eine Gelatinesäule, was von Arrhenius und Madsen[2]) wie auch von Madsen und Walbum[10]) benutzt wurde, um Toxin von Antitoxin in gewissen Mischungen dieser beiden Stoffe voneinander zu scheiden.

Das Verfahren ist folgendes: Man bereitet eine 5 % Lösung von Gelatine in destilliertem Wasser, neutralisiert und gießt 15 ccm in ein Reagenzglas, in welchem man dieselbe in senkrechter Lage zum Erstarren bringt. Darauf gießt man mittels einer Pipette 2 ccm einer wässerigen Lösung der zu untersuchenden Toxinlösung über die Gelatinesäule und verschließt das Reagenzglas mittelst eines sterilen Propfens. Das Glas läßt man, während die Diffusion vorgeht, bei einer niedrigen, konstanten Temperatur stehen. Will man untersuchen, wieviel Toxin in die Gelatine eingedrungen ist, so gießt man die oberhalb der Gelatine stehende Flüssigkeit ab und wäscht das Glas über derselben geschwind mit Wasser ab. Man zerdrückt vorsichtig das Reagenzglas und entfernt das die Gelatinesäule umgebende Glas. Die Säule zerschneidet man in 1—3 cm lange Stückchen, deren Gewicht man bestimmt. Nach dem Schmelzen nnd eventueller Lösung in Wasser bestimmt man deren Toxizität, wie auch die Toxizität der oberhalb stehenden Flüssigkeit.

Um die Diffusionsgeschwindigkeit beurteilen zu können, muß man gewöhnlich zugleich bestimmen, wie geschwind ein bekannter Stoff, z. B. NaCl, in die Gelatine eindringt.

Eine wichtige Eigentümlichkeit der Toxine ist ihre große Labilität. Die meisten beginnen schon bei ca. 45° ihre Toxizität zu verlieren, schnell geschieht dies bei 50 bis 60°. Bei Zimmertemperatur und noch niedrigerer Temperatur erhalten sie sich besser, meistens werden sie aber schon bei 2—5° langsam abgeschwächt. Im Verein mit Famulener fand ich, daß diese Abschwächung durch Erwärmung in den meisten Fällen dieselben Gesetze befolgt wie eine monomolekulare Reaktion (z. B. die Rohrzuckerinversion). Möglicherweise handelt es sich wie bei der letzteren um einen hydrolytischen Vorgang; es könnte hierauf hindeuten, daß die Toxine resistenter sind, wenn sie sich in wasserfreien Flüssigkeiten, in Amylalkohol befinden. In trockenem Zustande erhalten sie sich weit besser als in gelöstem, sie ertragen dann ohne Abschwächung eine Erhitzung bis über 100°. Von großem Einfluß ist die Temperatur. Die Abschwächung nimmt für jeden Grad, um den die Temperatur steigt, um das 1—2fache zu. Die Abhängigkeit der Abschwächung von der Temperatur läßt sich durch eine exponentielle Formel ausdrücken.

Es ist deshalb von großer Wichtigkeit, die Toxine möglichst kalt aufzuheben, bei einer Temperatur um 0° herum. Noch größere Sicherheit erhält man, wenn man sie unter wasseraufsaugenden Stoffen wie Phosphorsäureanhydrid gefrieren läßt. (Siehe unter Trockenstandardserum).

Große Bedeutung hat auch die Reaktion. In den meisten Kulturen bildet sich Alkali, zuweilen Säure; beides befördert die Abschwächung, indem sowohl Alkali als Säure, als Katalysatoren, die Geschwindigkeit der Abschwächung stark beschleunigen.

Je mehr Alkali oder Säure in einer Kultur entsteht, um so mehr wird das Toxin abgeschwächt. In jungen Kulturen wird die Toxinproduktion die Abschwächung kompensieren; wird die Produktion aber geringer und die alkalische oder saure Reaktion stärker, so wird die Abschwächung sich immer mehr geltend machen. Deshalb muß man die Kulturen möglichst bald aus dem Thermostaten entfernen, und es gewährt

einen großen Vorteil, mit Stämmen zu arbeiten, die Toxin im Laufe kurzer Zeit produzieren. Es wurde oben berührt, wie man diese Abschwächung zuweilen dadurch vermindern kann, daß die Temperatur des Brutschrankes niedriger gehalten wird. Dies kommt daher, daß die Temperatur auf das Wachstum der Bakterien viel geringeren Einfluß übt als auf die Abschwächung des Toxins. Während letztere für jeden Grad, den die Temperatur steigt, fast um das Doppelte anwächst, wird das Wachstum der Bakterien für jeden 10 Grad nur um das Zwei- und Dreifache vermehrt.

Es dürfte fraglich sein, ob Toxinlösungen sich nicht in vielen Fällen besser konservieren würden, wenn man das freie Alkali oder die Säure abstumpfte.

Übrigens sind gewiß noch viele andere Faktoren beteiligt, deren Mitwirkung indes noch nicht systematisch untersucht worden ist.

Dem Licht und dem Sauerstoff pflegt man besonders deletären Einfluß beizumessen. Es ist deshalb eine feste Regel, daß man die Toxinlösungen stets gut zugedeckt an einem dunklen Orte aufbewahrt; während des Arbeitens mit denselben sollte man sie nicht gar lange dem Lichte aussetzen, sondern gegebenenfalls abgemessene Mengen, die zur Injektion usw. bestimmt sind, mit einem Deckel aus Pappe oder Blech zudecken, wenn man nicht dunkle Gefässe benützt.

Nicht ganz selten scheinen verdünnte Lösungen labiler zu sein als konzentrierte. Vielleicht spielt der Salzgehalt hier eine Rolle, da Toxin und Fermentlösungen gewöhnlich haltbarer sind, wenn große Salzkonzentration vorhanden ist.

Zuweilen sieht man dagegen, daß die Haltbarkeit eines Toxins mit der Verdünnung zunimmt; es handelt sich um solche Fälle, wo die Lösung stark alkalisch ist, und wo die Alkalikonzentration also bei zunehmender Verdünnung abnimmt.

Toxinmessung.

Die Toxizität mißt man entweder an Tieren oder an Blutkörperchen (roten oder weißen).

Die Technik der Bemessung ist sehr einfach, bedarf aber doch einer kurzen Besprechung.

Handelt es sich um Injektion an Tiere, so muß die Menge der Flüssigkeit so groß sein, daß das mögliche Verschütten eines Tropfens keine Rolle spielt; das Gift wird so stark verdünnt, daß man Kaninchen und Meerschweinchen 3—4 ccm, Ratten 1—2 ccm und Mäusen etwa 0,25 ccm einspritzt.

Die allgemeinen giltigen Regeln für sterile Arbeit sind beim Abmessen und Injizieren zu beobachten.

Behufs der Messungen sind genau geaichte Apparate erforderlich. Kann man die Genauigkeit nicht selbst kontrollieren, so tut man wohl daran, die Meßapparate aus einer offiziellen Prüfungsanstalt zu beziehen (z. B. Physikalische technische Reichsanstalt, Charlottenburg, Bureau of Standards, Washington).

Zu mehreren Bestimmungen gebraucht man Meßkolben, an deren Hals sich eine Einteilung findet. Damit diese möglichst genau werden kann, muß der Hals eng sein. Zu beachten ist jedoch, daß er weit genug ist, um alle Pipetten, von deren Anwendung die Rede sein kann, passieren zu lassen. Die Meßkolben können auf Eingiessen oder auf

Ausfluß geaicht sein. Im letzteren Falle darf der Ausfluß nicht durch Verengerungen des Halses u. dgl. behindert werden. In der Regel gibt der Ausfluß nur für solche Flüssigkeiten genaue Resultate, die denselben Flüssigkeitsgrad besitzen wie die Flüssigkeit, mit welcher der Kolben geaicht wurde.

Es ist von Bedeutung, bei welcher Temperatur die Meßapparate geaicht worden sind; gewöhnlich wird man es am zweckmäßigsten finden, sie bei gewöhnlicher Zimmertemperatur, 20° C, zu aichen.

Das Verdünnen in einem Meßkolben geschieht am besten so, daß man erst den Kolben mit der Verdünnungsflüssigkeit, gewöhnlich 0,85 oder 0,9 % NaCl-lösung zur Hälfte füllt; darauf mißt man das Toxin mittels einer Pipette ab (die eventuell einigemal mit dem Inhalt des Kolbens ausgespült wird), dann gießt man Kochsalzlösung hinein, indem man den Kolben fortwährend umschwingt, aber nicht schüttelt, um Luftbläschen zu vermeiden. Kochsalzlösung wird bis zum Merkzeichen aufgegossen, so daß der unterste Punkt des Meniskusbogens von dem Teilstriche tangiert wird, der ganz um den Hals herum gehen sollte. Schließlich wird der Kolben sorgfältig geschüttelt.

Fig. 4.

Die Reinigung eines Meßapparates erfolgt dadurch, daß man ihn in warmem und kaltem Wasser gründlich ausspült und mit einer gesättigten Lösung von Kaliumbichromat in konzentrierter Schwefelsäure füllt, um Fett und dgl. zu entfernen; darauf spült man tüchtig aus in Leitungswasser und mehrmals in destilliertem Wasser, trocknet und sterilisiert in trockner Hitze.

Die mit guten Pipetten erreichbare Genauigkeit einer Volummessung beträgt etwa 0,5 pro mille des Pipetteninhalts[13]); mit größeren Pipetten arbeitet man sicherer als mit kleineren.

Pipetten werden gewöhnlich auf Ausfluß benützt, d. h. sie sind so graduiert, daß das angegebene Flüssigkeitsvolum austritt, wenn man sie bis zum Striche füllt und auslaufen läßt. Man gebraucht Vollpipetten und graduierte Pipetten.

Eine Vollpipette (Fig. 4*a*) füllt man dadurch, daß man bis über den markierenden Strich aufsaugt, worauf man die Pulpa des Zeigefingers aufdrückt, die Spitze der Pipette beim Auslaufen an die Gefäßwand hält und die Flüssigkeit in dieser Stellung ausfließen läßt, bis der Teilstrich den unteren Teil des Meniskus tangiert. Die Pipette hält man während des Abmessens so, daß die Teilstriche an der vorderen und die an der hinteren Wand, die einen geschlossenen Kreis bilden sollten, sich decken.

Auf dieselbe Weise hält man die Spitze der Pipette an die Wand des Gefäßes, in welches man die Flüssigkeit zu übertragen wünscht,

man läßt den Inhalt von selbst ausfließen, was nicht weniger als 40 Sek. dauern darf, wartet einen Augenblick, bläst, während die Spitze noch anliegt, und hebt unter Blasen die Spitze ab. Läßt man den Ausfluß mit frei in der Luft gehaltener Spitze erfolgen, so bleibt schließlich ein Tropfen hängen, dessen Größe von Zufälligkeiten abhängig ist.

Handelt es sich um sehr dickflüssige Flüssigkeiten, z. B. um glyzerinhaltige, so ist es vorzuziehen, die Pipette so geaicht zu haben, daß sie mit dem Verdünnungsmittel auszuspülen ist. Dies muß dann an der Pipette durch ein besonderes Zeichen angegeben sein.

Die graduierten Pipetten behandelt man während des Abmessens ebenso wie die Vollpipette. Oft bedient man sich der 1 ccm Pipette, die in Hundertstel ccm eingeteilt ist. Zuweilen findet man solche als Vollpipetten, so daß die untere Spitze die letzten 0,1 ccm faßt (Fig 4*b*); dies ist vorzuziehen, wenn man nur eine geringe Menge Toxin zur Verfügung hat; beim Ausblasen sind jedoch Fehler möglich. Eine vielleicht noch größere Genauigkeit erzielt man, wenn der unterste Teilstrich ein wenig von der Spitze entfernt liegt (Fig. 4*c*).

Häufig wendet man eine Kombination einer graduierten mit einer Vollpipette an. So kann man am Halse der letzteren 2 Merkzeichen für 49 ccm und 50 ccm (Fig. 4*d*), für 24 ccm und 25 ccm etc. finden; derartige Pipetten werden angewandt, um Verdünnungen 1:49, 1:24 ccm usw. bequem vornehmen zu können. Zu besonderen Zwecken, genauen Messungen bis 5—6 ccm, wie sie häufig bei Toxin-Antitoxinmischungen vorkommen, ist die Vollpipette mit langem, in Hundertstel ccm eingeteiltem Halse sog. „Feinpipetten" sehr brauchbar. Die abgebildete Pipette (Fig. 4*e*) z. B. wird zu genauen Messungen von 4—5 ccm großen Mengen Flüssigkeit benutzt.

Will man kleinste Mengen von Flüssigkeiten abmessen und es vermeiden, dieselben zu verdünnen, um sie auf ein größeres Volumen zu bringen, so kann man graduierte Kapillarpipetten benutzen.

Küster[7]) beschrieb eine besondere Saugvorrichtung für Pipetten zur genauen Bemessung kleinster Flüssigkeitsmengen, die das Abmessen von Tausendteilen eines Kubikzentimeters gestattet, die leicht sterilisiersbar ist, und die bequem, geschwind und genau arbeitet.

Rosenau[15]) wendet statt des Saugens mit dem Munde einen oben an die Pipette befestigten Gummiballon an, der mittels einer Schraubenklemme komprimiert und erweitert wird.

Die Technik der Toxinmessung ist sehr einfach. Soll man z. B. 0,003, 0,0035 und 0,004 ccm an Meerschweinchen injizieren, so mißt man mit einer Vollpipette 1 ccm Gift ab, das in einen Meßkolben von 1000 ccm, der zur Hälfte mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gefüllt ist, gebracht wird. Die Pipette wird ein paarmal sorgfältig ausgespült, wenn sie geaicht ist, und unter vorsichtigem Mischen füllt man den Meßkolben bis zum Meßstriche. Letzteres Einfüllen muß langsam, mittels einer Pipette geschehen.

Nach sorgfältigem Schütteln des Inhalts des Kolbens mißt man in 2 Spitzgläser (Schnapsgläser) 3, 3,5 und 4 ccm ab. Die Gläser deckt man mittels einer Kappe aus Pappe oder Metall zu, um das Licht abzuhalten. Aus den Spitzgläsern saugt man die Flüssigkeit mittels einer Spritze auf und injiziert, oder auch gießt man in eine Kochsche Spritze um, wenn eine solche angewandt wird.

Rosenau[15]) empfiehlt eine Modifikation der Kochschen Spritze, die darin besteht, daß die Kanüle mittels eines Schraubengangss an das Glas befestigt wird, und daß der Gummiballon nicht durch einen metallenen Ring, welcher dessen Äußeres umfaßt, mit demselben verbunden wird, sondern durch eine Art Gummipfropfen, der in das Lumen des Gefäßes paßt (Fig. 5).

Ferner wandte er, um das Umgießen zu vermeiden, das Abmessen des Toxins und das Mischen des Toxins mit Antitoxin direkt in einer solchen Spritze an, indem er die Spitze vorher in sterilisierte „Albolene" tauchte. Dies wirkt als ein temporärer Pfropfen, der die Flüssigkeit verhindert, vor der Injektion auszufließen.

Zu Toxin-Antitoxinmessungen hat Rosenau eine ganze Batterie solcher Spritzen, die in einem besonderen Stativ angebracht sind (Fig. 6).

Hat man eine größere Reihe von Tieren zu injizieren, so muß man vorher die Gefäße oder die Spritzen wie auch die Tiere genau zeichnen, da man sonst leicht Verwirrung hervorbringt.

Ist es aus irgend einem Grunde erwünscht, die Verdünnung zu vermeiden, so kann man als Spritze eine Kapillarpipette gebrauchen, an deren Ende eine Kanüle zugeschliffen ist, welche mit einem abschraubbaren Stempel oder einem ähnlichen Stempel wie dem von Küster angebenen versehen ist.

Methodik der Toxinmessung.

Man unterscheidet nach Ehrlich zwischen der Bestimmung des direkten und der des indirekten Giftwertes. Ersterer ist ein Ausdruck für die toxischen Eigenschaften des Giftes, letzterer ist wesentlich durch dessen antitoxinbindendes Vermögen bedingt.

Der **direkte Giftwert** wird dadurch bestimmt, daß man einem gleichartigen Tiermateriale steigende Mengen des Giftes einspritzt. Zu einem genauen Studium der Toxine ist eine Versuchsreihe erforderlich, die genügend umfassend ist. Man beginnt mit den kleinsten Mengen, die überhaupt keine toxische Wirkung hervorbringen, und steigt zu den großen Dosen, die kräftige Ausschläge veranlassen.

Man bestimmt, welche Menge durchaus keine krankhaften Symptome bewirkt, darauf diejenige, bei welcher die ersten Anzeichen der Vergiftung auftreten, den Schwellungswert, entweder als Abnahme des Gewichts oder als lokales Ödem, als Krämpfe oder als Lähmung; hierbei muß man darauf bedacht sein, daß die Giftwirkung tardiv, mehrere Wochen nach der Einverleibung, unter der Form der Lähmung, der allgemeinen Kachexie, des

Fig. 5. (Nach Rosenau.) Modifizierte Kochsche Spritze.

Gewichtsverlustes eintreten kann. Es ist ziemlich häufig, daß Tiere, die eine Gifteinverleibung dem Anschein nach gut überstanden haben, später dennnoch dahinsiechen und ohne besondere Symptome zugrunde gehen, wie sie auch Spuren der Toxineinverleibung dadurch zum Ausdruck bringen, daß sie für interkurrente Krankheiten stärker empfindlich sind als ganz frische Tiere.

Fig. 6. Batterie von Spritzen.

Wenn die Dosis allmählich ansteigt, werden die Vergiftungssymptome stärker und einzelne der Tiere sterben; darauf kommt eine Zone, wo die meisten Tiere sterben und die Zeit, die bis zum Tode verfließt, wird immer kürzer, bis sie ihr Minimum erreicht.

Bekanntlich stellen sich die Anzeichen der Krankheit nicht sofort nach der Einverleibung eines Toxins ein, sondern erst nach Verlauf einer gewissen Zeit, der Inkubations- oder Latenzzeit (siehe El Torgifte ohne Inkubation*)), deren Dauer innerhalb gewisser Grenzen von der Dosis abhängig ist, die sich aber, wenn die Dosis auch noch so groß wird, nicht unter ein gewisses Minimum hinabdrücken läßt.

Man kann also eine gewisse Menge Gift einverleiben, ohne toxische Erscheinungen wahrzunehmen; dies ist natürlich nicht damit gleichbedeutend, daß die Menge für den Organismus ohne Belang ist; es können sich z. B. Antikörper bilden usw. Man vermutet, daß das Gift durch das normale Antitoxin des Organismus oder in unempfindlichen Zellen gebunden wird; Anzeichen einer Vergiftung treten erst ein, wenn die Dosis vergrößert wird. Das Intervall zwischen diesem und der Dosis, bei welcher der Tod eintritt, ist bei den verschiedenen Giften sehr schwankend und heißt die Empfindlichkeitsbreite.

Dosis und Wirkung werden sich gewöhnlich nicht direkt proportional sein, so daß z. B. eine doppelte Dosis die doppelte Wirkung geben sollte. Das Verhältnis läßt sich ganz im allgemeinen durch die in der Fig. 7 wiedergegebene Kurve ausdrücken, wo die Menge des Giftes längs der Abszissenachse, die Wirkung, durch die zum Tode des Tieres erforderliche Zeit ausgedrückt, als die entsprechenden Ordinaten angesetzt

*) Siehe KRAUS: Toxine des Choleravibrio etc. dieses Handbuch.

ist. Bei steigenden Dosen steigt die Todeszeit, anfangs geschwind, darauf immer langsamer.

Um die Toxizität zu messen und die Stärke verschiedener Toxinlösungen zu vergleichen, bedient man sich einer willkürlichen Einheit, der Toxineinheit. Diese, die tötliche Minimaldosis, Dosis minima letalis genannt, der Kürze wegen bisweilen nur als T bezeichnet, wird rücksichtlich der verschiedenen Toxine auf verschiedene Weise bestimmt. Giftdosen, die mehr Zeit als 6—14 Tage beanspruchen, sind ungeeignet, weil derartige Bestimmungen sehr unsicher sind. Während einer so lange dauernden Vergiftungsperiode werden eine Reihe zufälliger Umstände Einfluß darauf haben, ob das Versuchstier stirbt und in diesem Falle auch darauf, wann es stirbt.

Fig. 7. Verhältnis zwischen Giftdosis und Giftwirkung.

Sehr hohe Dosen lassen sich nur schwierig benützen, weil sogar verhältnismäßig große Änderungen nur kleine Verschiedenheiten der Todeszeit darbieten. Die gleichmäßigsten Resultate erzielt man durch Dosen, die in 3—5 Tagen töten und diese sind denn auch das am häufigsten angewandte Maß.

Indes ist eine solche Behandlung des Materials ziemlich unvollständig, und die Bestimmung der toxischen Einheit ist ganz dem Ermessen des Beobachters anheimgestellt und wird recht willkürlich, wenn man bedenkt, daß in jeder größeren Versuchsreihe stets große Unregelmäßigkeiten vorkommen. Nur wenige Versuche kommen der Bestimmung wirklich zugute, während die oberhalb und unterhalb liegenden Resultate nur als Abgrenzung Wert haben.

Eine bedeutend bessere Verwertung des Materials erlangt man durch ein Verfahren, das dem bei der Behandlung physikalischer Beobachtungen angewandten analog ist. Nach Einverleibung der in der Tabelle 1, Kol. 1 angegebenen Dosen Gift gewahrt man den Tod nach den in der Kol. 2 angeführten Zeiten. In dieser Reihe ist die tötliche Minimaldosis 0,0015,

0,0017 oder 0,002 ccm, je nachdem man sie nach einer Todeszeit von 5—6, von 4—5 oder von 3—4 Tagen bestimmt. Die anderen Bestimmungen erhalten dann keine direkte Bedeutung für die Bestimmung der Toxizität.

Tabelle 1.

Dosis in ccm	Tod nach Tagen	Toxin-einheiten	Toxizität × 1000
0,0023	2	1,25	184
—	3	1,05	219
0,0020	3	1,05	190
—	3,5	0,97	206
0,0017	4,5	0,85	200
—	4,0	0,91	187
0,0015	5	0,8	188
—	6	0,71	211
0,0013	6	0,71	183
—	lebt	0,4	325

Mittel = 209,3.

Wählen wir rein willkürlich zur Einheit diejenige Menge Gift, die in 3,3 Tagen tötet, so sehen wir, daß 0,002 ccm dieser zunächst kommen, jedoch ein wenig höher sind, indem die beiden 3 und 3,5 Tage im Mittel also 3,25 Tage ergaben.

Aus der unten wiedergegebenen Tabelle 2 geht hervor, daß die Dosis letalis in diesem Falle 0,00196 ccm beträgt. Ferner sehen wir, daß die in 5,5 Tagen (der mittleren Zahl von 5 und 6) tötende Dosis 0,0015 ccm ist, d. h. 0,765 der Dosis letalis. Ähnlicherweise kann man bestimmen, einem wie großen Bruchteile der Dosis letalis jede beliebige Todeszeit entspricht.

Aus einem großen Material bestimmmten Arrhenius und Madsen[3]) folgende Tabelle für das Diphtherietoxin:

Tabelle 2.

Todeszeit in Tagen	entspricht D. l.	Todeszeit in Tagen	entspricht D. l.
1	1,6	5	0,80
1,5	1,4	6	0,71
2	1,25	7	0,64
2,5	1,15	8	0,59
3	1,05	9	0,55
3,3	1,00	10	0,51
3,5	0,97	12	0,45
4	0,91	14	0,4
4,5	0,85	> 14	< 0,4

Mit Hilfe dieser Tabelle kann man bestimmen, wieviele Toxineinheiten es in den in der Tab. 1 behandelten Versuchen gibt (Kolonne 3). In der Kolonne 4 ist die Toxizität des Giftes angeführt als das Verhältnis zwischen der Dosis und den entsprechenden Toxineinheiten (der Übersichtlichkeit wegen mit 1000 multipliziert). Wie man sieht, sind die Werte der Toxizität schwankend, sie lassen sich aber doch als das Mittel aller Beobachtungen bestimmen.

Gewöhnlich sind die Resultate viel weniger regelmäßig als die in der Tabelle 1 angeführten; diesem Übelstand vermag ein hinlänglich großes Material abzuhelfen.

Es ist entschieden am besten, zu einer genauen Bestimmung der Toxizität, Tiere desselben Gewichts zu gebrauchen. Freilich kann man erforderlichenfalls die Versuche auf ein gewisses Gewicht reduzieren; die Angabe der Dosis letalis pr. kg Tier, die bei pharmakologischen Messungen üblich ist, eignet sich indes weniger für Toxine; es gibt kein absolutes Verhältnis zwischen Dosis und Gewicht. Eine allgemeine Regel auf Basis des vorliegenden Materials läßt sich nicht geben. Mitunter scheinen sehr junge Tiere verhältnismäßig mehr, mitunter weniger empfindlich zu sein als ältere Tiere.

Das sicherste und unbestreitbarste toxische Maß ist die Bestimmung der Todeszeit.

Auch die anderen toxischen Ausschläge, Gewichtverlust und Krämpfe, lassen sich ähnlichen Prinzipien gemäß zahlenmäßig registrieren, hierzu ist aber einige Übung in der Behandlung der Zahlen erforderlich.

Handelt es sich um die Bestimmung eines frisch gewonnenen Giftes, so dürfen die Versuche sich nicht über einen gar zu langen Zeitraum erstrecken, da man sonst Gefahr läuft, daß das Gift sich während der Anstellung der Messungen abschwächt. Am besten macht man eine Vorprobe, unter deren Anleitung man dann eine große Anzahl Versuche zu gleicher Zeit unternimmt. Zu jeder Dosis muß man wenigstens 2 Tiere anwenden, da man hierdurch am leichtesten über die Versuchsfehler ins reine kommt.

Bei der Beurteilung der Resultate muß man bedenken, daß Tiere selbst von genau demselben Gewicht und unter denselben Verhältnissen gehalten bei weitem nicht als ein gleichartiges Material zu betrachten sind Nach ihrer Empfindlichkeit für die betreffenden Gifte kann man eine Skala von den am meisten bis zu den am wenigsten empfindlichen aufstellen. Die Extreme mit der hohen und der niedrigen Resistenz werden verhältnismäßig am seltensten gefunden, die Hauptmasse wird eine gewisse mittlere Empfindlichkeit darbieten. In der untenstehenden kleinen Versuchsreihe bekamen 7 Meerschweinchen von einem Gewicht von 250 g je 0,006 ccm und 7 je 0,007 ccm desselben Diphtherietoxins. Das Ergebnis war folgendes:

0,006 ccm	0,007 ccm
1. lebt	1. † 8½
2. † 9*)	2. † 5
3. † 7½	3. † 5
4. † 7½	4. † 5
5. † 5	5. † 4
6. † 2½	6. † 3
7. † 1½	7. † 2½

In der zweiten Reihe scheint No. 1 merkbar mehr, No. 6 und 7 merkbar weniger resistent zu sein als die 4 anderen, die eine mittlere Resistenz repräsentieren. Ein Vergleich der beiden Versuchsreihen zeigt, daß eine gewisse Anzahl Versuche erforderlich ist, um zwischen Dosen wie 0,006 und 0,007 ccm unterscheiden zu können. Bei einer kleinen Anzahl von Versuchstieren, z. B. No. 5, 6 und 7 der ersten und No. 1, 2 und 3 der zweiten Reihe würde man die Vorstellung erhalten haben, daß 0,007 ccm eine schwächere toxische Wirkung entfalte als 0,006 ccm. Um den Unterschied eines gewissen Prozents der Dosis mit Sicherheit zu messen, ist eine gewisse Menge von Versuchen notwendig, und je

---

*) † nach 9 Tagen.

genauere Resultate man wünscht, um so mehr Versuche muß man anstellen.

Gesetzt, daß eine sehr große Anzahl Versuche vorlägen, so würden diese sich so um ein gewisses mittleres Resultat gruppieren, daß dasselbe sich ohne Schwierigkeit bestimmen ließe, welche Methode man bei der Wahl desjenigen Resultates anwenden möchte, das man als das mittlere Resultat bezeichnen wollte; die Abweichungen der übrigen von diesem wären dann als zufällige aufzufassen. Da man indes gewöhnlich nur über eine ziemlich begrenzte Anzahl gleichartiger Versuche verfügt, und da es sich häufig erweist, daß einzelne derselben so große Abweichungen von den anderen ergeben, daß von vornherein der Verdacht erregt wird, sie seien besonderen Verhältnissen zu verdanken, so könnte man ein Verfahren benutzen, welches an das von la Place als „Méthode de position" bezeichnete erinnert, indem alle Resultate nach ihrer Größe geordnet werden, worauf man die äußersten — gleich viele an jeder Seite — ausschaltet, bis nur ein einzelnes oder einige einzelne zurückbleiben, die mit hinlänglicher Genauigkeit miteinander übereinstimmen. Mittels dieses Verfahrens würde man in den beiden oben angeführten Beispielen zu † 7 1/2, bezw. † 5 als Charakteristik der Reihen gelangen.

Im Gegensatz hierzu ist das bisweilen übliche Verfahren, wenn ein Resultat außer der Reihe fällt, das betreffende Versuchstier willkürlich als über- resp. unterempfindlich auszuschalten, ganz unerlaubt, und widerspricht vollständig der in den exakten Naturwissenschaften zulässigen Methode, wenn man nicht vor dem Versuche Ursache hatte, eine abnorme Empfindlichkeit zu vermuten.

Da zu einer brauchbaren Toxinmessung große Mengen von Versuchstieren erforderlich sind, wird man unter gewöhnlichen Verhältnissen auf die üblichen kleinen Laboratoriumtiere, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten, Mäuse und Tauben angewiesen sein. Es ist von größter Wichtigkeit, daß die Tiere möglichst gleichartig sind; man sollte sie selbst züchten, um sicher zu sein, daß sie alle auf dieselbe Weise behandelt werden. Gänzlich lassen sich die individuellen Verschiedenheiten nicht vermeiden, das Resultat wird aber ein viel weniger gleichmäßiges, wenn man ein zufällig aufgegriffenes Material benutzt. Unter allen Umständen muß man frischangekaufte Tiere ein paar Wochen im Tierstalle halten, bevor man sie injiziert. Die Käfige müssen geräumig sein. Die Tiere soll man leicht beobachten können, ohne sie einzufangen. Dies wird dadurch erleichtert, daß man statt der häufig gebrauchten Bezifferung der Ohren die Farbe der Versuchstiere notiert oder sie einzeichnet; Meerschweinchen z. B. durch ein mittels eines Stempels dargestelltes Diagramm der Konturen des Tieres, in welches die Farbe desselben mit farbigen Bleistiften eingetragen wird. Es dürfen nicht gar zu viele Tiere beisammen sein, damit ein krankes nicht von gesunden behelligt wird. Großes Gewicht ist auf gleichmäßige Fütterung und Temperatur zu legen. Da die Wärmeregulation vergifteter Tiere oft Störungen erleidet, wird Abkühlung den Tod beschleunigen können, mithin die Todeszeit gänzlich entstellen. Dasselbe gilt von der Manipulation, die deshalb soweit als möglich unterbleibt; das Wägen und die Temperaturmessungen sind mit äußerster Vorsicht anzustellen, und immer um dieselbe Tageszeit, vor der Fütterung, da das Gewicht der Tiere physiologisch täglich um etwa 10% des Körpergewichtes schwankt. Das Wägen geschieht am schnellsten mittelst einer Federwage. Nach

dem Tode ist stets eine Sektion vorzunehmen, um aus den pathologisch-anatomischen Änderungen der Organe, eventuell durch bakteriologische Untersuchung derselben festzustellen, daß das Tier unter Anzeichen einer toxischen Vergiftung gestorben ist, sonst aber an keiner anderen Krankheit litt. Ist letzteres der Fall, so muß man den Versuch aus der Versuchsreihe ausschalten.

Unter den verschiedenen Arten, wie man das Toxin einverleiben kann: subkutan, intraperitoneal, intravenös, intramuskulär, intrapleural, intracerebral, intrastomachal usw., werden namentlich die drei ersten in Betracht kommen, wenn es sich um Messungen handelt. Am schwächsten wirken die Toxine durchweg subkutan, stärker dagegen intraperitoneal, intravenös und cerebral.

Der **indirekte Giftwert** ist ein Ausdruck für das Vermögen des Toxins, Antitoxin zu binden. Diese Lehre wurde zuerst von Ehrlich mit Bezug auf das Tetanus- und namentlich das Diphtheriegift entwickelt und wird gemeinschaftlich mit letzterem Gifte besprochen werden (s. Madsen, Diphtherietoxin).

Die Bestimmungen werden wie folgt unternommen: Man stellt eine Reihe Mischungen aus einer gegebenen Menge Antitoxin (z. B. 1 Immunitätseinheit) und steigenden Mengen Gift dar, die man ein paar Stunden bei 37° stehen läßt, damit sich die gegenseitige Reaktion vollziehen kann, und die man darauf einer Reihe gleichartiger Tiere einverleibt. Die Mischungen mit der kleinsten Toxinmenge sind durchaus unwirksam. Es kommt aber eine Mischung, welche die ersten schwachen toxischen Erscheinungen (Gewichtverlust, lokales Ödem, Krämpfe, Mattigkeit, Parese usw.) hervorbringt. Diese Grenze heißt L_0 (limes). Mit steigenden Giftmengen nimmt die toxische Wirkung zu, und mit einer Menge, die im Laufe von ca. 4 Tagen sicher tötet, hat man einen anderen Grenzwert, L_+, erreicht (Ehrlich). (Näheres s. u. Diphtherietoxin.)

Durch zahlreiche Versuche ist es dargelegt worden, daß die toxischen Eigenschaften eines Toxins abgeschwächt werden oder ganz verschwinden können, ohne daß dessen antitoxinbindendes Vermögen abnimmt. Dies läßt sich nach Ehrlich am besten dadurch erklären, daß man annimmt, die Toxine bestehen aus 2 verschiedenen Gruppen, aus einer toxophoren, welche die Trägerin der toxischen Funktion und verhältnismäßig labil ist, und einer haptophoren, die weit stabiler ist, und die das Antitoxin bindet.

Die Technik bei hämolytischen Versuchen.

Mehrere Toxine (die Hämotoxine) sind durch ihr Vermögen, rote Blutkörperchen zu lösen, charakterisiert. Im folgenden will ich eine kurze Darstellung derjenigen Technik der Bewertung geben, wie sie im dänischen Seruminstitut geübt wird.

Vorerst ist zu bestimmen, auf welche Blutkörperchen das Gift wirkt. Zu Messungen und Versuchen im großen sind diejenigen Erythrocyten vorzuziehen, die man sich am leichtesten in größerer Menge verschaffen kann (Pferd, Rind, Schaf, Ziege, Schwein, Kaninchen). Vom Kaninchen kann man bis 20—30 aus einer Ohrvene, größere Mengen aus einem Halsgefäße erhalten. Narkose sollte man vermeiden, da Narkotika wie Äther und Chloroform in die Erythrocyten aufgenommen werden und deren Resistenz ändern. Menschenblut läßt sich aus einer

Fingerpulpa oder einem Ohrläppchen entnehmen, größere Mengen saugt man mittelst einer sterilen Spritze aus einer Armvene auf oder erhält sie aus der Placenta durch die Nabelvene. Das Blut der größeren Tiere (Pferd, Rind) wird am Schlachthause direkt beim Schlachten aufgefangen.

Das Blut wird in einem Kolben mit nicht gar zu engem Halse aufgefangen, in welchem sich einige Stahldrahtspiralen oder Porzellanschrott befinden. Sobald das Fibrin durch heftiges Schütteln ausgeschieden ist, kann man es mittels Filtrierens durch Gaze entfernen. Die Blutkörperchen werden vom Serum befreit entweder durch spontanes Sedimentieren in einem Glasgefäß oder besser durch Zentrifugieren. Die Blutkörperchen müssen zweimal gewaschen werden, indem man sie in einer reichlichen Menge isotonischer Kochsalzlösung aufschwemmt und zentrifugiert.

Sehr bequem läßt sich mit Blutkörperchen von Pferden arbeiten, teils weil solche nur selten spontane Hämolyse zeigen, teils weil sie sich sehr schnell und vollständig von ihrem Serum trennen lassen. Ein Vorteil ist es ebenfalls, wenn dasselbe Tier das Blut zu den Versuchen liefert, da man hierdurch größere Gleichartigkeit erzielt. Jedoch schwankt die Empfindlichkeit der Erythrocyten eines und desselben Tieres zuweilen ziemlich bedeutend von Tag zu Tag, und zwar nicht so, daß die Empfindlichkeit für alle Gifte zugleich zunimmt oder abnimmt; sie kann sich als für einige verändert erweisen, während sie für andere unverändert ist.

Das Blut sollte man zu den Versuchen jeden Tag frisch nehmen, doch läßt es sich 2—3 Tage lang aufheben, am besten in seinem eigenen Serum, viel weniger gut in einer Aufschwemmung mit Kochsalz Die Temperatur muß niedrig sein, 5—10°, doch nicht um 0° herum, um das Gefrieren und die Lackfärbung der Blutkörperchen zu verhindern. Immerhin verändert sich das Blut ein wenig, und man kann sich nicht darauf verlassen, daß die Resultate an aufeinander folgenden Tagen die nämlichen werden.

Die Blutkörperchen werden in einer isotonischen Salz- oder Zuckerlösung aufgeschwemmt. Zu unseren Versuchen mit Pferdeblut benutzten wir eine 1%ige Aufschwemmung in 0,9% NaCl-lösung oder 2,5% Na_2So_4-lösung.

Blutkörperchen von Kaninchen erhalten sich gewöhnlich gut in 0,85 % NaCl-lösung, in einigen Fällen tritt aber Agglutination ein; dann kann man eine schwächere Salzkonzentration (0,75 %) versuchen.

In der Aufschwemmung von Blutkörperchen des Kaninchens gewahrt man nicht selten spontane Hämolyse; derartiges Blut darf nicht benutzt werden. Die Blutkörperchen des Pferdes sind in dieser Beziehung besser, zuweilen findet sich aber, sogar mehrere Tage nacheinander bei demselben Tier, eine starke Agglutination der Erythrocyten, welche den Gebrauch des Blutes verbietet.

Es kann zutreffen, daß Blut, das mit gewissen, lange Zeit hindurch benützten Pipetten oder Gläsern in Berührung gekommen ist, große Neigung zu spontaner Hämolyse hat; entdeckt man diese Eigenschaft an Glasutensilien, so muß man diese sofort kassieren; es ist vorteilhaft, hauptsächlich nur neue Geräte aus Jenaglas anzuwenden.

Flüssigkeiten und Geräte, die zur Blutverdünnung dienen, sollten immer steril sein.

Handelt es sich darum, die Stärke zweier Lysinlösungen zu vergleichen, so verfährt man folgendermaßen:

Zu jeder der beiden Lysinlösungen, über deren ungefähre Stärke man sich mittels eines groben Versuches orientiert hat, gebraucht man 15 Reagenzgläschen gleicher Größe, die z. B. in einem soliden Metallstativ mit 2 Reihen Reagenzgläschen angebracht werden. Diese müssen aus Jenaglas sein, und es ist mit peinlichster Sorgfalt darauf zu achten, daß sie trocken sind und vor allen Dingen keine Überreste von Lysin, Antilysin, Säure, Alkali u. dgl. enthalten. In den Gläsern werden die in der Tabelle, Kolonne 2, angegebenen Mengen Lysin abgemessen. Das Messen geschieht mittelst einer sorgfältig graduierten Pipette, die wie gewöhnlich unter einem Winkel von 45° an die Wand des Reagenzglases gehalten wird; häufig benutzt man graduierte 1 ccm Vollpipetten (Fig. 4 *b*) die indes den Übelstand haben, daß, während die anderen Dosen beim Ausfliessen als die Differenz zwischen zwei Teilstrichen gemessen werden, beim letzten $^1/_{10}$ ccm, wenn es ausfließt, leicht ein wenig Ungenauigkeit entsteht. Man arbeitet deshalb genau mit gewöhnlichen graduierten Pipetten, bei welchen der unterste Teilstrich eine kurze Strecke von der Spitze sich befindet. (Fig. 4 *c*).

Es sei hier vielleicht erlaubt, darauf aufmerksam zu machen, daß sich bei Bestimmungen der Toxizität (an Tieren, Blutkörperchen, Bakterien usw.) die allgemeine physiologische Regel geltend macht, daß man, wenn eine gegebene Menge Lysin eine gewisse hämolytische Wir-

Tabelle 3.

Tetanolysin A						Tetanolysin B					
Nr. des Glases	Lysinmenge in ccm a	Vol.-Korrekt. 0,9% NaCl-lösung in ccm 1—a	Aktive Menge Lysin a-0,04	Hämolyse in %	Toxizität	Nr. des Glases	Lysinmenge in ccm a	Vol.-Korrekt. 0,9% NaCl-lösung in ccm 1—a	Aktive Menge Lysin a—0,01	Hämolyse in %	Toxizität
1	1,0	0	0,96	100	—	1	0,2	0,8	0,19	100	526
2	0,8	0,2	0,76	100	132	2	0,16	0,84	0,15	90	600
3	0,65	0,35	0,61	90	148	3	0,13	0,87	0,12	75	625
4	0,5	0,5	0,46	70	152	4	0,1	0,9	0,09	60	666
5	0,4	0,6	0,36	55	153	5	0,08	0,2	0,07	45	643
6	0,32	0,68	0,28	42	150	6	0,065	0,35	0,055	35	636
7	0,25	0,75	0,21	30	143	7	0,05	0,5	0,04	25	625
8	0,2	0,8	0,16	20	125	8	0,04	0,6	0,03	20	666
9	0,16	0,84	0,12	18	150	9	0,032	0,68	0,022	16	727
10	0,13	0,87	0,09	14	155	10	0,025	0,75	0,015	9	600
11	0,1	0,9	0,06	8	133	11	0,02	0,8	0,01	6	600
12	0,08	0,2	0,04	6	150	12	0,016	0,84	0,006	4	666
13	0,065	0,35	0,025	3	120	13	0,013	0,87	0,003	Spürchen	
14	0,05	0,5	0,01	Spürchen		14	0,01	0,9	0	0	
15	0,04	0,6	0	0		15	0,008	0,92		0	
Kontrolle	0	1,0		0		Kontrolle	0	1,0		0	
				Mittel 142,6						Mittel 632	

kung erzeugt, um einen merkbaren Zuwachs dieser Wirkung zu erzielen, einen Zuwachs der Lysinmenge anwenden muß, der eben diesem Quantum proportional ist. Kann man z. B. bei Versuchen zwischen der Wirkung von 0,18 ccm und der von 0,20 ccm Lysin einen eben merklichen Unterschied beobachten, so will das nicht heissen, daß ein Unterschied von 0,02 ccm Lysin stets eine deutliche Variation der hämolytischen Wirkung gebe, sondern nur, daß Dosen, die um 10% differieren, dies tun. Bei diesem Toxin wird man nicht zwischen 1 ccm und 0,95 ccm unterscheiden können, wohl aber zwischen 1 ccm und 0,9 ccm.

In den beiden Reihen der Reagenzgläser kommen so kleine Dosen, unter 0,1 ccm, vor, daß die Flüssigkeit im Verhältnisse 1 ccm Toxin zu 9 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden muß. Da man bei hämolytischer Arbeit viele Verdünnungen gebraucht, tut man wohl daran, eine größere Reihe Vollpipetten (von 9 ccm, 4,5 ccm etc.) vorbereitet zu haben, mit denen man die erforderliche Anzahl Reagenzgläser oder Fläschchen beschickt. Zu diesem Zweck mißt man mittels der graduierten Pipette 1 ccm ab, man schüttelt die Mischung gut mit 9 ccm Verdünnungsflüssigkeit durch, spült die Pipette erst gründlich mit steriler Kochsalzlösung und darauf ein paarmal mit der Verdünnung aus, worauf man abmißt. Gewöhnlich erreicht man die genauesten Resultate, wenn die abgemessenen Mengen nicht kleiner sind als 0,1 ccm, bei gut verarbeiteten Pipetten kann man jedoch bis auf 0,05 ccm herabgehen, wenn man ein erneuertes Verdünnen zu vermeiden wünscht; ein solches bewirkt nämlich oft Sprünge der Resultate, die nicht auf Meßfehlern beruhen, sondern darauf, daß mehrere Erscheinungen durch das Verdünnen Änderungen erleiden.

Da das abgemessene Quantum Giftlösung zwischen 1,0 und 0,1 ccm schwankt, oder da später eine konstante Menge Blutaufschwemmung (z. B. 4,5 oder 9 ccm) hinzugesetzt wird, würden die Konzentrationen bedeutende Schwankungen erleiden, wenn man nicht dafür sorgte, daß das Volumen der zugefügten Giftlösung konstant bleibt, nämlich 1 ccm. Dies geschieht dadurch, daß man das in der Kolonne 3 angegebene Quantum Kochsalzlösung hinzufügt.

Handelt es sich um größere Versuchsreihen, so ist es nicht angemessen, das Toxin in den Reagensgläsern gar zu lange der Luft und dem Lichte auszusetzen; es ist deshalb vorzuziehen, 1) das volumkorrigierende Quantum Kochsalzlösung zuzusetzen, 2) das Toxin abzumessen und endlich 3) die wohlgeschüttelte Aufschwemmung der Blutkörperchen hinzuzufügen. Dies kann mittels verschiedener Verfüllapparate geschehen. Bequem und schnell ist bei dem Abmessen eine gute Metallspritze zu gebrauchen, die auf das gewünschte Quantum, im genannten Beispiele 9 ccm, genau eingestellt ist.

Hat man hinlängliches Toxin und hinlängliche Blutaufschwemmung zur Verfügung, so ist es vorteilhaft, mit ca. 10 ccm Flüssigkeit zu arbeiten, da das Versenken der Blutkörperchen und das Ablesen hierdurch erleichtert werden; sonst muß man sich mit geringeren Mengen, 2—5 ccm begnügen, und man gebraucht dann im ganzen nur 0,5 ccm Giftlösung + 1,5, bezw. 4,5 ccm Blutaufschwemmung.

Dieses Zusetzen von Blutkörperchen muß schnell und in einem kräftigen Strahle stattfinden, und unmittelbar darauf sind die Gläser tüchtig zu schütteln. Es ist wichtig, das Blut dem Lysin auf diese Weise zuzusetzen. Geschieht dies in umgekehrter Reihenfolge, so

wird das Lysin, wenn bis zum Schütteln des Glases einige Zeit verstreicht, an die oberste Schicht der Blutkörperchen gebunden werden; beim späteren Schütteln des Glases wird für die übrigen Schichten fast nichts freigeblieben sein. Das Resultat kann dann so ausfallen, daß in einem nicht geschüttelten Glase 50—100 % weniger Hämolyse gefunden wird als in einem geschüttelten Glase.

Die Stative werden darauf in den Thermostaten gebracht, vielleicht in ein großes OSTWALDsches Wasserbad mit konstanter Temperatur (Regulator, Rührer).

Die Schnelligkeit der Lysinwirkung (der Präzipitine und der Agglutinine) wächst wie die der meisten anderen Stoffe mit der Temperatur an, für jeden fünften Grad, den die Temperatur zunimmt, fast um das Doppelte, bis die Temperatur so hoch wird, daß der aktive Stoff (Lysin usw.) destruiert wird. In der Praxis eignet sich am besten zu hämolytischen Versuchen die Temperatur um 37° herum. Es gibt indes Ausnahmen; unter gewissen, bisher noch unbekannten Umständen liegt das Optimum niedriger, um ca. 25° herum, und einige Schlangengifte wirken am kräftigsten bei Temperaturen unter 10°. Am sichersten geht man, wenn man sich durch besondere Versuche von den Verhältnissen überzeugt.

Eine gegebene Menge von Hämolysin hat eine gewisse hämolytische Wirkung zur Folge, die bei niedriger Temperatur sehr langsam, bei höherer Temperatur aber schnell vor sich geht; in der Regel wird die Gesamtwirkung nach einem etwa zweistündigen Aufenthalt in einem Wasserbade bei 37 % erreicht sein. Während dieser Zeit kann man die Fortschritte des Vorganges verfolgen, indem bei den höchsten Dosen vollständige Hämolyse eintritt, während bei geringeren Dosen die ursprüngliche „Deckfarbe“ der Blutaufschwemmungen zum Teil durch eine mehr oder weniger ausgesprochene „Lackfarbe“ ersetzt wird, als Kennzeichen, daß eine gewisse Menge von Blutkörperchen aufgelöst ist. Wie weit die Hämolyse gediehen ist, vermag man jedoch nicht zu entscheiden, solange die nicht aufgelösten Erythrocyten sich noch in der Flüssigkeit suspendiert befinden. Man muß dieselben zu Boden setzen lassen, indem man entweder die Gläser zentrifugiert oder sie auch ganz einfach nach dem Herausnehmen aus dem Wasserbade bis zum nächsten Tage bei niedriger Temperatur stehen läßt. Es ist wichtig, daß die Temperatur nicht zu hoch ist, da sonst oft spontane Auflösung der Blutkörperchen und violette Färbung des Hämoglobins eintritt, was die Messungen in hohem Grade stört.

Nach Verlauf von 16—20 Stunden werden die nicht aufgelösten Blutkörperchen zu Boden gesunken sein, während die darüber stehende Flüssigkeit sich mehr oder weniger wie Hämoglobin gefärbt hat. Oft sieht man, daß die Hämoglobinfärbung nicht überall im Glase dieselbe Intensität hat, sondern nach unten zunimmt, während die oberste Schicht nur wenig oder gar nicht gefärbt ist. Dies kommt daher, daß es eine gewisse Latenzzeit gibt, bevor die Auflösung stattfindet, und im Laufe dieser Zeit senken sich die Blutkörperchen etwas zu Boden. Hierdurch kann man die Latenzdauer unter den Bedingungen, bei welchen der Versuch stattfindet, geradezu messen. Sie ist z. B. stark von der Temperatur abhängig, und in Versuchen bei niedriger Temperatur, wo der hämolytische Prozeß, wie oben erwähnt, sehr lange Zeit erfordert, ist es sehr wohl möglich, daß die Blutkörperchen fast bis ganz an den Boden sinken, bevor die Auflösung eintritt.

Diese Senkungszonen erschweren einen kolorimetrischen Vergleich der Stärke der Hämolyse in bedeutendem Maße, was sich indes vermeiden läßt, wenn man alle Blutgläschen sofort, nachdem man sie aus dem Wasserbade herausgenommen hat, sorgfältig schüttelt, ehe man sie in den Eisschrank stellt.

Hat man die Dosen richtig gewählt, so wird man am Tage nach dem Versuche alle Stufen der Hämolyse in den Serien vertreten sehen. In den Gläsern mit den größten Mengen Lysins findet man totale Hämolyse; nach und nach wird die Hämoglobinfärbung immer schwächer, und endlich trifft man Proben mit ganz schwachen Spuren der Färbung (Spur, Kuppe) und solche, die durchaus farblos sind.

Man kann nicht genug betonen, wie wichtig es ist, ein Kontrollglas ohne Lysin zu haben, an welchem sich ersehen läßt, ob keine spontane Hämolyse der Blutkörperchen stattfindet.

Bei der Schätzung der Hämolyse lassen sich verschiedene Grade feststellen. Ein gewisses Quantum Lysin wird an die Erythrocyten gebunden, ohne eine sichtbare Wirkung hervorzurufen.

Die Grenzwerte, Spürchen — totale Hämolyse, sind sehr bequem abzulesen, so lange es darauf ankommt, die Wirkung des Lysins approximativ zu bestimmen, zu quantitativen Messungen sind sie aber ganz unbrauchbar. Beide Grenzen sind nämlich sehr vag. Man hat sich die Blutkörperchen als aus einer Menge von Einzelindividuen bestehend zu denken, die sehr verschiedene Resistenz gegen das Lysin besitzen, von den am meisten bis zu den am wenigsten empfindlichen. Die am meisten empfindlichen bedingen die untere Grenze, und es ist klar, daß eine geringe Variation der Anzahl genügt, um dieselbe erheblich zu verschieben. Sieht man genau nach, so erweist es sich, daß Gläser mit anscheinend ganz ungefärbter Flüssigkeit oberhalb der Blutkörperchen beim Vergleichen mit dem Kontrollglase dennoch leicht gefärbt sind, und daß die Grenze „Spürchen Hämolyse" sich unmöglich entschieden feststellen läßt. Dasselbe gilt von der oberen Grenze, indem man häufig wahrnimmt, daß eine geringe Menge offenbar besonders resistenter Blutkörperchen sich sogar bei sehr großen Lysindosen unaufgelöst erhalten.

Die Fehler dieser Bestimmung können bis über 100 % steigen, und es ist offenbar höchst ungeeignet, bei genauen Messungen mit einer Methode zu arbeiten, die nur eine geringe prozentige Menge der Blutkörperchen ins Auge fast.

Weit geringere Fehler erhält man bei einer kolorimetrischen Methode, die die Hauptmenge der Erythrocyten mit mittlerer Resistenz benutzt. Betrachtet man eine Reihe wie die im Versuch Tab. 3, so findet man eine ganze Skala von Farbennüancen, die sich leicht voneinander unterscheiden lassen. Diesen Umstand kann man benützen, um die Stärke zweier Lysinlösungen zu vergleichen, wie dies in der Tabelle geschehen ist.

Hier findet man, daß das Glas 6, Lysin A, dieselbe Farbennüance zeigt wie Glas 5, Lysin B; dasselbe gilt von Glas 8 in beiden Reihen. Mithin beobachtet man dieselbe hämolytische Wirkung bei

Lysin A 0,32 ccm	0,20 ccm	wie bei
„ B 0,08 „	0,04 „	

woraus hervorgeht, daß das Lysin B 4—5 mal stärker ist als das Lysin A.

Es lassen sich recht gute Resultate erzielen, wenn man auf diese Weise ein Glas aus einer Reihe herausnimmt und ermittelt, welches Glas

aus einer Reihe mit einer anderen Lysinlösung dem ersteren an Stärke entspricht. Verwendet man nur 1—2 Gläser hierzu, so ist man indes Zufälligkeiten ausgesetzt, indem gerade diese eine abnorm starke oder schwache Hämolyse darbieten können. Zugleich wendet man dann zur Bestimmung nur diese wenigen Versuche an, während der größte Teil derselben gar nicht in Betracht kommt.

Viel ergiebigere und genauere Aufschlüsse erhält man, wenn man entsprechend jeder einzelnen Lysinmenge die Hämolyse bestimmt. Dies kann kolorimetrisch geschehen. Man bildet eine Farbenskala, indem man 1 ccm Blutkörperchen in 111 ccm Leitungswasser auflöst. Hierdurch erhält man eine Hämoglobinlösung von derselben Stärke wie bei totaler Hämolyse die einer 1% Blutlösung im Versuche (9 Teile einer 1% Blutaufschlemmung + 1 ccm Lysinlösung). Diese bezeichnen wir durch 100 (100% Blutkörperchen aufgelöst).

Durch Verdünnung mit Wasser bildet man sich eine Reihe Hämoglobinlösungen von abnehmender Stärke, z. B.

8 ccm + 2 ccm Wasser (80% Hämolyse)
7 „ + 3 „ „ (70% „

usw., so daß man eine Farbenskala 100, 80, 70, 60, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1 erhält. Diese Skala behält aber nur einige Tage lang ihre Gültigkeit. Eine dauerhaftere läßt sich aus Pikrokarmin und Glyzerin darstellen, das Vergleichen mit den Blutgläsern wird dann aber etwas schwieriger.

Mittelst der Farbenskala mißt man ganz einfach nach Prozenten, wie hoch die Hämolyse in den Reagenzgläschen ist. Bei einiger Übung unterscheidet man ohne Schwierigkeit Nuancen der Hämoglobinmenge von 10%, also unter 45 und 50, unter 18 und 20 usw. Wo die Farbe nicht ganz zu einer der Verdünnungen der Skala paßt, kann man bei einiger Erfahrung abschätzen, welcher derselben sie entsprechen würde. Eine Reihe solcher Messungen ist in der Kolonne 5 der Tabelle 3 angeführt.

Man erhält hierdurch eine Übersicht über die Beziehung der Dosis zur hämolytischen Wirkung. In diesem Falle findet man, daß bei den höheren Mengen eine annähernde Proportionalität derselben stattfindet, die bei kleineren Dosen aber nicht angetroffen wird. Dies beruht wahrscheinlich darauf, daß eine gewisse Menge Lysin (A), ca. 0,04 ccm, von den Blutkörperchen gebunden wird und sich deswegen dem Prozesse entzieht. Zieht man diese 0,04 ccm ab, so erhält man einen Ausdruck für das wirklich wirksame Lysin, siehe Kolonne 4, und hierdurch kommt ein ziemlich konstantes Verhältnis zwischen Dosis und Wirkung zum Vorschein. Die Zahlen finden sich in der Kolonne 6; dieselben sind zugleich ein Ausdruck für die relative Toxizität dieser Lysinlösung.

Vom Lysin B scheint ca. 0,01 ccm von den Blutkörperchen gebunden zu werden, und mittels desselben Verfahrens wie hinsichtlich des Lysins A erhält man in der letzten Kolonne einen Ausdruck für die Toxizität. Diese Behandlung des Materials besitzt erstens den Vorzug, daß man darüber ins reine kommt, ob zwischen Dosis und Wirkung ein Verhältnis, und zwar welches, besteht. Ferner hat man an der Regelmäßigkeit der Toxizitätskonstanten ein Maß für den Fehler, mit dem man arbeitet, und endlich gewinnt man durch die Berechnung von Mittelzahlen der Toxizitätskonstanten ein Maß der Toxizität, das weit genauer ist als die Bestimmung mittels einer einzelnen Dosis, indem dasselbe

aus vielen, hier aus 12 Einzelversuchen gebildet ist. Die beiden auf diese Weise erschienenen Zahlen, A 143, B 632, zeigen, daß ihre Toxizitäten sich wie 1 zu 4,42 verhalten.

Im vorliegenden Falle fand direkte Proportionalität der Dosis zur Wirkung statt, in anderen kommen andere Verhältnisse vor; so fanden Arrhenius und Madsen[1]) bei einigen Präparaten von Tetanolysin, daß die Wirkung dem Quadrat der Toxinkonzentration porportional anwuchs.

Jedes neue Gift ist in dieser Beziehung speziell zu untersuchen.

Um die Tragweite der Schlüsse beurteilen zu können, die man aus seinen Resultaten folgert, muß man die Größe des Versuchsfehlers bestimmen. Bei sorgfältigem Arbeiten läßt dieser sich bis auf durchschnittlich 3—10 % vermindern, häufig bemerkt man aber, daß ganze Serien ohne nachweisbare Ursache außerhalb des Regelmäßigen fallen.

Arbeitet man viel mit Hämolyse, so wird man zuweilen bemerken, daß die größte Wirkung nicht immer auf die größte Menge Lysin folgt.[8,9]) Hat man eine lange Reihe Blutgläser mit abnehmenden Mengen Lysins, z. B. von 1,0 ccm bis 0,001 ccm, so kann man sehen, daß die stärkste Wirkung, totale Hämolyse, bei 3 verschiedenen Lysinmengen, bei 0,6 ccm, 0,05 ccm und 0,007 ccm zu gleicher Zeit eintritt, während dazwischenliegende Dosen weit schwächere Hämolyse ergeben. Hier scheinen unbekannte, vielleicht katalytische, Einwirkungen sich geltend zu machen, welche die Reaktionsgeschwindigkeit der Hämolyse bei diesen Mengen Lysins beschleunigen. Stehen Lysin und Blutkörperchen hinreichend lange in Verbindung miteinander, so erreicht die Hämolyse bei den dazwischenliegenden Dosen gewöhnlich ungefähr dieselbe Höhe wie bei den anderen Dosen, so daß die Ungleichheit ausgeglichen wird. Auch für die Lysine läßt sich der indirekte Giftwert in analoger Weise wie im Tierversuch bestimmen. Wenn man einer konstanten Menge Antilysin zunehmende Quanta Lysin zusetzt, wird erst der Grenzwert L_0 erreicht, wo eben keine Spürchen von Hämolyse vorhanden sind. L_+ ist die Dosis, womit totale Hämolyse erreicht wird.

Wie im Tierversuch ist es auch hier auffallend, daß man nicht durch Zusatz einer total hämolytischen Dosis zu L_0 eine Mischung hervorbringen kann, die totale Hämolyse erzeugt. Gewöhnlich muß man viele hämolytische Dosen zusetzen, um diese Wirkung zu erzeugen.

Um diese Erscheinung zu erklären, stellte Ehrlich seine bekannte Theorie von der Konstitution der Toxine auf. Derselben zufolge bestehen die Toxine aus einer ganzen Reihe von Toxinen mit verschiedener Toxizität und verschiedener Affinität zum Antitoxin. Eine andere Auffassung wurde von Arrhenius und Madsen[1]) zur Geltung gebracht, die der Ansicht sind, daß diese Erscheinungen sich von der Annahme aus erklären lassen, daß die Toxine und die Antitoxine Stoffe von geringer Avidität sind, deren Verbindung zum Teil dissoziiert ist.

Die Toxin-Antitoxinkurve. Eine nähere Besprechung der Theorie der Toxin-Antitoxinfrage ist hier nicht am Platze; es dürfte aber Anlaß vorliegen, das Verfahren zur Untersuchung einer Toxin-Antitoxinkurve in Kürze zu berühren. Dasselbe besteht in einer partiellen Sättigung einer konstanten Menge Antitoxins mit Toxin (Ehrlich). Ein Beispiel hiervon wird unter dem Kapitel „Diphtheriegift“ nähere Besprechung finden.

Als ein anderes Beispiel wird hier die Bestimmung einer Tetanolysin-Antitetanolysinkurve beschrieben.

Zuerst orientiert man sich mittels einer Reihe Vorversuche, wie große Antitoxinmengen notwendig sind. Darauf stellt man den eigentlichen Versuch an.

Nachdem man in 13 kleine sterile Medizinfläschchen oder Reagensgläschen 4 ccm Tetanolysin abgemessen hat, setzt man die in der Tabelle 4 angegebenen Mengen Serum zu. Für diejenigen derselben, die zwischen 0,05 ccm und 0,4 ccm liegen, ist es vorzuziehen, 1 Teil Serum mit 9 Teilen einer 1 % NaCl-Lösung zu verdünnen, damit die Abmessung genauer wird. Die Lysinkonzentration muß in allen Versuchen dieselbe sein, weshalb man zuletzt soviel 0,9% NaCl-Lösung zusetzt, daß das Totalvolumen in allen Flaschen 8 ccm wird.

Die zugepfropften Mischungen bleiben nun so lange im Thermostaten stehen, bis die Reaktion zwischen Lysin und Antilysin abgelaufen ist, was bei 37° gewöhnlich ein paar Stunden dauert.

Der nächste Schritt ist das Messen der hämolytischen Stärke der Mischungen nach dem obengenannten Verfahren.

Tabelle 4.

4 ccm Tetanolysin werden mit den unten angegebenen Mengen von 1) Serum (resp. Serumverdünnung), 2) 0,9% NaCl-Lösung gemischt, so daß das Totalvolumen konstant 8 ccm wird.

Dosis in ccm	0	0,05 [0,5 ccm (1:9)]	0,1 [1 ccm (1:9)]	0,15 [1,5 ccm (1:9)]	0,2 [2 ccm (1:9)]	0,3 [3 ccm (1:9)]	0,4 [4 ccm (1:9)]	0,5	0,7	1,0	1,3	1,6	2,0	ccm Serum
	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,0	0	3,5	3,3	3,0	2,7	2,4	2,0	ccm 0,9% NaCl-Lös.
1,5													0	
1,3										—		0		
1,15														
1,0											0			
0,8									—					
0,65										0	—	—	—	
0,5								—						
0,4										—				
0,32							—		0					
0,25														
0,2						—		0	—					
0,16							0							
0,13					—			—						
0,1						0								
0,08							—							
0,065			—		0									
0,05	—	—		0		—								
0,04			0											
0,032					—									
0,025		0		—										
0,02	0													
0,016			—											
0,013	—	—												

Zu jeder Mischung wurden 6 Reagenzgläser angewandt, und die Mengen (in der ersten Kolonne angegeben) wurden entsprechend den durch die Vorversuche gewonnenen Erfahrungen gewählt.

Die Lysinlösungen standen 2 Stunden lang bei 37° mit den Blutlösungen, und bei dem am folgenden Tage unternommenen Vergleiche wird ein willkürlich aufgegriffenes Glas herausgenommen, dessen Farbenton sich leicht von dem der benachbarten Gläser unterscheiden ließ, nämlich No. 3 der Reihe mit 0,4 ccm Antilysin, das 0,16 ccm enthielt; darauf wird ermittelt, welches Glas der übrigen Reihen ganz dieselbe Farbennüance hatte (mit 0 in der Tabelle bezeichnet). In einigen Reihen war eine genau entsprechende nicht zu finden, z. B. nicht in der Reihe mit Lysin allein ohne Antilysin. Hier lag die gesuchte Farbennüance zwischen 0,2 ccm und 0,25 ccm, der letzteren ein wenig näher, und durch Schätzung wurde sie auf 0,23 ccm bestimmt. In ähnlicher Weise bestimmt man die ganze Reihe hindurch, welche Dosis gleiche Wirkung zeigte und deshalb wahrscheinlich dieselbe Menge freien Lysins enthielt. Das Resultat ist in untenstehender Tabelle 5 angeführt, wo in der ersten Kolonne unter n die zugesetzten Antilysinmengen, in der zweiten diejenigen Mengen der respektiven Mischungen angegeben sind, welche dieselbe hämolytische Wirkung zeigten, und welche deshalb vermutlich dieselbe Menge freien Lysins enthielten.

Tabelle 5.
(Resumé von Tabelle 4.)

Die zu 4 ccm Tetanolysin zugesetzte Menge von Antilysin	Mengen der Mischungen mit gleicher hämolytischer Fähigkeit	Relative Toxizität per 10 ccm berechnet
0	0,023	435
0,05	0,028	357
0,10	0,033	303
0,15	0,045	222
0,20	0,065	154
0,30	0,115	87
0,40	0,16	62,5
0,50	0,23	43,5
0,70	0,38	26,3
1,0	0,6	16,7
1,3	0,9	11,1
1,6	1,25	8
2,0	1,4	7,14

Da die Toxizität einer Mischung gewöhnlich in umgekehrtem Verhältnisse zu derjenigen Menge steht, die angewandt werden muß, so läßt sich die Menge freien Lysins in 1 ccm oder 10 ccm durch die reziproken Werte der Zahlen angeben. Dieselben stehen in der dritten Kolonne (siehe Tabelle 5).

Am leichtesten übersichtlich werden diese Zahlen, wenn man sie als ein Koordinatensystem zeichnet, wo die Antitoxinmengen längs der Abszissenachse, die entsprechenden Toxizitäten aber als Ordinaten verzeichnet werden (siehe Kurve Fig. 8).

In dem angeführten Beispiel wurde der Vergleich nur hinsichtlich einer einzelnen Farbennüance durchgeführt. Man kann denselben nun mit Bezug auf zwei oder mehrere verschiedene wiederholen; hierdurch erhält man verschiedene Kurven, deren Mittelzahl man nehmen kann. Je mehr Kurven man benutzt, um so gleichmäßiger werden die Zahlen und um so weniger ist man zufälligen Abweichungen ausgesetzt. Noch

sicherere Resultate erhält man, wenn man, wie früher erwähnt, die Hämolyse bei jedem einzelnen Versuche kolorimetrisch bestimmt, indem die Toxizität jeder Mischung dann durch sechs statt durch ein oder zwei Versuche bestimmt wird.

Es gibt mehrere Faktoren, die den regelmäßigen Verlauf eines solchen Versuches zu stören vermögen. Zuweilen geben eine oder mehrere Mischungen ein von den anderen Reihen gänzlich abweichendes Resultat Dann muß man vermuten, daß unbekannte Faktoren die Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin beeinflußt haben. In anderen Fällen sieht man die oben erwähnte Erscheinung, daß die Hämolyse bei abnehmenden Mengen bis zu einem gewissen Punkte abnehmen kann, dann aber bei noch geringeren Mengen wieder zunimmt, was selbstverständlich die Beurteilung der Versuche in hohem Grade erschwert.

Fig. 8. Tetanolysin-Antitetanolysin-Kurve.

Versuchsfehler. Bevor man endgültige Schlüsse aus Versuchen zieht, muß man natürlich über die Größe der Versuchsfehler ins reine kommen. Denkt man sich, daß eine große Anzahl von Versuchen auf Messung derselben Größe angestellt werden, so werden gewöhnlich wegen der Unvollkommenheit der zum Messen angewandten Mittel sämtliche Resultate verschieden sein. Denkt man sich ferner, daß die wahre Größe bekannt wäre, so würden die Abweichungen der einzelnen Resultate von dieser Größe die wahren (positiven oder negativen) Fehler sein. Durch die Betrachtung der Größe dieser Fehler erhält man einen Begriff von der Genauigkeit der Messung, die um so größer ist, je kleiner die Fehler sind. Um aber zu einer bestimmteren Auffassung zu gelangen, die es ermöglicht, Vergleiche anzustellen, kann man folgenderweise verfahren. Sämtliche Fehler werden nach ihrer Größe geordnet, indem man mit dem kleinsten Fehler anfängt (d. h. mit demjenigen negativen Fehler, der den größten numerischen Wert hat) und mit dem größten Fehler schließt. Da man annimmt, daß eine große Anzahl Fehler vorliegen, und da numerisch gleichgroße positive und negative Fehler gewöhnlich gleich häufig vorkommen, wird es etwa 50% positive und 50% negative Fehler geben.

Man teilt nun wieder die positiven Fehler in zwei gleich zahlreiche Gruppen, so daß in jeder derselben gerade 25 % der Fehler vorkommen, und dieselbe Teilung unternimmt man rücksichtlich der negativen Fehler. Hierdurch kommt man zu einer Fehlergrenze, dem sogenannten 50 % Fehler oder dem wahrscheinlichen Fehler. Bezeichnet man diesen

als r, so kann seine Größe dazu dienen, die Verteilung der Fehler zu charakterisieren, indem sowohl unterhalb $-r$ als oberhalb $+r$ 25 % der Fehler liegen, während die übrigen 50 % derselben in gleicher Anzahl unter die Intervalle $-r$ bis Null und Null bis $+r$ verteilt sind.

Da man indes nicht, wie oben vorausgesetzt, die wahre Größe kennt, die das Objekt der Messung ist, kann man auch nicht die wahren Fehler finden; man muß sich mit einer Annäherung begnügen.

Nimmt man nun, wie oben, an, daß eine große Zahl Messungen desselben Gegenstandes vorliegen, so kann man sich denken, daß die Resultate dieser Messungen, die der Voraussetzung gemäß nur mit zufälligen Fehlern behaftet sind, nach ihrer Größe geordnet würden. Es liegen dann 50 % der Resultate oberhalb, 50 % unterhalb einer gewissen Größe, der mittelsten der Beobachtung, die somit als der wahrscheinlichste Wert aufzufassen ist, der als das Resultat der Untersuchung angegeben werden kann. 50 % der Messungsresultate sind zu groß. Unter diesen liegen 25 % dem mittleren Resultate zunächst, mit einer Abweichung von demselben, die annähernd r nicht übersteigt. Ebenfalls hat die Hälfte der negativen Fehler eine Abweichung von dem mittleren Resultate, die numerisch kleiner als r ist. Mit anderen Worten: bezeichnet man das mittlere Resultat als M, so werden zwischen $M - r$ und $M + r$ gerade 50 % sämtlicher Meßresultate liegen. Man kann daher das Resultat der fraglichen Messungen durch

$$M \pm r$$

ausdrücken, wodurch man nicht nur die Größe angibt, die als das Resultat der ganzen Reihe von Messungen zu betrachten ist, sondern auch ein Maß der Genauigkeit erlangt, indem man den Spielraum anführt, innerhalb dessen man zunächst diejenige Hälfte der Messungen findet, die sich dem mittleren Resultate anschließt.

Man hat indes an der Angabe des angeführten wahrscheinlichen Fehlers r zugleich ein Mittel, um zu bezeichnen, wie die ganze Verteilung der Fehler sich stellen wird, wenn man das gewöhnlich vorkommende Fehlergesetz anwendet, indem im Intervalle

$$M \pm 2r$$

in den meisten Fällen 82 % sämtlicher Meßresultate liegen werden.

Ebenso liegen im Intervalle

$$M \pm 3r$$

96 % der Meßresultate.

Endlich umschließt das Intervall $M \pm 4r$, 99 % der Resultate, stets unter den angegebenen Voraussetzungen.

Die Genauigkeit einer Reihe von Messungen ist der Größe des 50 % Fehlers oder des wahrscheinlichen Fehlers umgekehrt proportional — und hieran besitzt man nun ein Mittel, um verschiedene Reihen von Messungen miteinander zu vergleichen, wenn sie sich überhaupt vergleichen lassen.

Wenn mehrere Umstände auf das Resultat einer Messung einwirken, so wird jeder derselben seinen Fehler im Resultate hervorbringen.

Nimmt man z. B. an, daß der eine Umstand, wenn er allein wirkte, einen wahrscheinlichen Fehler von r_1 im Resultate erzeugte, während ein anderer Umstand, wenn er allein wirkte, den wahrscheinlichen Fehler r_2 hervorriefe, so wird man, wenn beide Umstände gleichzeitig wirken, einen wahrscheinlichen Fehler des Resultates von $\sqrt{r_1^2 + r_2^2}$ erhalten.

Nimmt man also an, daß die eine Fehlerquelle den wahrscheinlichen Fehler 5, die andere den wahrscheinlichen Fehler 12 gibt, so wird der wahrscheinliche Fehler des Resultates 13.

Ist man nun imstande, die Wirkung der einen Fehlerquelle zu vermindern, so wird das Resultat hierdurch natürlich ein besseres sein. Man hat sich aber klar zu machen, daß die den größten Fehler bewirkende Fehlerquelle auch den überwiegenden Einfluß auf das Resultat erhalten wird, so daß es von Wichtigkeit ist, die verschiedenen in die Erscheinung eingreifenden Umstände in ihren Beziehungen zueinander harmonisch zu gestalten, wenn ein Teil der Arbeit nicht vergeblich bleiben soll. Selbst durch eine Verminderung der einen Fehlerquelle im obigen Beispiele, die den wahrscheinlichen Fehler von der Größe 5 bis auf einen ganz unbedeutenden Wert herabsetzte, würde der wahrscheinliche Fehler des Resultates doch nicht weiter als von 13 bis auf gegen 12 herabgedrückt werden können. Dagegen würde es selbstverständlich von viel größerer Bedeutung sein, wenn man imstande wäre, den größeren wahrscheinlichen Fehler zu vermindern; ließe dieser sich z. B. von 12 auf 7 herabsetzen, so würde das Resultat in weit höherem Grade gebessert, indem der wahrscheinliche Fehler dann von 13 bis auf $\sqrt{5^2+7^2} = 8{,}6$ sinken würde.

Wesentlich anderer Art als die oben besprochenen zufälligen Fehler sind die konstanten Fehler, die in einer ganzen Versuchsreihe auftreten.

Um solche Fehler zu erkennen, gibt es kein anderes Mittel als die Wiederholung des Versuches, wo man dann versucht, dem in Frage stehenden konstanten Fehler Möglichkeit zu geben, mit der Intensität aufzutreten, die er unter verschiedenen Verhältnissen erreichen kann. Eine solche Fehlerquelle sind in den hämolytischen Versuchen die roten Blutkörperchen, die von Versuch zu Versuch verschieden sind. Deswegen ist es eine mißliche Sache, quantitative Bestimmungen, die von verschiedenen Tagen herrühren, miteinander zu vergleichen. Am sichersten ist es stets, alle Versuche, deren Resultate man zu vergleichen wünscht, gleichzeitig und mit demselben Blute anzustellen. Hierdurch erhält man Resultate, die sich am leichtesten miteinander vergleichen lassen, indem die vielen, bis jetzt unbekannten Faktoren, die auf das Resultat einwirken können, überall die nämlichen werden.

Schließlich sind noch die Fehler der hämolytischen Messungen ziemlich bedeutend (5 bis 10%) und eine Verminderung derselben wäre sehr wünschenswert; dieser Fehler spielt eine so große Rolle, daß man es für vergebliche Mühe halten muß, wenn man sich der großen Arbeit unterziehen wollte, um eine bekannte Fehlerquelle, z. B. die von den Schwankungen der Temperatur herrührende, um wenige Prozent zu vermindern, da eine solche Reduktion des Fehlers im Vergleich mit einem Totalfehler von 10% ohne Belang ist.

Man sollte meinen, daß eine Aufschwemmung roter Blutkörperchen in Kochsalzlösung ein zuverlässigeres Reagens wäre als der tierische Organismus. Dies ist indes nicht der Fall. Die Blutkörperchen sind für eine Reihe von Einwirkungen so empfindlich, daß die Ausschläge, die sie geben, äußerst stark wechseln. Der Organismus arbeitet mit einer Regulierung, die zum Teil die große Menge von Einwirkungen ausschließt, welchen die Erythrocyten hilflos unterworfen sind. Handelt es sich z. B. darum, die Toxizität eines Giftes jahrelang zu verfolgen, so wird man bei den Tierversuchen die Zahlen weit regelmäßiger befinden als bei der

Messung an Blutkörperchen. Man kann mit größerer Sicherheit darauf rechnen, daß ein Tierindividuum, ein Meerschweinchen z. B., eher gleichmäßig reagiert als eine Aufschwemmung von Blutkörperchen. Die Resultate würden noch viel gleichmäßiger werden, könnte man ebenso viele Tierversuche als Reagenzglasversuche anstellen.

Es wurde wiederholt hervorgehoben, wie wenig man sich auf das Resultat einer geringen Anzahl von Versuchen verlassen kann.

Bei einer Vermehrung der Anzahl der Versuche steigt die Genauigkeit, die mit dem Quadrate der Anzahl gleich genauer Versuche anwächst. Der wahrscheinliche Fehler des Resultates von n solchen gleich genauen Versuchen wird also der mit $\frac{1}{\sqrt{n}}$ multiplizierte wahrscheinliche Fehler des einzelnen Versuches. Verdoppelt man die Anzahl der Versuche, so wird der wahrscheinliche Fehler mithin um $\sqrt{2} = 1{,}4$ mal geringer, während man, wenn man bis zur vier- oder neunfachen Anzahl der Versuche geht, den genannten Fehler des Resultates um zwei bezw. dreimal kleiner macht als bei dem einzelnen Versuche. Von der Genauigkeit, die man für die Arbeit notwendig hält, hängt es also ab, wie viele Versuche man anstellen muß*).

---

*) Hier ist nur der „wahrscheinliche Fehler" erwähnt, weil dieser Fehler am leichtesten faßbar erscheint, während der öfters begangene „mittlere Fehler", sowie der „Durchschnittsfehler" für die Beurteilung dieser Art Versuche nicht von Bedeutung schienen; doch könnte vielleicht der letzgenannte Fehler wegen seiner leichten Berechnung für solche Versuche mit ziemlicher Genauigkeit auszuschalten sein.

Literatur.

1) Arrhenius und Madsen, Anwendung der physikalischen Chemie auf das Studium der Toxine und Antitoxine. Zeitschr. für physikal. Chemie 1903, Bd. LXIV.
2) Dies., On the molecular weight of diphtheria toxin. Festskrift, Statens Seruminstitut, Kopenhagen 1902.
3) Dies., Le poison diphtérique. Bull. de l'Acad. Royale des Sciences de Danemark 1904.
4) Bulloch and Craw, On a new Porcelain Filter. The Journal of Hygiene 1906. Vol. VI, pag. 408.
5) Calcar, van, Über Dialyse und einzelne ihrer Anwendungen. Berl. klin. Wochenschrift 1905, pag. 1368.
6) Grassberger u. Schattenfroh, Über das Rauschbrandgift etc. Wien 1904. Deuticke.
7) Kuester, Eine neue Saugvorrichtung für Pipetten zur genauen Abmessung kleinster Flüssigkeitsmengen. Centralbl. für Bakt. Orig., Bd XL, pag. 270.
8) Madsen, Sur le poison du botulisme et son antitoxine. Bull. de l'Acad. Royale de Danemark 1905.
9) Madsen, Noguchi et Walbum, Influence de la température sur la vitesse de réaction. Bull. de l'Acad. Royale de Danemark 1904.
10) Madsen et Walbum, De la ricine et de l'antiricine. Bull. de l'Ac. Roy. de Danemark 1904.
11) Martin, L., Production de la toxine diphtérique. Annal. de l'Inst Pasteur 1898, Nr. 1.
11a) Martin, Appareil à filtration pour faire les essais des toxines. Annal. de l'Inst. Pasteur 1898, pag. 47.
12) Oppenheimer, Toxine und Antitoxine, Jena 1904.
13) Ostwald und Luther, Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung Physiko-chemischer Messungen, Leipzig 1902.
14) Otto, Die staatliche Prüfung der Heilsera. Arbeiten aus dem Kgl. Institut für experimentelle Therapie 1906, Heft 2. Verlag G. Fischer, Jena.
15) Rosenau, The immunity unit for standardizing diphtheria antitoxin. Bull. Nr. 21. Hygienic Laboratory. U. S. Pub. Health Mar.-Hosp. Serv. Washington.
16) Römer, Über dialysiertes Diphtheriegift. Berl. klin. Wochenschr. 1905.
17) Uchinsky, Über eine eiweißfreie Nährlösung für pathogene Bakterien nebst einigen Bemerkungen über Tetanusgift. Centralbl. für Bakt. 1893, Bd. XIV.
18) Ders., Über Diphtheriekulturen auf eiweißfreier Nährlösung. Centralbl. für Bakt. 1897, Bd. XXI.

III.

Diphtherietoxin.

Von

Thorvald Madsen

in Kopenhagen.

Seitdem Roux und Yersin im Jahre 1889 unwiderleglich nachgewiesen haben, daß der Diphtheriebazillus im künstlichen Nährsubstrat ein lösliches Toxin ausscheidet, hat man demselben das größte Interesse entgegen gebracht. Mit dem Diphtheriegifte beschäftigen sich mehr oder minder direkt eine Reihe von Arbeiten, welche von der allergrößten Bedeutung für die theoretische Immunitätslehre geworden sind. — Die genaue quantitative Bestimmung der Toxine, die physikalischen und chemischen Eigenschaften, Konstitution, ihr Schicksal im Organismus, ihre antigenen Eigenschaften und Bindungsvermögen sind durch diese Arbeiten studiert worden. Nicht geringer ist die praktische Bedeutung des Diphtherietoxins als Grundlage für die Erzeugung unseres wichtigsten Heilserums.

Der Bazillus.

Man kann nicht jeden beliebigen Diphtheriebazillus als Toxinbildner verwenden. Die Erfahrung hat nämlich gelehrt, daß selbst virulente Bazillen, die direkt von diphtheritischen Membranen rein gezüchtet waren, nicht die Fähigkeit besitzen, Toxin in unseren gewöhnlichen Nährsubstraten zu produzieren. Z. B. habe ich gleich vielen anderen Forschern eine große Reihe (30) frischer, virulenter Stämme auf diese Fähigkeit hin untersucht und für alle äußerst schlechte Toxinbildung festgestellt.

In den verschiedenen Instituten verwendet man daher zur Herstellung von Diphtheriegift ganz besonders geeignete Stämme.

Der bekannteste von diesen ist der „Park Williams-Bazillus No. 8“ der im Jahre 1894 von Dr. Anna W. Williams in New-Yorks Health-department isoliert wurde. Es ist hauptsächlich dieser Bazillus, der in der ganzen Welt zur Herstellung von Diphtheriegift im großen Verwendung findet und mit dem das stärkste Toxin erreicht wird.

Besitzt man eine toxigene Kultur, so ist die wichtigste Frage die, wie man ihre toxigene Eigenschaft am besten erhalten könne. Das Verfahren, welches in dieser Beziehung in den verschiedenen Instituten angewendet wird, ist äußerst verschieden.

Häufig wird der Bazillus täglich auf Serum, Agar und Bouillon umgeimpft (Rosenau[58]); allgemein impft man in Bouillon und wenn das

Glas 2 Tage in einer Temperatur von 37° gestanden hat, läßt man es 5 Tage bei Zimmertemperatur stehen, worauf man zur neuen Aussaat schreitet.

SPRONCK impft den Bazillus auf geronnenes LOEFFLERsches Serum; nachdem er die Kultur 24 Stunden bei 35° hat stehen lassen, nimmt er sie aus dem Thermostaten und schützt sie vor der Einwirkung des Lichtes. Jedes Mal, wenn Toxin bereitet werden soll, wird die Kultur verjüngt, zuerst durch Überführung auf ein neues Serum und von da in ein Reagensglas mit demselben Nährsubstrat wie das, welches zur Toxinherstellung gebraucht werden soll; alsdann wird eine Haut vom Reagensglase in die Kulturkölbchen gebracht.

Um die Hautbildung zu erhalten, bediente sich THEOBALD SMITH bei der Züchtung weiter Reagensgläser, die schräggestellt werden, damit die Oberfläche möglichst groß wurde, und diese Haut führte er mit einer Platinöse in die Kulturgefäße.

L. MARTIN[47]) legt besonderes Gewicht darauf, daß man die Kultur nicht auf einem Substrat aufbewahre, das sich weniger zur Toxinbildung eignet, wie dies bei einer Bouillon der Fall ist, worin eine kräftige Säureentwicklung stattfindet. In einem solchen Medium verlieren die Bazillen schneller ihre toxigene Eigenschaft. Am besten tut man, wenn man eine Kulturflüssigkeit in Vorrat hält, von der man sich vorher überzeugt hat, daß darin der Bazillus Toxin gibt, ohne gleichzeitig Säurebildung zu veranlassen.

Oft kann man mit Vorteil den Bazillus einer alten toxischen Kultur (v. BEHRING) entnehmen, und wie vorher erwähnt, empfiehlt es sich, stets einen Vorrat älterer Kulturen zur Hand zu haben, wenn der Diphtheriestamm verunreinigt oder seine toxigenen Eigenschaften verlieren sollte. Es scheint, daß alte Laboratorienkulturen, die lange Zeit auf künstlichen Nährsubstraten gezüchtet worden sind, bessere Toxinproduzenten sind als diejenigen, die direkt von einem Diphtheriepatienten rein gezüchtet sind.

Es ist kein direktes Verhältnis zwischen der Virulenz eines Bazillus und seinem toxigenen Vermögen vorhanden. Sehr virulente Bazillen können schlechte Toxinerzeuger sein und umgekehrt. Man hat indessen häufig versucht, die toxigene Eigenschaft durch dasselbe Verfahren zu erhöhen, welches man anwendet, um die Virulenz durch Tierpassagen zu erhöhen.

Dieses erscheint in einer Anzahl Fälle (z. B. FUNCK[28]) und SPRONK[73]), die Meerschweinchen benützten) gelungen zu sein. Ich habe dieses Verfahren wiederholt mit verschiedenem Ergebnis in Anwendung gebracht, nie habe ich aber eine dauernde Erhöhung der Toxinerzeugung erzielt.

L. MARTIN[47]) hat die Passage in Collodiumsäcken in der Abdominalhöhle von Kaninchen studiert. Nach 6 Passagen war das toxigene Vermögen um das 5doppelte erhöht. Gleichzeitig wurde die Virulenz für Kaninchen, aber nicht für Meerschweinchen gesteigert.

Von der Erfahrung ausgehend, daß sich in schweren Diphtheriefällen bisweilen eine Infektion mit Streptokokken findet, glaubte man früher, daß eine Assoziation mit diesen sowohl die Virulenz des Diphtheriebazillus als auch seine toxigene Eigenschaft erhöhe. Diese Hypothese wurde zuerst von ROUX und YERSIN aufgestellt. FUNCK[28]), GILBERT und HILBERT[32]) machten diese Ansicht zu der ihrigen, wohingegen BERNHEIM[8]) und v. DUNGERN[18]) ihre Richtigkeit leugneten.

Hilbert stellte darüber Untersuchungen an, ob es möglich sei, die Giftproduktion der Diphtheriebazillen bei Symbiose mit Streptokokken zu erhöhen. Er kam zu dem Ergebnis, daß bei unter den gleichen Bedingungen, in gewöhnlicher alkalischer Kalbsbouillon angelegten Reinkulturen von Diphtheriebazillen und Mischkulturen von Diphtherie und Streptokokken in letzteren die Alkaleszenz und die Toxinentwicklung früher, ja zum Teil sehr viel früher auftritt und höhere Grade erreicht, als in ersteren und daß in manchen Fällen, in denen die Diphtheriebazillen allein auf dem saueren, giftfreien Stadium stehen geblieben wären, die Assoziation mit Streptokokken sie in das alkalische Stadium und zur Giftbildung hinüberleitet.

Auch Blumenthal erwähnt, daß er die Steigerung der Giftproduktion der Diphtheriebazillen unter der Einwirkung der Streptokokken beobachtet hat.

Th. Smith[72]) ist der Ansicht, daß die vermehrte Virulenz der Mischkulturen in vielen Fällen daher rühre, daß das eine Bakterium die Kulturflüssigkeit derart verändere, daß dadurch die der Toxinerzeugung durch andere begünstigt wurde.

v. Schreider[66]) hat nach Konzentrierung im Vakuum den Alkoholniederschlag aus Mischkulturen mit dem aus Reinkulturen der Diphtheriebazillen gewonnenen Niederschlag verglichen und den ersteren bedeutend virulenter als den letzteren gefunden.

Wenn diese Versuche jedoch einen wirklichen Wert haben sollen, so ist es wünschenswert, erst ein größeres Material zum Vergleich zu sammeln.

Eine größere Bedeutung für die Herstellung von Diphtheriegift in der Praxis hat die Anwendung der Bakterienassoziation nicht gewonnen.

Nährsubstrat.

Als Nährsubstrat wendet man am häufigsten Bouillon an, die in der Regel aus Kalbs- oder Ochsenfleisch (und auch Ochsenherzen) bereitet wird.

Das billige Pferdefleisch wird von Aronson[3]) und Marenghi[45]) empfohlen, und auch Zinno[82]) erzielte hiermit kräftiges Toxin; die große Mehrzahl der Untersucher (z. B. Smirnow[67])) haben keine günstigen Resultate mit diesem Substrat erreicht. Häufig stellt sich starke Säurebildung ein, wahrscheinlich weil das Pferdefleisch sehr viel Muskelzucker enthält.

In der Regel nimmt man 1 Teil Fleisch und 2 Teile Wasser. Dean nahm von beiden gleiche Teile.

Alle Untersucher stimmen darin überein, daß sie großes Gewicht auf Zusatz von Pepton legen, und es ist bis jetzt noch nicht gelungen, ein auch nur einigermaßen starkes Gift ohne dieses zu bekommen.

Es wird indessen nur eine verhältnismäßig geringe Menge des zugesetzten Peptons gebraucht (0,5—2 %).

Man hat mit einer großen Menge verschiedener Präparate jedenfalls in gewissen Perioden gute Resultate erzielt. Am häufigsten benützt man das Wittesche Pepton; Kossel[38]) empfiehlt das von Aschmann; ich habe mich mit Erfolg des Chapoteautschen bedient.

Im Martinschen Medium entsteht das Pepton durch eine Autodigestion von Schweinemagen.

Will man in dem Medium jegliche Glykose vermeiden, so muß man seine Aufmerksamkeit auf das Pepton hinlenken, das zuweilen eine geringe Menge von Kohlehydrat enthält.

Reaktion.

Es ist von großer Wichtigkeit für die Entwicklung einer Diphtheriekultur, welche Reaktion das Nährsubstrat hat, worin sie angelegt wird.

Wie im vorigen Kapitel näher ausgeführt wurde, ist es wegen des Gehalts der Bouillon an primären und sekundären Phosphaten schwierig, ein genaues Maß für ihre Reaktion zu finden. Die nicht neutralisierte Bouillon färbt Lackmuspapier rot; nach und nach wie Alkali, z. B. Natronhydrat zugesetzt wird, wird das Lackmuspapier mehr und mehr blau gefärbt; aber erst, wenn das ganze primäre Phosphat in sekundäres verwandelt ist, erhält man Rotfärbung mit Phenolphtalein.

Bereitet man sich aus einer Bouillon eine Anzahl Kolben à 1 Liter, denen man verschiedene Mengen Normalnatronlauge zusetzt, so wird man finden, daß unter einem gewissen Titer*) der Bouillon all die Kulturen sauer und über diesem Titer alkalisch und vielleicht toxisch werden.

Als Beispiel sei folgende Tabelle I wiedergegeben:

Tabelle 1.

Vor der Impfung			Nach 3 Wochen bei 37°		
Nr. des Kölbchens	Menge des pro Liter zugesetzten Normalnatrons	Titer nach der Sterilisation	Reaktion auf Lackmus	Titer	Toxität
1	0	21	sauer	38	atoxisch
2	—	—	—	35,5	
3	5	16,5	—	32	
4	—	—	—	33	
5	10	11	alkal.	6	toxisch
6	—	—	—	6	
7	12,5	9	—	4,5	
8	—	—	—	6	
9	15	6	—	3	
10	—	—	—	5	

In der 2. Kolonne ist angegeben, wieviel Normalnatronlauge pro Liter zugesetzt ist, in der 3. Kolonne die Titer nach der Sterilisation, in Kolonne 4 die Reaktion auf Lackmuspapier nach 3wöchentlichem Stehenlassen in einer Temperatur von 37° und in der 5. Kolonne die Titer. Man sieht, daß die Kölbchen mit weniger als 10 ccm stark sauer und atoxisch, dagegen alle mit 10 ccm NaOH und darüber alkalisch und toxisch werden.

Man sieht also, daß man in vielen Fällen die Diphtheriekulturen auf zwei verschiedene Weisen zur Entwicklung bringen kann in derselben Art von Bouillon, wenn man sie mit Alkali in steigender Menge versetzt, und daß man hier eine ziemlich scharfe Grenze angeben kann, so daß alle Kulturen, deren Titer über derselben liegen, stark sauer und atoxisch werden, während die übrigen stark alkalisch und bisweilen toxisch werden.

---

*) Die Menge Normalnatronlauge, die einem Liter zugesetzt werden muß, um Rotfärbung mit Phenolphtalein zu erreichen.

Doch ist man nur dann sicher, der Entwicklung einer Diphtheriekultur eine bestimmte Richtung zu geben, wenn man entweder Bouillon von einem sehr hohen oder aber einem sehr niedrigen Titer benützt. Bei der Untersuchung von Diphtheriekulturen in 85 verschiedenen Bouillonproben fand ich in Übereinstimmung hiermit, daß in Bouillon, deren Titer zwischen 18,5 und 8,5 lag, die Kulturen entweder sauer oder alkalisch werden konnten; dagegen waren alle über oder unter diesem Titer bezw. entweder nur sauer oder nur alkalisch[40]).

Die am meisten angewendete Methode zur Alkaleszenz der Bouillon ist die von Park und Williams vorgeschlagene[55]). Man neutralisiert zuerst die Bouillon mit Lackmustinktur als Indikator; am besten ist es, wenn man ein Kontrollröhrchen benützt, das man mit einer dünnen Lackmuslösung füllt und diese mit einem Bouillonröhrchen vergleicht, dem man das Natronhydrat hinzusgesetzt hat. Wenn die Bouillon dem Lackmus gegenüber neutral ist, setzt man weitere 7 ccm Normalnatron per Liter zu.

Eine auf diese Weise alkalisierte Bouillon reagiert alkalisch auf Lackmuspapier, gibt aber keine Rotfärbung mit Phenolphtalein.

Die beste Art, das Nährsubstrat zu sterilisieren, dürfte die 15 Minuten lange Autoklavierung bei 115—120° sein; auf diese Weise kann man am schnellsten und sichersten größere Mengen Flüssigkeit sterilisieren. Durch die starke Erwärmung wird die Bouillon weniger alkalisch, und die vorhandene Dextrose wird zum Teil gespalten. Die vergleichenden Untersuchungen zeigten, daß sich die gekochte, autoklavierte oder durch Filtration durch die Chamberlandsche Kerze keimfrei gemachte Bouillon mit Bezug auf die Giftbildung ähnlich verhält[40]).

Wachstum.

Wird ein Diphtheriebazillus bei 37° in gewöhnlicher, leicht alkalischer Kalbsbouillon gezüchtet, so ist diese sehr vielen Veränderungen ausgesetzt. Wie Roux und Yersin zuerst zeigten, betrifft dies namentlich die Reaktion, welche meistens anfangs sauer wird; nach einiger Zeit tritt aber an Stelle dieser Acidität die alkalische Reaktion. Erst dann nimmt die Kultur einen deutlich toxischen Charakter an.

Spronck[73]) war der erste, welcher darauf aufmerksam machte, daß sich die Diphtheriekulturen auf sehr verschiedene Weise entwickeln können. Er unterscheidet 3 Typen:

Type A. Die Reaktion der Bouillon wird schnell sauer und saurer, gleichzeitig wird das Wachstum der Bazillen spärlicher; sie fallen zu Boden, und die Flüssigkeit erscheint klarer. In diesem Stadium zeigt sich die Flüssigkeit atoxisch. Zuletzt geht der Bazillus zugrunde; so lange er aber noch lebend ist, besteht die Möglichkeit, daß die Kultur alkalisch und toxisch wird.

Type B. Die Bouillon wird überhaupt nicht sauer, sondern mehr und mehr alkalisch. Das Wachstum ist üppig; die Flüssigkeit überzieht sich mit einer dichten Haut und weist einen reichlichen Bodensatz auf. Nach Verlauf von 2—3 Wochen wird sie immer klarer, jedoch selten so klar wie in Type A. Diese Kulturen sind sehr toxisch.

Type C. Die Bouillon wird schnell sauer, und die Bazillen wachsen spärlich. Die Flüssigkeit ist klar. Allmählich wird die saure Reaktion

schwächer und wird durch die alkalische ersetzt. Jetzt läßt sich ein reichliches Wachstum nachweisen, und es bildet sich eine Haut und ein Bodensatz. In diesem Falle werden die Kulturen zwar auch toxisch, aber nicht so schnell und in nicht so hohem Grade wie in Type B.

Diese verschiedenen Typen lassen sich durch den ungleichen Gehalt der Bouillon an Kohlehydraten erklären. Diese werden zuerst unter Säurebildung (wahrscheinlich Milchsäure) gespalten. Ist die Säure zu stark, so hindert sie den Diphtheriebazillus an weiterem Wachstum. Sonst aber wird die Säurebildung aufhören, wenn die Kohlehydrate zum größten Teile aufgebraucht sind, und das weitere Wachstum geht unter Bildung von alkalischen, besonders ammoniakalischen Produkten vor sich.

Während der aktive Muskel nur geringe Spuren von Muskelzucker enthält, entwickelt sich dieser (namentlich Glucose) nach dem Tode aus dem Glycogen. Es liegt auf der Hand, daß der Gehalt des Fleisches an diesen verschiedenen Bestandteilen zu dem Zeitpunkt, wo es zur Herstellung von Bouillon benützt wird, sehr verschieden sein kann. Bouillon von ganz frischem Fleisch enthält hauptsächlich Glycogen und nur geringe Mengen Glucose, weshalb sie keine Säurebildung bewirkt. In dem Maße wie das Glycogen sich in Glucose verwandelt, nimmt die Säurebildung zu und wird erst geringer, wenn die Glucose durch längeres Aufbewahren des Fleisches, Vergärung u. dgl. verschwunden ist.

In den saueren Kulturen beobachtet man in den ersten Tagen diffuses Wachstum, aber keine Hautbildung. Es legt sich ein ganz dünner Schleier auf die Oberfläche; darauf aber wird die Flüssigkeit dunkler und klarer, da die Bazillen zu Boden sinken und eine dünne Schicht Bodensatz bilden.

Der Säuregrad nimmt in den ersten Tagen schnell, später langsam zu, um zuletzt einen Punkt zu erreichen — bei einer Acidität von 35 bis 40, selten von 50 —, wo er lange Zeiten hindurch ganz konstant bleibt.

Daß die hohe Acidität es ist, welche die Bazillen an ihrem Wachstum hindert, läßt sich dadurch zeigen, wenn man die Bouillon nach ihrer Neutralisierung mit Natronhydrat von neuem mit Diphtheriebazillen besät, daß diese schnell wachsen und Toxin produzieren können.

Eine solche sauere Diphtheriekultur wirkt auf das Meerschweinchen nicht giftig, jedenfalls aber erst, wenn es größere Mengen davon bekommt. Dies hat seinen Grund teils darin, daß, solange das Wachstum schwach ist, so gut wie gar kein Toxin gebildet wird, teils darin, daß das eventuell vorhandene Toxin in saurer Flüssigkeit schnell geschwächt wird. Möglicherweise lassen sich zur Erklärung dieser Erscheinung die Versuche von Doerr*) über Giftmodifikationen durch Säuren heranziehen.

Die alkalischen Kulturen bieten bedeutend mehr Abwechslung. Häufig ist der Verlauf folgender: In den ersten Tagen, wo die Acidität zunimmt, hat die Flüssigkeit das Aussehen wie bei den sauren Kulturen in ihrem Anfang. Sie zeigt eine diffuse Trübung und ist ohne Haut und Bodensatz. Nach 4—5 Tagen stellt sich der Umschlag in der Reaktion ein; die Trübung nimmt zu, und auf der Oberfläche beginnt sich eine Haut zu bilden. Diese kann in allen Übergängen von einem ganz dünnen Schleier bis zu einem dicken Überzuge vorhanden sein. Gleichzeitig zeigt sich die Flüssigkeit mehr und mehr alkalisch; sie kann in einem solchen Grade alkalisch sein, daß sie mit Phenolphtalein Rotfär-

*) Siehe dieses Handbuch: Doerr, Das Dysenterietoxin.

bung gibt. Dies ist jedoch nicht die Regel. Endlich hören die Reaktionsveränderungen auf; das Wachstum steht still, die Flüssigkeit klärt sich, und die Bazillen sinken zu Boden. Während die Bouillon alkalisch wird, beginnt sie gleichzeitig oft toxisch zu werden und die Erhöhung der Toxizität pflegt mit dem Wachstum der Bazillen Schritt zu halten und hört mit diesem auf.

Cobbet[15]) hat nachgewiesen, daß die Alkaleszenz- und Toxizitätskurven in der ersten Zeit der Kultur parallel steigen, auf einem gewissen Punkte aber divergieren, indem die Alkaleszenzkurve fortfährt zu steigen, während die Toxizitätskurve wegen der starken Alkaleszenz der Flüssigkeit sinkt.

Das Toxin muß als ein echtes Sekretionsprodukt der Bazillen während ihres Wachstums aufgefaßt werden, da nach Kossels[38]) Untersuchungen über die Auslaugung der toten Bazillenkörper diese nur geringe Mengen giftiger Substanz enthalten.

Rist[56]) wies auch eine nur geringe Toxizität der Bazillenleiber nach; in größeren Dosen wirken sie tödlich; da der Tod aber durch Diphtherieheilserum verzögert wird, handelt es sich wahrscheinlich um endogenes Diphtherietoxin. Eine viel größere Giftigkeit der Bazillenkörper beobachtete Murillo[52]) nach 10tägigem Stehenlassen unter Toluol bei 37°.

Nach Brieger und Boer[11]) zeigen die Diphtheriebazillenleiber sich nach Entfernung des eigentlichen Toxins noch giftig. In Wasser pulverisiert und suspendiert, töten sie nach subkutaner Injektion Meerschweinchen (500 g schwere Tiere) in Gaben von 0,01 g unter Nekrotisierung und Eiterung an der injizierten Stelle innerhalb 48 Stunden. Die Diphtheriebazillen enthalten also gleichzeitig ein nekrotisierendes Gift, das durch Diphtherieantitoxin nicht neutralisiert wird.

Während sich eine reichliche Toxinbildung nur bei einer kräftigen Vegetation von Löfflers Bazillen und bei Alkalibildung findet, ist das Gegenteil durchaus nicht der Fall. Die Alkalibildung und die Toxinbildung sind zwei neben einander verlaufende Prozesse, und ihr gegenseitiges Verhältnis kann so formuliert werden, daß die alkalische Reaktion der Kultur die notwendige Bedingung einer starken Toxinbildung ist, da das Wachstum der Bazillen im entgegengesetzten Fall sehr gering bleibt und das Toxin außerdem in der saueren Flüssigkeit destruiert wird. Dahingegen braucht ein sogar sehr hoher Grad von Alkaleszenz nicht anzudeuten, daß eine Kultur eine große Menge Toxin enthalte, wenn diese beiden Eigenschaften auch oft einander begleiten.

In der Regel findet sich nicht in den allerstärksten alkalischen Kulturen das kräftigste Toxin, vielmehr scheint eine zu starke Alkalibildung zerstörend auf das Toxin zu wirken.

Der Zeitpunkt, wo die Kulturen den höchsten toxischen Grad erreicht haben und aus dem Thermostaten entfernt werden müssen, ist je nach dem Bazillus und dem Nährsubstrat außerordentlich verschieden. In einigen schnell wachsenden Kulturen kann das Toxin schon wenige Stunden nach der Impfung nachgewiesen werden, und das Maximum der Toxizität ist nach 4—7 Tagen erreicht, während es in anderen erst nach 2—3 Wochen geschieht. Die Regel ist aber, daß, wenn nach Verlauf von 4 Wochen nicht reichlich Toxin produziert ist, es zu einer weiteren Toxinbildung überhaupt nicht mehr kommt.

Die Kultur darf nur so lange im Thermostat stehen, als die Toxinentwicklung dauert, sonst wird das bereits gebildete Gift bei dieser Temperatur geschwächt. Das Wachstum der Bazillen geht bei ca. 37°

lebhaft vor sich, mit Rücksicht auf die Möglichkeit einer Schwächung des Toxins unter diesen Umständen hält man die Temperatur gewöhnlich auf 33—35°.

Nach Murillo[52]) soll die Diphtherietoxinkurve in den ersten 14 Tagen erst steigen, dann in der dritten Woche sinken, um darauf wieder zu steigen. Kontrolluntersuchungen wären sehr wünschenswert.

Eine kräftige Häutchenbildung findet nur bei den alkalischen Kulturen statt und läßt auf reichliches Wachstum schließen; dieselbe ist dagegen kein sicheres Zeichen einer starken Toxinbildung. Stark alkalische, atoxische Kulturen haben gewöhnlich einen dichten Überzug. Die Häutchenbildung ist charakteristisch für gewisse Kulturmedien und nimmt innerhalb gewisser Grenzen mit dem Alkaleszenzgrad zu.

Gewisse Stämme, namentlich solche, welche lange auf künstlichem Nährsubstrat gezüchtet sind, haben die Neigung, mit einer dichten, eine vollständige klare Flüssigkeit bedeckenden Haut zu wachsen. Diese Art des Wachstums ist häufig von einer kräftigen Toxinentwicklung begleitet, und man hat daher versucht, sie auf verschiedene Weise zu fördern. So hat man die Oberfläche der Flüssigkeit so groß wie möglich gemacht (Züchtung in flachen Kölbchen mit einer nur 3—4 cm hohen Flüssigkeitsschicht) und Luft über sie geleitet. Bereits gebildete Häute hat man dadurch zu schützen gesucht, daß man die Kulturen vor Erschütterungen bewahrt und sie möglichst unberührt läßt (Cobbet[15]).

Um Hautbildung zu ermöglichen, hat man die Haut mit einer Platinöse auf ähnliche Weise wie bei Tuberkelbazillen übertragen. Die Bazillen hat man mit Hilfe von Korkstaub zum Schwimmen zu bringen versucht.

Nach meinen Erfahrungen haben diese Manipulationen keinen großen Wert. Vorausgesetzt, daß sonst die Bedingungen für Hautbildung vorhanden sind, so erreicht man sie auch durch Impfung mit Pasteurs Pipetten.

Selbst wenn man keine Hautbildung erstrebt, verschafft man den Kulturen dadurch eine große Oberfläche, daß man Kölbchen mit breitem Boden anwendet, in denen die Bouillon in einer wenige Zentimeter hohen Schicht sein kann. Dies ist jedoch durchaus keine notwendige Bedingung für eine kräftige Toxinbildung. Eines der kräftigsten Toxine, das ich gehabt habe, fand sich in den gewöhnlichen Erlenmeyerschen Kölbchen mit einer 12 cm hohen Flüssigkeit.

Roux und Yersin, die besonderes Gewicht auf die Sauerstoffzufuhr legten, empfahlen die Züchtung in Fernbachschen Kölbchen bei Luftdurchleitung. Über dem breiten, flachen Boden dieser Kölbchen steht die Bouillon ca. 2 cm hoch. Mittelst einer Wasserluftpumpe läßt man über die Flüssigkeit einen langsamen Luftstrom streichen, der dadurch, daß er durch eine Wasserflasche geleitet wird, feucht gemacht wird und den man durch Filtration durch Watte sterilisiert. Durch eingehende Versuche wurde man[40]) jedoch belehrt, daß dieses Verfahren durchaus keinen Einfluß auf die Toxinentwicklung hat, weshalb es wohl kaum noch irgendwie angewendet werden dürfte.

Die Untersucher waren der Ansicht — wie Martin[47]) —, daß die Kulturen durch das Verfahren aus der saueren schneller in die alkalische Periode gelangten.

Nach und nach wie die Kultur älter wird, zeigen sich — dies gilt namentlich von den alkalischen Kulturen — eine Menge Veränderungen. Die Farbe kann zwischen hell, strohgelb und dunkelrot variieren; das

Toxin hat oft einen eigentümlichen Geruch, und auch die Konsistenz kann sich verändern, so daß die Flüssigkeit weniger leicht filtrierbar, weniger dünnflüssig wird.

In alten alkalischen Kulturen finden sich häufig Tripelphosphat-Magnesia-Ammoniak-Kristalle.

Das Fleisch.

Der Grund für die starke Säurebildung, die so oft der Toxinproduktion hindernd in den Weg tritt, muß, wie vorher erwähnt, im Muskelzucker in dem Fleische gesucht werden, das zur Bouillondarstellung verwendet wird; darüber sind die meisten Forscher klar. Zur Umgehung dieser Schwierigkeit sind mehrere Methoden vorgeschlagen worden.

Spronck[73], der zuerst auf die Einwirkung des Muskelzuckers aufmerksam machte, empfahl, das Fleisch so lange liegen zu lassen, bis der Muskelzucker vergärt ist. Dies führt jedoch nicht immer zum gewünschten Resultat. Es kommt nämlich sehr darauf an, welche Mikroben das Fleisch zufällig enthält, und tatsächlich enthält Bouillon aus altem Fleisch oft große Mengen von fermentabler Substanz; ganz fehlen solche niemals. Deshalb hat man später seine Zuflucht zu methodischeren Maßregeln genommen.

Auf Vorschlag von Roux vergärt L. Martin[47] den Muskelzucker dadurch, daß er dem Fleischinfuse Hefe zusetzte; er überzeugte sich aber bald, daß dies unnötig sei und daß es genügte, es ca. 20 Stunden bei 35 ^{0} stehen zu lassen.

Th. Smith[68, 71] benützte zum selben Zwecke eine 12—14 Stunden alte Kultur des B. coli, womit die Bouillon eine Nacht im Thermostaten stehen blieb. Er meint indessen, daß die Dextrose an und für sich für die Toxinproduktion nicht schädlich, sondern nützlich sei. Wenn die Dextrose in einer Menge von ca. 0,2 $^{0}/_{0}$ Peptonbouillon zugesetzt wird, die einem Gärungsprozeß unterworfen worden ist, wird man die größte Ausbeute von Toxin erhalten. Während der in ungegärter Bouillon vorhandene Muskelzucker nachteilig auf die Toxinbildung wirkt, sollte die Dextrose diese fördern.

Diesen eigentümlichen Unterschied erklärt sich Th. Smith dadurch, daß er annimmt, daß entweder die saueren Produkte des Muskelzuckers verschieden von denen der Dextrose und unbrauchbar für die Diphtheriebazillen seien, oder daß auch die Bouillon hemmende Stoffe enthält, die aber durch Gärung mit B. coli entfernt werden.

Im Gegensatz zu Spronck erhielt Nicolle[54] brauchbares Toxin dadurch, daß er die Bouillon aus ganz frischem Fleisch präparierte. Dies hat wahrscheinlich seinen Grund darin, daß dieses Glycogen enthält, welches noch nicht zu Dextrose geworden ist.

Um die schädliche Einwirkung einer zu starken Säurebildung zu verhindern, neutralisierten Spronck[73] und von Turenhout[75] diese dadurch, daß sie der Diphtheriekultur etwas kohlensauren Kalk zusetzten, der die Säure nach und nach, wie sie sich bildete, binden konnte. Ruete[64] bediente sich zu gleichem Zwecke kleiner Stücke Marmor. Hier haben wir ein Mittel, das uns eine Sicherheit dafür gewährt, daß die Kultur alkalisch wird, wodurch wir eine Möglichkeit für die Giftbildung erhalten[40], ohne daß jedoch in einem sichtbaren Grade irgend ein fördernder Einfluß auf die Menge des gebildeten Giftes beobachtet wird.

Verschiedene Methoden zur Darstellung von Toxin.

Im Jahre 1898 machte L. Martin[47]) eine neue Methode zur Darstellung von Toxin bekannt: seine Bouillon, deren Pepton durch Autodigestion von Schweinemägen dargestellt, und die mit Fleischinfus (mittelst Hefezusetzung vergärt) vermischt war. Die Details sind im vorigen Kapitel beschrieben (s. Allgemeines über Toxine).

Ein namentlich in amerikanischen Instituten allgemein gebrauchtes Kulturmedium ist das von Th. Smith angegebene[58]) [34]):

Vom Fleische werden Sehnen und Fett abgeschnitten. Dann preßt man es durch einen Fleischpresser, und der ausgepreßte Fleischsaft wird aufgefangen. Das Fleisch wird gewogen und diesem das doppelte Gewicht Wasser zugesetzt. Darauf läßt man es 24 Stunden lang bei 15° C stehen und filtriert es dann durch Gaze, wobei man es kräftig auspreßt. Das hierdurch gewonnene Fleischinfus wird jetzt gewogen, die Reaktion wird untersucht (in der Regel 3 bis 4 % Acidität), und Natronhydrat bis 1,5 % Acidität auf Phenolphtalein zugesetzt, damit eine Colibazillenkultur günstige Wachsbedingungen hat. Alsdann impft man eine Kultur von B. coli communis ein, wozu man 10 ccm einer 24 Stunden alten Bouillonkultur auf jeden Liter Fleischinfus anwendet; 24 Stunden bis 37° C, worauf man jedem Liter 1 Eiklar zusetzt, läßt das ganze 20 Minuten vorsichtig kochen (Wasserbad), so daß das Eiweiß gerinnt und filtriert endlich warm durch Filtrierpapier. Die Menge des Filtrats wird durch Gewicht bestimmt, und man gießt so viel Wasser zu, daß es das ursprüngliche Quantum Infus erreicht.

Die Reaktion wird von neuem untersucht; man neutralisiert mit Natronlauge auf eine Acidität von 0,5 %, setzt dann 1 % Pepton, ½ % NaCl und 0,1 % Dextrose zu. Dann 20 Minuten dauernde erneute Erwärmung in strömendem Dampf im offenen Autoklav. Man untersucht wieder die Reaktion, neutralisiert bis die Acidität des Infuses genau 0,5 % ist. Die Flüssigkeit wird durch Filtrierpapier filtriert und in Fernbachs Flaschen etc. gefüllt. Diese werden 20 Minuten im Autoklav bei 120° C sterilisiert und sind jetzt zur Impfung mit Diphtheriebazillen geeignet.

Gleichzeitig füllt und sterilisiert man einige Reagensgläser mit Bouillon, und diese benutzt man dazu, ihre endliche Reaktion zu bestimmen; diese steigt während der Sterilisation ungefähr 0,1 %, wahrscheinlich, weil saure Salze gebildet werden.

Einige Gärungskölbchen (Saccharometer) die ohne Zusatz von 0,1 % Dextrose präpariert und sterilisiert sind, werden mit einer jungen Kultur von B. coli geimpft und 2 Tage in den Thermostat gesetzt, um sich durch fehlende Gasproduktion überzeugen zu können, ob aller Muskelzucker verschwunden ist.

Ein anderes Medium, das ausgezeichnete Resultate im The Lister Institute of Preventive Medicine ergeben hat, ist folgendes von Dean angegebene:

Als Fleisch werden Muskeln aus der Glutäalgegend angewandt. Das Fleisch wird entweder in völlig frischem Zustande oder nach 7—12-tägigem Liegen im Kühlraume bei etwa 8—14° C benutzt. Es wird von allem Fett und allen Faszien befreit und in einer Fleischhackmaschine fein zerteilt. Gewöhnlich werden 8—10 l Fleischbrühe auf einmal zubereitet. Das Verhältnis des Fleisches zum Wasser ist 500 g Fleisch

zu 1 l Trinkwasser. Man bringt das Fleisch und das Wasser in einen großen emaillierten Topf mit losem Deckel und läßt das Gemisch $1^1/_2$ bis 2 Stunden lang ruhig kochen. Dann filtriert man durch schwedisches Filtrierpapier, indem man zugleich mittelst eines Kartoffelpressers den Fleischsaft auspreßt. Das hierdurch entstandene Filtrat wird mit 2 % WITTES Pepton und 0,5 % Chlornatrium versetzt. Man erhitzt das Filtrat 1 Stunde lang auf 100° und filtriert den Bodensatz ab. Darauf macht man das noch heiße Filtrat auf Lackmus leicht alkalisch und setzt dann 7 ccm Normalnatronlauge pr. l. zu. Die Flüssigkeit wird aufs neue eine Stunde lang gekocht und wieder filtriert. Nachher verteilt man die Bouillon in ERLENMEYER-Kolben und sterilisiert 20 Minuten hindurch im Autoklaven, indem man die Temperatur bis auf 120° steigert, bei welcher Temperatur man das Gas auslöscht.

SPRONCK[74]) hat ein einfaches Medium aus Hefe empfohlen. Er gebraucht keine Bierhefe, sondern Handelshefe („Koningsgist" von M. v. MARKEN, Delft). 1 Kilo wird in 5 Liter Wasser ausgerührt und 20 Minuten unter fortwährendem Umrühren mit einem Spatel gekocht. Darnach gießt man das Dekokt in einige hohe Gläser und läßt es einen Tag stehen, worauf die Hefezellen auf den Boden sinken. Die leicht sauere Flüssigkeit wird jetzt abgegossen und mit 0,5 % NaCl und 2 % WITTEsches Pepton versetzt. Nach der Neutralisierung mit Natronlauge gibt man weitere 7 ccm Normalnatronlauge per Liter hinzu. Nun erwärmt man die Flüssigkeit, filtriert sie durch Papier, verteilt sie in Kölbchen und sterilisiert sie bei 120°. Bietet die Filtration durch Papier Schwierigkeiten, so kann man sie unterlassen, da eine klare Flüssigkeit für die Toxinproduktion nicht unbedingt notwendig ist.

Bei 35° hat SPRONCK durch dieses Medium ein um 20 mal stärkeres Toxin erhalten als durch die gewöhnliche Bouillon von vergärtem Fleisch. Die Bazillen wachsen schnell unter Häutchenbildung, und das Maximum der Toxizität ist schon nach 5 Tagen erreicht.

Durch Anwendung von Aszitesflüssigkeit bei der Züchtung von Diphtheriebazillen glaubte v. DUNGERN[18]) die giftbildende Eigenschaft gesteigert zu haben. Indem er die Filtraten aus drei 14 Tagen alten Kulturen von Bouillon, Aszites und Aszitesbouillon ($^2/_3$ A + $^1/_3$ B) verglich, fand er, daß die Asziteskultur 3mal stärker war als die unter gleichen Umständen aus Peptonbouillonkultur gewonnene, trotzdem diese viel reicher an Diphtheriebazillen war. Noch viel stärker, mindestens 12 Mal so stark, zeigte sich die Giftbildung in der Aszitesbouillon.

Dieses Verhältnis ist jedoch nicht konstant; ich habe verschiedene Male gesehen, daß durch Zusatz von menschlicher Aszitesflüssigkeit durchaus keine höhere Toxizität bewirkt wurde, zuweilen war sogar das Gegenteil der Fall.

Ein ähnliches Prinzip liegt dem von CARTWRIGHT WOOD[81]) benutzten Medium zu Grunde. Er empfahl nämlich zur Antitoxin-Produktion ein Serum-Toxin, das er auf folgende Weise bereitete:

Er impft gewöhnliche alkalische Pepton-Bouillon mit einem virulenten Diphtheriebazillus und setzt sie eine Woche oder länger einer Temperatur von 37° aus. Nachdem der Kultur darnach ungefähr 15—30 % steriles Pferdeserum zugesetzt worden ist, setzt man sie 4—6 Wochen in den Thermostaten (37°). Darauf erwärmt man die Flüssigkeit eine Stunde bei 65°, filtriert sie durch CHAMBERLANDS Filter.

Wood[80]) ist nun der Ansicht, daß man bessere Resultate erzielt, wenn man dieses Serumtoxin mit Serum von derselben Tierart zubereitet (also in der Regel mit Pferdeserum), die immunisiert werden soll (homoeoplasmatisches Serumtoxin), als wenn es von einer andern Tierart stammt (heteroplasmatisch). Weitere Untersuchungen mit diesem Serumtoxin sind wünschenswert.

Zinno[82]) hat die Züchtung in verschiedenen Organextrakten zum Gegenstand seiner Untersuchungen gemacht. Er erzielte besonders günstige Resultate mit einem Gehirnextrakt, das er auf folgende Weise gewann:

Rinder- und Lammsgehirne von mittlerer Größe werden fein zerrieben und mit doppelt so viel Wasser 24 Stunden lang kalt (8—10°) infundiert. Darauf wird das Gemisch 1—2 Stunden lang in dem Kochschen Apparat gehalten. Ein anderer Teil dieses Aufgusses wird mit salzsaurem Pepsin (1 % reinem Pepsin, 1 % Salzsäure) versetzt und im Thermostaten bei 40° 15—18 Stunden lang der künstlichen Verdauung überlassen. Dann wird die Flüssigkeit gekocht, neutralisiert und endlich nach neuem Kochen filtriert und in die Kolben verteilt. In diesem Substrat erhielt er viel stärkeres Toxin als in gewöhnlicher Fleischbrühe.

Wie man sieht, hat man verschiedene Methoden zur Darstellung von starkem Diphtheriegift erfunden. Indessen gewährt nicht eine einzige absolute Sicherheit.

Jeder, welcher sich mit der Produktion des Diphtheriegiftes im großen beschäftigt hat, weiß, wie launenhaft die Umstände oft sein können. Untersucht man sorgfältig eine größere Anzahl von Kolben, deren Inhalt auf möglichst genau dieselbe Weise hergestellt und besät ist, so wird man nach einiger Zeit große Unterschiede in der Reaktion und Toxizität wahrnehmen können. Diese Unterschiede können sogar soweit gehen, daß man einige Kolben treffen kann, die sauer und atoxisch sind, einige, welche schwach alkalisch und schwach toxisch, andere, die stark alkalisch und stark toxisch und wieder andere, welche stark alkalisch und schwach toxisch sind.

Dieses ist jedoch selten der Fall; in der Regel ergibt eine solche Reihe Kolben einigermaßen dasselbe Resultat, wenn auch eine genauere Untersuchung stets gewisse Unterschiede in der Reaktion, Toxizität, Farbe etc. aufdecken wird.

Als Beispiel, wie verschieden die Toxinbildung sein kann, führe ich aus meiner eigenen Erfahrung an:

Der erwähnte Bazillus Park Williams No. 8 erzeugte in den ersten 8 Zubereitungen (à 20 Kolben) von Deans Bouillon Toxin, wovon 0,003 bis 0,005 ccm Meerschweinchen von 250 g in 3—4 Tagen tötete. Darauf stieg die Toxizität in den folgenden 10 Zubereitungen bis auf 0,0015 bis 0,003 ccm. In den nächsten 16 Zubereitungen zeigte sich die Fleischbrühe stark alkalisch, aber so schwach toxisch, daß die tötende Minimaldosis über 0,05 ccm lag. Darnach produzierte er einige Male wieder starkes Gift — 0,002—0,004 ccm, worauf es 24 Mal nach der Reihe ein Jahr lang wiederholt sauere Kulturen bildete, und diejenigen, welche alkalisch blieben, waren so wenig giftig, daß 0,05 ccm auf Meerschweinchen ohne jegliche Wirkung blieben.

Da ich annahm, daß der Bazillus jede toxigene Eigenschaft verloren hatte, und im Begriffe war, ihn durch einen neuen zu ersetzen, zeigte sich eine letzte Kultur so toxisch, daß 0,0005 ccm imstande waren,

ein Meerschweinchen in 4 Tagen zu töten. Nachdem er ein ganzes Jahr kein Toxin hervorgebracht hatte, bildete sich plötzlich das stärkste Diphtheriegift, welches man vielleicht jemals erhalten hat.

Die Bouillon, worin er gezüchtet wurde, war die von Dean angegebene und jedenfalls genau auf gleiche Weise und von derselben Person bereitet.

Es sind zweifellos besondere, noch unbekannte Faktoren vorhanden, die für die Toxinentwicklung von Bedeutung sind. Es ist auffällig, daß ein und derselbe Stamm in dem einen Institute recht lange Zeit hindurch gute und ziemlich konstante Resultate geben kann, während derselbe Stamm in einem andern Institut in einem mit der größten Sorgfalt nach derselben Vorschrift präparierten Medium nur mittelmäßige Erfolge zeitigt.

Im allgemeinen kann man nur den Rat erteilen, sich eine geeignete Kultur (z. B. den amerikanischen Stamm) aus einem Laboratorium zu verschaffen, wo sie im Augenblick ein kräftiges Gift erzeugt, sie in einer der vorher genannten Nährflüssigkeiten (z. B. Martins, Th. Smiths oder Deans) zu züchten und nicht die Hoffnung aufzugeben, selbst wenn die Ergebnisse nicht gleich günstig sind. Ist die Toxinentwicklung dauernd nicht nach Wunsch, so kann man das Pepton oder die Nährflüssigkeit durch andere ersetzen, Veränderungen der Alkaleszenz versuchen und eventuell einige Tierpassagen anwenden.

In der ersten Zeit der Serumtherapie hielt man das Toxin für zu stark, welches in einer Dosis von 0,1 ccm Meerschweinchen von 500 g in 1—2 Tagen tötete; allmählich aber, namentlich seitdem der amerikanische Bazillus allgemein verwendet wurde, bekam man immer stärkeres Gift. Mit diesem Bazillus hat man ein Toxin erzielt, wovon 0,0005 ccm genügten, um 250 g schwere Meerschweinchen in 4—5 Tagen zu töten. So starke Gifte sind jedoch sehr selten, häufiger beträgt die tötende Minimaldosis 0,003—0,005 ccm.

Ist diese über ca. 0,01 ccm, so ist es nur mäßig zur Immunisierung im großen, und jedenfalls nicht zur Hochtreibung des Antitoxins geeignet.

Selbstverständlich würde es von großem Vorteil sein, wenn man ein Substrat von bekannter chemischer Zusammensetzung benützen könnte. Von bedeutendem theoretischen Interesse ist Uschinskys[77, 78]) Versuch. Er hat Wachstum von Diphtheriebazillen und Toxinbildung in folgendem Medium bekommen:

Wasser	1000
Glyzerin	30—40
Chlornatrium	5—7
Chlorcalcium	0,1
Magnesiumsulphat	0,2—0,4
Dikaliumphosphat	2—2,5
Ammonium lacticum	6—7
Natrium asparaginicum	3,4

Frische, direkt vom Menschen gezüchtete Mikroben eignen sich nicht zur Züchtung auf diesem Substrat, dagegen ältere Laboratoriumskulturen, die angeblich ebenso üppig wie in Bouillon gedeihen, namentlich wenn sie mit einer Spur von Eisen versetzt sind. Doch scheint es, als ob nicht alle Stämme sich daran gewöhnen können; am besten setzt man anfangs etwas Bouillon zu und vermindert allmählich die Menge derselben.

Dieses eiweißfreie Substrat bekam USCHINSKY nach Verlauf von 4—6 Wochen so giftig, das $1^1/_2$ ccm desselben ein mittleres Meerschweinchen in 36—40 Stunden mit allen für Diphtherietoxin charakteristischen Erscheinungen tötete. Dieses Gift zeigte nicht die gewöhnlichen Eiweißreaktionen. Die meisten späteren Forscher auf diesem Gebiete wie C. FRAENKEL[27], HOUGOUNNENCQ und DOYEN[35], haben kein nennenswertes Wachstum der Diphtheriebazillen auf dem eiweißfreien Nährboden erhalten.

In diesem Zusammenhange erinnere ich auch an GUINOCHETS[30, 31] Versuch, aus eiweißfreiem Harn Diphtheriegift herzustellen, wogegen CHARRIN u. a. einwenden, daß der Harn absolut nicht frei von Proteinsubstanzen sei.

Unter allen Umständen sind diese Versuche, Gift auf Medien von bekannter Zusammensetzung herzustellen, ohne praktischen Wert, da die erzielte Giftmenge viel zu gering ist. Dasselbe gilt von einer Anzahl anderer einfacher Substrate, wie einfache Peptonlösung, Liebigs und Cibils Fleischextrakt, Nährstoff Heyden, Somatose u. a.

Die Beurteilung des Wertes neuer Nährsubstrate ist selbstverständlich außerordentlich schwierig. In Anbetracht der im vorigen mitgeteilten Erfahrungen kann man sich denken, einen wie geringen Wert man einzelnen Versuchen mit positivem und namentlich negativem Ergebnis beimessen kann. Nur durch wiederholte, lange Zeit fortgesetzte Versuche und Kontrollversuche und durch Vergleich mit dem Ergebnis in anderen Medien kann man sich eine Vorstellung von dem Werte eines neuen oder einer Modifikation eines bereits bekannten Substrats machen.

Es ist wichtig, den Zeitpunkt zu kennen, wo die Toxizität ihren Höhepunkt erreicht hat, damit man die Kultur nicht länger im Thermostaten stehen läßt, als das Wachstum andauert. Zuweilen läßt man die Kolben nur 1 Woche bei 37° stehen und läßt dann den Bazillus bei niedriger Temperatur weiter wachsen, um eine zu starke Schwächung des bereits gebildeten Toxins zu vermeiden.

Kennt man den Höhepunkt der Toxizität nicht, der, wie erwähnt, zwischen 5—6 Tagen und 3—4 Wochen variieren kann, so empfiehlt es sich, in gewissen Zwischenräumen aus einem der Kolben Proben herauszunehmen und die Giftigkeit zu messen.

Wenn man die Kultur aus dem Thermostaten herausnimmt, überzeugt man sich gleich, daß Aussehen und der Geruch derselben nichts Abnormes aufweist; außerdem muß man aus jedem Kolben eine Probe zur mikroskopischen Untersuchung entnehmen und auch, um eine Agarplatte anzulegen. Das letztere ist durchaus notwendig, wenn das Gift zu wissenschaftlichen Zwecken angewendet werden soll.

Gleichzeitig wird die Reaktion auf Lackmuspapier geprüft. Ist diese sauer, so ist der Kolben unbrauchbar. Stellt man Alkaleszenz fest, so muß man auch auf den Grad darauf achten. Ist dies der Fall, und hat man hinreichendes Tiermaterial zur Verfügung, so empfiehlt es sich, die Toxizität jedes einzelnen Kolbens zu prüfen; hierdurch wird es möglich, ein besonders kräftiges Gift von den toxinhaltigsten zu sammeln. In der Regel vereinigt man jedoch alle Kulturen und mißt die Toxizität der Gesamtmenge.

Wie schon erwähnt, ist das Diphtheriegift ein echtes Sekretionsprodukt. Der in den Bazillenleibern selbst enthaltene schwach toxische Stoff, der zuweilen auf Meerschweinchen nekrotisierend wirkt, spielt eine

gewisse Rolle bei den neueren Bestrebungen, ein bakterizides und agglutinierendes Serum herzustellen.

Zu diesem Zwecke benutzt man die ganze Kultur (auch die Bazillenleiber) zur Immunisierung.

Beeinflussung des Toxins durch physikochem. Agentien.

Will man, nachdem man die Kolben aus dem Thermostaten herausgenommen hat, ein von Bakterien befreites Toxin zu bekommen, so filtriert man es zuerst durch Papier, um die Bakterienhäute zu entfernen, dann durch eine bakteriendichte Porzellankerze, z. B. CHAMBERLANDS Marke F. Eine geringe Menge Toxin geht bei der Filtration oft verloren; der Verlust beläuft sich aber selten auf mehr als 5—10%.

Ein bequemes Verfahren ist, gleich ein Reservoir zu filtrieren. Dazu benützt man am besten eine starke Flasche mit doppelt durchbohrtem Kork; durch das eine Loch geht eine kurze gebogene Röhre mit Watteverschluß, während durch das andere Loch ein bis auf den Boden reichender Heber gesteckt wird. Verbindet man das andere Ende des Hebers durch einen Gummischlauch, der mit einem Klemmhahn versehen ist, mit einem MAASENschen Mundstück, so kann man bequem und steril Gift aus dem Behälter abzapfen.

In der Regel filtriert man nur durch Papier und versetzt das Toxin mit einem Antiseptikum, z. B. Phenol (0,5%), Trikresol (0,2% bis 0,3). Am verbreitetsten ist das von EHRLICH und WASSERMANN empfohlene Toluol, wodurch das Toxin mit einer 1—2 cm hohen Schicht bedeckt wird, unter der es sich meistens steril hält, wenn die Flüssigkeit eine Woche lang täglich tüchtig geschüttelt wird. Das Toluol schützt nicht immer vor Infektion.

Das Diphtheriegift wird nach der Entfernung aus dem Thermostaten abgeschwächt, und der Prozeß folgt, wie von ARRHENIUS und MADSEN[4]) erwiesen ist, ungefähr dem monomolekulären Typus.

Als Beispiel diene folgende Versuchsreihe, die die Schwächung eines Giftes im Laufe eines Jahres zeigt. In der ersten Kolonne finden sich die Daten, in der zweiten die tötende Minimaldosis und in der dritten die entsprechende Toxizität, wenn man die Anfangstoxizität = 100 setzt.

Tabelle 2.

Datum	Tötende Minimaldosis ccm	Toxizität
20. Oktober 1897	0,07	100
4. Januar 1898	0,096	72,8
11. Mai 1898	0,112	62,3
27. August 1898	0,145	48,3
13. September 1898	0,149	47,1
17. Oktober 1898	0,2	35

Vielleicht ist die Abschwächung ebenso wie bei der Rohrzuckerinversion hydrolytisch, so daß die Spaltung unter Aufnahme von Wasser vor

sich geht. Hierauf deutet, daß die Abschwächung sehr langsam geschieht, wenn sich das Diphtheriegift in getrocknetem Zustande befindet, z. B. im Vakuum eingedampft oder durch eine Kalziumphosphatfällung gefällt wird. Diese kann ohne Nachteil lange Zeit bis auf 70° erwärmt werden und verträgt selbst 20 Minuten lang eine Temperatur von 100° ohne wesentliche Schädigung. ROUX und YERSIN, deren klassische Arbeiten über das Diphtheriegift ungefähr alles enthalten, was wir bis jetzt über dessen physikalische Eigenschaften wissen, sind der Ansicht, daß das aufgelöste Gift bei einer Temperatur von 58—60° abgeschwächt werde. Dagegen hält sich das Toxin lange Zeit bei niedriger Temperatur, und wir haben in starker Kälte und namentlich im Gefrieren ein ausgezeichnetes Konservierungsmittel.

Das Vorhandensein von starken Alkalien und Säuren*) beschleunigt die Abschwächung sehr, und es dürfte fraglich sein, ob man nicht eine größere Haltbarkeit erreicht, wenn man entweder die alkalische Reaktion durch Säuren abstumpft oder die alkalischen Produkte durch Dialyse entfernt.

Man muß das Toxin vor Licht, namentlich vor Sonnenlicht schützen. Das Licht scheint besonders schädlich zu wirken, wenn gleichzeitig die Luft freien Zutritt hat.

Was die Einwirkung der Elektrizität auf das Gift betrifft, so haben SMIRNOW[67]) und KRÜGER[39]) das Diphtheriegift konstanten Strömen ausgesetzt und gefunden, daß dies allerdings geschwächt wurde, aber seine immunisierenden Eigenschaften bewahrte. MARMIER[46]) zeigte, daß bei der Elektrolyse mit konstanten Strömen Hypochloride entstanden und freies Chlor aus Chlornatrium entwich und daß diese oxydierenden Substanzen wahrscheinlich schwächend auf das Toxin wirkten, welches in Toxoide verwandelt wurde.

D'ARSONVAL und CHARRIN[5]) machten ähnliche Erfahrungen mit hochgespannten Wechselströmen von großer Wechselzahl. Hier zeigte MARMIER, daß die Schwächung von der starken Erwärmung herrühre. Vermeidet man diese, so findet keine Schwächung des Diphtheriegiftes statt.

Das Diphtherietoxin diffundiert langsam durch Pergament, was von ROUX und YERSIN nachgewiesen ist. Durch Kollodium scheint es nicht zu gehen.

Das Diphtherietoxin wird von absolutem Alkohol, worin es unlöslich ist, gefällt. Zur Konzentrierung kann man vorsichtiges Eindampfen bei 37° im Vakuum unter Schwefelsäure anwenden. Es kann auch mit Ammoniumsulphat oder Natriumsulphat nach der im vorigen Kapitel erwähnten Methode ausgesalzen werden.

ROUX und YERSIN zeigten, daß das Toxin bei einer Kalkfällung mitgerissen wird:

Eine filtrierte Kultur versetzt man tropfenweise und unter Schütteln mit einer Lösung von Chlorcalcium: hierbei bildet sich ein Niederschlag auf dem Boden des Gefäßes. Wenn man dafür Sorge trägt, daß die zugesetzte Chlorcalciummenge nicht so groß ist, daß die Fällung vollständig wird, kann man in dem klaren Filtrat durch erneute Chlorcalciumzusetzung eine neue Fällung bekommen, die noch toxischer ist als die erste.

Man kann auch durch Fällung mit Aluminiumchlorid erreichen, daß das Toxin mitgerissen wird, jedoch ist die Ausbeute von Toxin hier nicht so groß wie bei der Kalkfällung.

*) Siehe DOERR: Das Dysenterietoxin.

Bei diesen Fällungsversuchen ist das Toxin mit einem großen Teil anderer Bestandteile der Bouillon vermischt.

Versuch der Reindarstellung.

Von den zahlreichen Versuchen, die zu dem Zweck angestellt sind, das Diphtheriegift von Beimengungen zu befreien, hat keiner zur Darstellung von Toxin in reinem Zustande geführt.

Durch systematisch durchgeführte Fällungs- und Auflösungsprozesse (Fällung mit Alkohol und Auflösung in Wasser) gelang es Brieger und Fränkel[12]), den giftigen Stoff als ein schneeweißes Pulver darzustellen, das in Wasser leicht löslich ist. Diese Lösung gerann beim Kochen nicht und gab keinen Niederschlag mit Bleiacetat, NaCl, Na_2SO_4, $MgSO_4$ oder HNO_3, zeigte dagegen alle anderen Eiweißreaktionen. Es scheint also den Albumosen am nächsten zu stehen. Die Toxizität wurde hierbei jedoch bedeutend herabgesetzt.

Ihr Verfahren war folgendes: Die Bouillon wurde bis auf $^1/_3$ eingedampft. Sie fällten mit der 10 doppelten Menge absoluten Alkohols unter Zusatz von etwas Essigsäure. Die Mischung wurde kalt gestellt. Nach 12 Stunden wurde die Filtration vorgenommen, der Niederschlag wurde im Wasser aufgelöst und von neuem mit Alkohol gefällt. Dieser Prozeß wurd so lange wiederholt (6—8 mal), bis die wässerige Lösung des Niederschlages ganz klar war. Zuletzt wurde die Lösung dialysiert und im Vakuum bei 40° getrocknet.

Wassermann und Proskauer[79]) haben diese Methode so modifiziert, daß die Salze und Peptone vor der Fällung mit Alkohol durch Dialyse entfernt wurden (das hierdurch entstandene Globulin wurde abfiltriert). Der Niederschlag wurde in Wasser aufgelöst und jetzt mit Ammonsulfat gefällt, das von dem im Wasser aufgelösten Niederschlag wegdialysiert war. Die Auflösung und Fällung mit Alkohol wurde noch mehrere Male wiederholt. Nach Eintrocknung im Vakuum bei ca. 37° erhielt man ein Produkt, das alle Albumosereaktionen gab, welches aber durch die zahlreichen Manipulationen bedeutend geschwächt war.

Noch einen Schritt weiter scheinen Brieger und Boer[11]) mit der Zinkfällung gekommen zu sein; jedenfalls scheint die in den dargestellten Präparaten eventl. vorhandene Eiweißmenge so gering zu sein, daß man sie mit unseren gewöhnlichen chemischen Reagenzen nicht nachweisen kann. Da die physiologische Reaktion in vieler Hinsicht bedeutend feiner ist als die chemische, so dürfte es wohl noch gewagt sein, aus diesem Versuch zu schliessen, daß das Toxin keine eiweißstoffartige Substanz sein könne.

Brieger und Boer fällten 1 Teil Toxinlösung mit 2 Teilen 1 %iger $ZnCl_2$-Lösung. Sie wuschen den Niederschlag mit Wasser und schüttelten ihn mit 3—6 %iger Ammoniumkarbonatlösung. So viel Ammonphosphatlösung wurde zugesetzt, daß der ganze Niederschlag mit Ausnahme eines Bodensatzes von ungelöstem Zinkphosphat aufgelöst wurde. Dieses sammelt man auf einem gehärteten Filter, der reichlich mit Wasser ausgewaschen wurde. Das Filtrat wurde mit $(NH_4)_2SO_4$ in Substanz gesättigt; der Niederschlag wurde in Wasser aufgelöst und zum Schluß mit Na_2SO_4 gefällt.

Brieger und Boer geben an, daß die Toxine als unlösliche Zinkdoppelsalze gefällt werden.

Diese Verbindungen scheinen indessen nach Walbums Untersuchungen nicht zu existieren, weder hinsichtlich des Diphtherie- noch

des Tetanustoxins. Der Niederschlag, welcher mit den Zinklösungen in der toxischen Bouillon entsteht (auch normale Bouillon), besteht aus phosphorsaurem Zinkoxyd, welches die Farbstoffe und Toxine mechanisch mit sich reißt (jedoch nicht immer vollständig). Wird die Phosphorsäure auf gewöhnliche Weise ($NH_4Cl + MgSO_4 + NH_3$) aus der Flüssigkeit entfernt, so gehen die Toxine nicht mit in den Niederschlag, sondern finden sich im Filtrat, das dann keinen Niederschlag mit Zinksalzen gibt.

Kürzlich hat Walbum versucht, verschiedene Toxine (u. a. Diphtherietoxin) durch Filtrierung durch ausgewaschene Knochenkohle von beigemengten Eiweiß- und Farbstoffen zu reinigen. Wenn man auch noch keine abschließenden Urteile fällen kann, so scheint es doch, daß man vielleicht auf diesem Wege schnell und bequem die Toxine von den Eiweißstoffen befreien oder ihre Menge jedenfalls so herabsetzen kann, daß die chemisch nicht mehr nachweisbar sind.

Wirkungsweise im Organismus. Toxinmessung.

Die Technik bei der Einspritzung und der späteren Behandlung der Tiere ist im vorigen Kapitel behandelt.

Zur Messung des Diphtherietoxins bedient man sich fast ausschließlich Meerschweinchen.

Während man früher oft 500 g schwere Tiere benutzte und angab, wieviel Toxin erforderlich war, um sie innerhalb 28—30 Stunden zu töten, verwendet man jetzt meistens Tiere von 250 g Gewicht an, da diese leichter zu verschaffen, billiger sind und gleichartiger zu sein scheinen als die größeren Tiere.

Wo es auf genaue Messungen ankommt, kann man nicht genug Gewicht auf die Provenienz der Tiere legen. Man erhält immer viel unregelmäßigere Resultate, wenn man diese eben vor dem Versuch von verschiedenen Händlern kauft, als wenn man sie selbst züchtet. Sehr häufig wird man finden, daß die gekauften Tiere empfindlicher sind als die eigenen. Jedenfalls darf man sie nicht gebrauchen, bevor sie zeitlang unter denselben äußeren Bedingungen gelebt haben, wie während der Versuche. Wie Th. Smith[70]) nachgewiesen hat, scheinen in der Empfänglichkeit der verschiedenen Stämme für Diphtheriegift große Unterschiede zu herrschen und scheint eine relative Immunität erblich zu sein.

Einen solchen Unterschied hat auch Ehrlich festgestellt. Einmal bekam er einen Stamm, der sehr wenig empfänglich für Diphtheriegift war. Er fand auch, daß gewisse englische Meerschweinchen widerstandsfähiger waren als deutsche.

Ein Unterschied wird gewöhnlich dadurch entstehen, daß ein Tier eines Wurfes von 4—5 Jungen bedeutend langsamer wächst, als wenn nur 1 oder 2 Junge sind. Die Zeit, die ein Meerschweinchen braucht, um ein Gewicht von 250 g zu erlangen, ist sehr verschieden und scheint auch von der Jahreszeit abhängig zu sein. Wo es auf besonders sorgfältige Versuche ankommt, bedient man sich am besten solcher Tiere, deren Abstammung, Alter usw. man kennt.

Die Frage wird bisweilen aufgeworfen, ob man Tiere verwenden kann, deren Eltern zur Toxin- oder Serummessung gebraucht worden sind. Zu Versuchen von theoretischer Bedeutung ist es das beste, sie nicht zu verwenden. Dagegen dürfte kaum etwas einzuwenden sein, wenn man sie zu praktischen Zwecken gebraucht, da ihre Empfindlichkeit in der Regel nicht verschieden von der gesunder Tiere ist.

Da man selten Tiere von genau 250 g bekommen wird, kann man sie innerhalb der Grenzen von 240—260 g nehmen. Das Gewicht normaler Meerschweinchen schwankt täglich 10—20 g.

Ein Tier, das eine subkutane Einspritzung von einer Dosis Diphtheriegift bekommen hat, die es in 3—4 Tagen tötet, bietet in den ersten 20 Stunden wenige krankhafte Symptome; dann aber fängt es an, den Eindruck zu machen, daß es krank ist. Es ist weniger lebhaft und kriecht in einer Ecke des Käfigs zusammen. Es fühlt sich nicht so elastisch an wie ein gesundes Tier, und die Haare verlieren ihre Glätte. Nach und nach wird es stiller und stiller, verliert den Appetit und reagiert nicht auf Geräusch und Berührung. Es steckt die Schnauze in die Erde, die Haare sträuben sich nach allen Seiten; die Respiration ist oberflächlich und schnell. Das Tier wird kalt und schlaff und kann sich, wenn es auf den Rücken gelegt wird, nicht mehr umdrehen. Zuletzt kann es sich nicht mehr auf den Beinen halten, sondern fällt nach der einen Seite und stirbt gewöhnlich in dieser Stellung unter leichten Laufbewegungen.

In der eben beschriebenen Krankheitsperiode ist das Tier äußerst empfindlich gegen äußere Einwirkungen. So können Manipulationen, wie Temperaturmessung, Palpation u. dergl., den augenblicklichen Tod veranlassen. Es ist nicht selten, daß ein Tier, welches man vor der Untersuchung nur schwer fangen konnte, nach einer so wenig eingreifenden Prozedur, wie das Wägen, zusammenbricht und stirbt.

Ungefähr zu derselben Zeit, wo die ersten Zeichen der Krankheit auftreten, kann man in der Regel Ödem an der Injektionsstelle (meistens die Bauchwand) feststellen. Diese Infiltration kann sich ganz verschieden verhalten. In vielen akut verlaufenden Fällen kann man fast nichts fühlen; in den langsamer verlaufenden Fällen dagegen fühlt man über mehr oder minder größeren Gebieten der Bauchfläche eine weiche, schmerzhafte Infiltration, die man am besten an deren Rand merkt, wenn man die Finger leicht von der Rückenfläche nach unten an der Bauchfläche entlang gleiten läßt. Nach und nach grenzt sie sich ab, wird härter und trocknet ein; zuletzt wird ein dunkles, nekrotisches Sequester abgestoßen, worunter eine leicht blutende Granulationsfläche zum Vorschein kommt. Diese heilt schnell und hinterläßt eine strahlenförmige Narbe.

In vielen Fällen, wo es nicht zu Sequesterbildung kommt, ist eine ausgebreitete Enthaarung ein mehrere Monate dauernder Rest des lokalen Prozesses.

Die Temperatur, welche bei normalen Meerschweinchen ca. 39° beträgt (sie schwankt zwischen 37,5°—39,9°), steigt in den ersten Stunden nach der Einspritzung von einer letalen Dosis auf 40—41°, zeigt dann einen kurzen Abfall von $\frac{1}{2}$—$1\frac{1}{2}$°, um wieder auf 40—41° zu steigen, wo sie sich dann 10—20 Stunden lang hält. Darauf fällt die Temperatur, und gleichzeitig entwickeln sich die krankhaften Symptome; zu diesem Zeitpunkt sind die pathologisch-anatomischen Läsionen völlig ausgesprochen. Die Temperatur nimmt mehr und mehr ab, erst langsam, dann vor dem Tode, der bei einer Temperatur von 31—35° eintritt, schneller. Überlebt das Tier die Vergiftung, so bleibt die Hypothermie aus.

In vielen Fällen erholt sich das Tier nicht ganz, sondern magert ab und geht in einen mehr chronischen Vergiftungszustand über. Es kann die Hälfte seines ursprünglichen Gewichts verlieren und stirbt zuletzt unter zunehmender Erschöpfung kachektisch bei starkem Tempe-

raturfall. Die Wärmeregulation leidet unter der Diphtherievergiftung sehr, weshalb die Tiere gegen Temperaturveränderungen und namentlich gegen Abkühlung sehr empfindlich sind. Daher ist es von großer Wichtigkeit, daß man die Tiere in gleichmäßiger Wärme hält. Vielleicht hängt es hiermit zusammen, daß die Meerschweinchen im Sommer widerstandsfähiger sind als im Winter.

Bei einem Tiere, dessen Vergiftungsprozeß schnell verläuft, sinkt das Gewicht gleichmäßig bis zum Tode. Bei einem langsamen Verlauf fängt der Gewichtsverlust erst nach 24 Stunden an.

Die folgenden Kurven geben eine Vorstellung von den Gewichts- und Temperaturverhältnissen bei einer akut verlaufenden Diphtherievergiftung.

Fig. 1.

Der durchschnittliche Gewichtsverlust eines Meerschweinchens von 250 g, das eine Dosis bekommen hat, die in 4—5 Tagen zu töten pflegt, ist am

1. Tage	26 g	6. Tage	66 g
2. „	35 g	7. „	63 g
3. „	47 g	8. „	52 g
4. „	54 g	10. „	34 g
5. „	66 g	14. „	7 g

Die Zahlen nach dem 5. Tage gelten für die Fälle, wo das Tier die Einspritzung überlebt hat. In der Regel pflegt der größte Gewichtsverlust auf den 5. Tag zu fallen, worauf das Gewicht langsam wieder steigt.

Bekanntlich ist der wichtigste Befund bei der Sektion eines an akuter Diphtherievergiftung gestorbenen Meerschweinchens: an der Injektionsstelle ein mächtiges gelatinöses, oft speckiges und stark hämorrhagisches Ödem, das sich meistens über die ganze Bauchfläche erstreckt. Geringes Exsudat im Cavum peritonei, Blutfüllung der Mesenterialgefälle. Röte der Nebennieren. Im Cavum pleurae, das man am besten öffnet, indem man die Costae und das Sternum quer über dem Diaphragma durchschneidet, findet sich meistens ein gewöhnlich blutfarbiges Exsudat. Dasselbe gilt von dem Cavum pericardii. Die Lungen zeigen mehr oder minder splenisierte Partien.

Bei Meerschweinchen, die eine nicht tötende Dosis Toxin bekommen haben, entwickelt sich zuweilen eine typische Parese. Nachdem der Gewichtsverlust, welcher nach der Injektion sich einstellt, nach Verlauf einiger Tage verschwunden ist, befindet sich das Tier scheinbar wohl, abgesehen von dem lokalen Prozeß an der Injektionsstelle. — Erst 15—30 Tage später, in der Regel ungefähr nach 3 Wochen, zeigen sich die ersten Zeichen einer Parese als ein leichtes Schlenkern im Hinterleib und den hinteren Extremitäten bei raschen Bewegungen. Im Laufe der nächsten Tage wird die Lähmung deutlicher und zieht auch die vorderen Extremitäten in Mitleidenschaft, wodurch die Bewegungen des Tieres bedeutend beschränkt werden, so daß es gewöhnlich auf die Seite fällt, doch aber wieder aufstehen kann. Selten ist die Lähmung der Muskeln des Körpers und der Gliedmaßen total, vielmehr bleibt eine gewisse Beweglichkeit zurück. Zuletzt liegt das Tier auf der Seite, aber selbst in diesem Stadium ist eine Heilung nicht ausgeschlossen, wenn auch meistens eine so vorgeschrittene Parese den Tod zur Folge hat. Die Temperatur fängt an, zu fallen, so daß das Tier vor Kälte zittert. Es kann sich nur dadurch bewegen, daß es sich mit den Vorderzähnen festhakt. Nicht selten treten Corneatrübungen auf. Die Sensibilität scheint intakt zu sein. Das Tier ist recht lebhaft, aufmerksam und sucht sich von der Stelle zu bewegen. Es hebt den Kopf, fährt beim geringsten Geräusch nach Art der Meerschweinchen zusammen und frißt mit Begierde. Zuletzt werden die Respirationsmuskeln angegriffen, und die Atmung wird dann sehr langsam, 18—20 in der Minute (gewöhnlich über 100) und nimmt einen eigentümlichen Charakter an. Bei jeder Inspiration beugt sich der ganze obere Körper und namentlich der Kopf stark nach hinten, die Extremitäten strecken sich; das Maul öffnet sich weit und hörbar, und die Einatmung geschieht mit einer schnappenden Bewegung. Wenn die Parese ausheilt, so sieht man doch lange Zeit eine Muskelschwäche zurückbleiben.

Will man den natürlichen Verlauf einer Parese studieren, so muß man den Versuchstieren besonders gute Bedingungen gewähren (gleichmäßige Erwärmung, reichlich Platz geben), und man muß Sorge tragen, daß sie nicht durch gesunde Tiere belästigt werden.

Die folgende Tabelle zeigt uns die Wirkung verschiedener Mengen Diphtherietoxin, die einer Anzahl von Meerschweinchen von demselben Gewicht — 250 g — subkutan injiziert wurden.

(Siehe Tabelle 3 pag. 92.)

In umstehender Tabelle bedeutet „kleine Infiltration" eine solche, die ungefähr $2^1/_2$ cm lang und 2 cm breit ist; die „mittlere" ist 4—5 cm lang und $2^1/_2$—3 cm breit und „groß" ist eine solche, welche die ganze Bauchfläche füllt.

Bei kleinen Dosen von 0,0005 ccm zeigt sich als einziges Symptom eine geringe Enthaarung in den ersten Wochen. Bei einer Dosis von 0,0007 ccm sind die lokalen Symptome deutlich in Form einer kleine Infiltration.

Mit den steigenden Dosen wird die Infiltration größer, und es zeigt sich ein deutlicher Gewichtsverlust. Bei 0,002 ccm treten die ersten Erscheinungen der Parese 23 Tage nach der Injektion auf und endigen mit Heilung; bei 0,003—0,004 ccm kommt die Parese nach 17—18 Tagen und endigt tödlich. Höhere Mengen wirken akut letal, und der Tod tritt um so schneller ein, je höher die Dosis ist, aber über 0,01 ccm hinaus ist

Tabelle 3.

Meerschweinchen 250 g.

Dosis in ccm	Tod nach Tagen	Max. Gewichtsabnahme in g	Lokale Erscheinungen			Parese	
			Infiltration	Nekrose	Enthaarung	nach Tagen	Verlauf
				cm			
0,03	1,25	20	kleine weiche	—			
—	1,5	20	—	—			
0,02	1,25	15	—	—			
—	1,0	20	—	—			
0,01	1,5	15	—	—			
—	2	15	—	—			
0,008	2	10		—			
—	3	20	mittlere	—			
0,006	4	55	große	—			
—	4	50	mittlere	—			
0,005	5	45	große	—			
—	6	60	—	—			
0,004	8	60	große	—	talergroße		
—	—	50	—	—	—	18	Tod am 23. Tage
0,003	13	35	—	—	—		
—	—	20	—	2 × 2	—	17	Tod am 25. Tage
0,0025	—	40	—	3 × 2	ü. d. g. Bauch	21	n. 14 Tg. w. gesund
—	—	45	—	4 × 3	—	22	Tod am 26. Tage
0,002	—	15	—	2 × 1	—	—	
—	—	15	—	1 × 1	—	23	n. 12 Tg. w. gesund
0,0015	—	5	—	$^1/_2 \times ^1/_2$	fleckenweise		
0,001	—	0	mittlere		—		
—	—	20	große	1 × 1			
0,0007	—	Zunahme	mittlere		ausgedehnte		
—	—	0	kleine		mittlere		
0,0005	—	Zunahme	keine		bischen		
—	—	—	—				

die höhere Dosis von keiner großen Wirkung. Eine Inkubationszeit von mindestens 20—24 Stunden gibt es immer, und sie kann nur durch relativ enorme Dosen verkürzt werden, wo vielleicht andere giftige Bestandteile der Bouillon als das reine Toxin eine Rolle spielen.

In einer Versuchsreihe, wie die erwähnte, finden sich häufig große Unregelmäßigkeiten, namentlich wenn die Versuche nicht gleichzeitig und mit gleichartigen Versuchstieren gemacht sind. Je mehr Versuche man anstellt, desto genauer wird die Schätzung der Toxinstärke.

Die übliche Einheit ist die Menge Toxin, welche ein Meerschweinchen in 4—5 Tagen tötet. In diesem Falle wäre es ca. 0,006 ccm.

Eine genauere Wertschätzung bekommt man, wenn man das Material behandelt, wie es von ARRHENIUS und MADSEN[4]) vorgeschlagen und wie im vorigen Kapitel näher beschrieben ist. Hier wird sowohl die Todeszeit als der Gewichtsverlust mit in die Berechnung der Toxizität aufgenommen.

Bei Meerschweinchen benützt man fast immer die subkutane Injektion. Wird das Diphtherietoxin direkt in die Blutbahnen eingeführt, wie dies bei der intrakardialen Methode geschieht, so ist die letale Minimaldosis nur $^1/_3$ der subkutanen (MORGENROTH)[51]).

Außer den Meerschweinchen sind auch Kaninchen empfindlich gegen das Diphtherietoxin.

Bei der subkutanen Einspritzung gibt die Messung äußerst unregelmäßige Resultate; viel gleichmäßiger sind die Zahlen bei der intravenösen Applikation.

Die tötende Minimaldosis ist ungefähr dieselbe bei intravenösen Injektionen für Kaninchen von 1200—1700 g Gewicht und bei subkutanen Injektion auf Meerschweinchen von 250 g Gewicht.

Das Krankheitsbild bei Kaninchen unterscheidet sich nicht wesentlich von dem bei Meerschweinchen. Die Paresen treten fast in derselben Weise auf; auch hier greift die Lähmung zuerst die Muskeln der Lenden und der Hinterextremitäten an; zuweilen sieht man jedoch, daß zuerst die Vordergliedmaßen lahm werden, so daß die Tiere Purzelbäumchen schlagen, wenn sie springen und sich auf die Vorderbeine nicht stützen können (Dreyer).

Das Charakteristische bei der Sektion sind auch hier die Zeichen einer allgemeinen Gefäßdilatation, außerdem aber tritt häufig eine Verfettung der Leber auf.

Auch Tauben sind sehr empfindlich gegen das Diphtheriegift; die Messungen geben aber recht unregelmäßige Resultate. Am besten ininjiziert man in den Brustmuskel und die intramuskuläre Applikation gibt bedeutend gleichmäßigere Ausschläge als die subkutane. In beiden Fällen entsteht ein ausgedehntes gelatinöses Ödem der Muskeln.

Die Toxizität ist bei Tauben und Meerschweinchen von demselben Gewicht ungefähr dieselbe.

Die anderen Tiere, die ebenfalls empfindlich gegen das Toxin sind, wie Pferde, Ziegen und Schafe, werden wohl kaum zu Toxizitätsbestimmungen verwandt. Mäuse und Ratten sind fast refraktär. Für die Empfindlichkeit für Diphtheriegift hat v. Behring folgende Skala aufgestellt, die die Tiere in aufsteigender Weise so ordnet: Maus, Ratte, Hund, Meerschweinchen, Kaninchen, Schaf, Kuh, Pferd, Ziege.

Zum Nachweis sehr geringer Mengen Diphtherietoxin — geringere als die tötende Dosis — kann man sich dessen Eigenschaft, an der Injektionsstelle eine lokale Reaktion hervorzurufen, bedienen.

Ein geringer Teil der Dosis minima letalis, $^1/_{10}$ Teil oder noch weniger, genügt, um die Entstehung eines starken sulzigen, mit Hämorrhagien gefüllten Ödems des Unterhautzellgewebes zu bewirken.

Diese Eigenschaft des Diphtherietoxins war die Grundlage der früheren Ehrlichschen Methode der Antitoxinmessung, und sie ist von Marx[49]) zur Bestimmung kleinster Mengen Antitoxin benutzt worden.

Durch dieses Verfahren versuchte Uffenheimer kleine Mengen Diphtherietoxin im Blute von an Diphtherie erkrankten Patienten nachzuweisen.

Er injizierte subkutan Meerschweinchen 0,1—0,3 ccm reines Serum ohne Blutkörperchen (da diese an und für sich eine leichte Transsudation im Unterhautzellengewebe hervorrufen, wodurch ein Ödem vorgetäuscht werden kann).

Bei etwas größeren Mengen Gift kann hierdurch in 1—2 Tagen nach der Einspritzung ein fühlbares Infiltrat und Gewichtsverlust entstehen. Unter allen Umständen wird das Tier am Schlusse des 2. Tages mit einem Nackenschlag getötet, und man kann dann bei der Sektion das sulzige, mit Hämorrhagien der Bauch- und teilweise auch der Brusthaut durchsetzte Ödem feststellen.

In zweifelhaften Fällen wird es selbstverständlich immer am richtigsten sein, die Spezifizität dadurch zu konstatieren, daß man in einem Kontrollversuch den toxischen Stoff mit Diphtherieantitoxin neutralisiert.

Toxinmessung nach Ehrlich.

Von großer Wichtigkeit bei der Untersuchung eines Diphtheriegiftes ist die Bestimmung von L_0 und L_+.

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, sind dies die Grenzwerte, welche entstehen, wenn eine konstante Menge Antitoxin, 1 Immunisierungseinheit, mit steigenden Mengen Toxin vermengt wird (EHRLICH)[23]. Als Beispiele diene folgende Versuchsreihe:

Tabelle 4.

1 Immunitäts-einh. + untenstehende Mengen Gift in ccm	Tod resp. lokale Erscheinungen	Parese. Inkubationszeit in Tagen	1 Immunitäts-einh. + untenstehende Mengen Gift in ccm	Tod resp. lokale Erscheinungen	Parese. Inkubationszeit in Tagen
2,0	○				
—	○		2,4	✳	25
—	○		—	† 6	
—	○		2,5	✳	19
2,1	○		—	† 12	
—	⊕	19	—	† 8	
—	⊕	22	—	† 6	
—	⊕	33	—	† 3½	
—	⊕	33	—	† 3½	
—	⊕		2,6	† 4	
—	⊕		—	† 4	
—	⊕	getötet	—	† 4	
—	⊕	am 4. Tag	—	† 3½	
—	⊕		—	† 3½	
—	⊕		—	† 3	
2,2	×	13			
—	×	15			
—	✳	17			
—	✳	20			
—	✳	20			
—	✳	22			
2,3	✳	17			
—	✳	18			

In dieser Tabelle bedeutet: ○ keine Infiltration; ⊕ kleine Infiltration; × mittlere Infiltration ohne nachfolgende Nekrose und Haarausfall; ✳ große Infiltration mit nachfolgender Nekrose; † 6 Tod nach 6 Tagen.

1 Immunisierungseinheit mit 2 ccm Toxin vermengt geben überhaupt keinen krankhaften Ausschlag, weder einen lokalen noch einen universellen, und keine Parese. Bei 2,1 ccm sind bereits Zeichen des Vorhandenseins von freiem Gifte im lokalen Ödem zu konstatieren. Bei den meisten anderen stellte sich eine leichte Parese mit ziemlich langer Inkubationszeit ein. Infolge dessen muß der Grenzwert L_0 bei 2,0 ccm gesetzt werden.

Bei 2,2 ccm bekommen die Tiere mittelgroße Infiltrate, die jedoch verschwinden, ohne Nekrose zu hinterlassen; später kommt Parese mit kürzerer Inkubationszeit, die in einer Anzahl der Fälle tödlich endet.

Bei 2,3 und 2,4 ccm wird die Vergiftung stärker, auf die Infiltration folgen Nekrosen, und bei 2,5 ccm sterben unter 6 Tieren 5; die Zeit des eintretenden Todes aber schwankt zwischen 12 und $3^1/_2$ Tagen. Endlich sterben alle die Tiere, welche die Mischung von 2,6 ccm bekommen haben, sehr regelmäßig am 3.—4. Tage, und diese Dosis ist also L_+.

Da die tötende Minimaldosis dieses Giftes 0,084 ccm war, haben wir also

L_+ 2,6 ccm	31 (T)
L_0 2,0 „	25 (T)
D (Differenz) 0,6 —	6 (T)

T ist das Zeichen für die Menge Toxinlösung, die 1 Toxineinheit, also hier die tötende Minimaldosis für Meerschweinchen von 250 g Gewicht, enthält.

Um von L_0, die Toxin-Antitoxinmischung, die bei Meerschweinchen kein erkennbares Symptom hervorruft, nach L_+ zu gelangen, kann man also nicht, wie man vielleicht erwarten könnte, sich damit begnügen 1 (T) hinzuzufügen, sondern man muß nicht weniger als 6 (T) anwenden.

Ehrlich, der dies zum ersten Male nachwies, ist der Ansicht, daß das Diphtheriegift außer dem eigentlichen Toxin ein anderes Gift, das Toxon, enthält, das weniger starke toxische Eigenschaften und weniger starke Affinität zum Antitoxin hat.

Dem Toxon soll die Fähigkeit fehlen, akut zu töten. Das Ödem, welches es an der Injektionsstelle hervorruft, schwindet schnell, ohne Nekrose oder Enthaarung zu hinterlassen. Dagegen hat es im hohen Grade die Eigenschaft, Paresen zu bewirken.

In einer Mischung wie L_0 ist sowohl das Toxin wie das Toxon ganz von dem Antitoxin neutralisiert. Versetzt man eine Immunisierungseinheit mit einer größeren Menge Diphtheriegift, so wird zuerst das Toxin, welches die größte Affinität zum Antitoxin hat, gebunden, während das Toxon mit seiner schwächeren Affinität fortfährt frei zu sein und die oben erwähnten toxischen Eigenschaften entfaltet. Setzt man mehr und mehr Gift zu der Immunierungseinheit, so bekommt man nach und nach zuerst alles Toxon frei und erhält zuletzt so viel Toxin, daß eine tötende Dosis frei wird, mit anderen Worten L_+. Die Differenz (D) zwischen L_0 und L_+, die mit den verschiedenen Diphtheriegiften sehr wechselt, ist auf den verschiedenen Inhalt der Gifte an Toxon zurückzuführen.

Bei seinen Untersuchungen über die Anwendung von Diphtheriegift zur Messung der antidiphtherischen Serumstärke stieß Ehrlich auf ein anderes Phänomen, das von großer Wichtigkeit für unsere Auffassung von der Konstitution der Toxine ist. Er fand, daß sich L_+ ungefähr unverändert hielt, selbst wenn (T) bedeutend, bis auf die Hälfte oder sogar bis auf $^1/_3$, geschwächt wurde.

Dieser Umstand läßt nach Ehrlichs Ansicht darauf schließen, daß sich im Diphtheriegift 2 Molekülgruppen finden, eine toxophore, die Träger der toxischen Eigenschaften ist, und eine haptophore, die das Antitoxin bindet. Diese letztere ist verhältnismäßig stabil und hält sich lange Zeit unverändert, selbst wenn die viel labilere toxophore Gruppe verändert wird. Bei diesem Prozeß können nicht giftige oder wenig

giftige Modifikationen des Diphtheriegiftes, die Toxoide, entstehen, welche ihre antitoxinbindenden und immunisierenden Eigenschaften bewahrt haben.

Die Bestimmung des L_+ spielt in prüfungstechnischer Hinsicht eine sehr große praktische Rolle als Maß für die Stärke des antidiphtherischen Serums.

Man findet sie mit Hilfe von Testserum, das man durch die Freundlichkeit des Kgl. Instituts für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. erhält. Hier wird es unter Leitung des Geheimrat EHRLICH dargestellt, der sich um alle Seruminstitute dadurch im höchsten Grade verdient gemacht hat, daß er das Testserum zur Verfügung stellt.

Auf der Flasche findet sich angegeben, wie viele Antitoxineinheiten in einem Kubikzentimeter sind. Sind es z. B. 10, so muß man eine passende Verdünnung herstellen. Mit einer äußerst genauen 1-ccm-Vollpipette, die auf Inhalt geeicht ist, wird 1 ccm aufgesaugt, wobei man darauf achtet, daß nichts von dieser dickflüssigen Flüssigkeit äußerlich auf der Pipettenspitze ist; event. muß man es abwischen, und der Inhalt wird in eine 19 ccm sterile physiologische Kochsalzlösung überführt, womit die Pipette mehrere Male sorgfältig ausgespült wird. 2 ccm von dieser Verdünnung, die eine Antitoxineinheit enthält, vermengt man jetzt mit dem Gifte, das auch, wenn es notwendig ist, verdünnt wird, so daß die Menge, die gemessen werden soll, ungefähr 2 ccm beträgt. Die Giftantitoxinmischung, deren Totalvolumen also ca. 4 ccm ist, läßt man $^1/_4$ Stunde im Spitzglase oder in der Spritze stehen, bevor sie, und zwar am liebsten mit einer KOCHschen Spritze, unter der Bauchhaut eines 250 g schweren Meerschweinchens eingespritzt wird.

Die Verbindung des Diphtherietoxins mit dem Antitoxin geht recht langsam vor sich, wie MORGENROTH[51]) bei intravenösen Injektionen auf Kaninchen nachgewiesen hat. Will man sicher gehen, daß die Reaktion beendigt ist, so muß die Mischung einige Stunden bei 37^0 stehen. Handelt es sich indessen um subkutane Injektionen auf Meerschweinchen, so braucht man die Mischung nur $^1/_4$ Stunde in der Zimmertemperatur stehen zu lassen, indem die Verbindung offenbar nach der Injektion in das subkutane Gewebe schnell vor sich geht. Bei der Bestimmung von L_+ auf Meerschweinchen ist es gleichgültig, ob die Injektion unmittelbar nach der Mischung oder nach langem Stehenlassen vorgenommen wird.

Die Genauigkeit, mit der man L_+ begrenzen kann, ist ziemlich groß. So sieht man aus obiger Tabelle, daß man 2,5 ccm deutlich von 2,6 ccm unterscheiden kann, d. h. daß man mit einer Genauigkeit von ungefähr 4 $^0/_0$ arbeitet, wenn man 6 Tiere für jede anwendet. Benützt man mehrere Tiere, so wird die Genauigkeit größer, mit weniger wird sie natürlich bedeutend geringer. L_+ hält sich unter gewisser Schwächung des Giftes recht konstant, verändert sich jedoch beständig, und wird die Schwächung des Giftes größer, wird, wie MADSENS[43]) Untersuchungen zeigten, auch L_+ deutlich erhöht.

Gibt uns die Bestimmung von L_0 und L_+ auch zum Teil Aufschlüsse über das Verhältnis des Diphtherietoxins zum Antitoxin, so werden wir darüber jedoch viel besser aufgeklärt durch partielle Sättigung des Toxins mit Antitoxin, wie dies EHRLICH zuerst und MADSEN[43]) später verwandte.

Unten ist ein solcher Versuch angeführt mit einem Toxin, wovon 0,002 ccm in ca. 4 Tagen tötete. Als Ausgangspunkt nahm man 0,1 ccm des Giftes, eine ganz willkürliche Menge, die ungefähr 50 tötende Dosen

enthielt. Zu dieser Menge Gift setzte man verschiedene Mengen Antitoxin, und darauf maß man, wieviel freies Gift diese Mischung enthielt.

Tabelle 5.

0,1 ccm Gift + untenstehd. Menge Antitoxin, in I.-E. ausgedr.	Injizierte Bruchteile d. Mischung	Resultat	Parese, Inkubationszeit in Tagen	0,1 ccm Gift + untenstehd. Menge Antitoxin, in I.-E. ausgedr.	Injizierte Bruchteile d. Mischung	Resultat	Parese, Inkubationszeit in Tagen
0,05	50	†5½		0,3	10	†2½	
—	—	†2		—	15	†4	
—	55	⚹		—	—	†2½	
—	—	†10		—	17	⚹	19
—	60	⚹		—	19	†8	
—	—	⚹		—	20	⚹	23
0,1	40	†3½		0,35	8	†1½	
—	—	†1½		—	10	†6	
—	43	†4½		—	12	†12	
—	45	⚹		0,4	5	†5½	
—	—	†4½		—	5	†5½	
—	50	⚹		—	6	†4	
—	—	⚹		0,45	2	†1½	
—	—	†8		—	3	†2½	
—	55	†1½		—	4	⚹	21
—	60	⚹	27	0,5		⚹	19
0,15	30	†5½		—		†12	
—	—	†1½		0,55		†9	
—	35	†2		0,6		○	21
—	40	⚹	27	0,8		○	21
—	—	†5		1		○	
0,2	25	†6½		2		○	
—	30	†5½		—		○	28
—	—	†2½		—		○	28
—	35	⚹	19	3		○	
—	—	⚹		4		○	
0,25	17	†2½					
—	20	†4					
—	25	⚹					

In der ersten Kolonne findet sich die Antitoxinmenge angegeben Soll man so geringe Mengen wie 0,1 ccm Gift und 0,05 Immunitätseinheit miteinander mischen, so müssen sie der Genauigkeit wegen verdünnt werden. Hat man z. B. ein Testserum, das in 1 ccm 12,25 Immunisierungseinheiten enthält, so kann man die 1 ccm zu 121,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnen. 1 ccm von dieser Verdünnung enthält dann 0,1 Immunisierungseinheit und 0,5 ccm die gewünschten 0,05 I.-E. Wenn man eine Verdünnung des Giftes 1:49 hat, so entsprechen 5 ccm also 0,1 ccm. Die Mischung von diesen beiden Verdünnungen steht 2 Stunden bei 37°. Wünscht man jetzt $^1/_{50}$, $^1/_{55}$ und $^1/_{60}$ dieser Mischung einzuspritzen, so verdünnt man sie am besten mit 194,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung, so daß man im ganzen 200 ccm hat, und davon spritzt man 4 ccm ($^1/_{50}$), 3,64 ccm ($^1/_{55}$) und 3,33 ccm ($^1/_{60}$) ein. Die anderen Bestimmungen macht man auf ähnliche Weise. Z. B. kann die Mischung mit 0,45 I.-E. dadurch hergestellt werden, daß man den 5 ccm der genannten Giftverdünnung 4,5 ccm Antitoxinverdünnung zusetzt. Von dieser betragen 4,75 ccm $^1/_2$, 3,17 ccm $^1/_3$ und 2,38 ccm $^1/_4$ Teil.

Jetzt sucht man zu bestimmen, welcher Bruchteil der verschiedenen Mischungen dieselbe Menge freien Giftes enthält, das Meerschweinchen in 4—5 Tagen tötet.

Diese Bruchteile sind in der zweiten, die Resultate in der dritten Kolonne angeführt.

Man erhält dann folgende Tabelle:

Tabelle 6.

0,1 ccm Toxin + untenstehd. Mengen Antitoxin, ausgedrückt in I-E.	Freie Toxineinheiten	Immunisierungseinheit. in Hundertstel	Toxineinheiten	Relative Toxizität	Toxizität nach ARRHENIUS und MADSEN
0	50	5	0	0	100
0,05	50	5	5	1	74,4
0,1	45	5	5	1	72,8
0,15	40	5	10	2	57,6
0,2	30	5	10	2	49,8
0,25	20	5	5	1	32,2
0,3	15	5	6	1,2	28,0
0,35	9	5	3	0,6	17,2
0,4	6	5	3	0,6	11,1
0,45	3	5	3	0,6	5,6
0,5	0				1,2

In der ersten Kolonne findet sich die zugesetzte Antitoxinmenge, und in der zweiten stehen die entsprechenden Mengen freier Toxineinheiten.

Wie man sieht, sind die Bestimmungen dieser letzten etwas willkürlich.

Um eine graphische Übersicht über das Resultat zu bekommen, ging EHRLICH von folgenden Betrachtungen aus:

Sieht man auf die Wirkung, die jeder hundertste Teil Antitoxin hervorbringt, so findet man, daß die ersten 5 die Toxizität nicht herabsetzen. Das hierdurch gebundene Gift hat also keine Giftigkeit und heißt Prototoxoid. Die nächsten 5 Hundertstel I.-E. schwächen die Toxizität von 50 auf 45, also um 5. Jedem Hundertstel Immunitätseinheit entspricht also eine Toxizität von 1.

Dasselbe gilt zwischen 0,1 und 0,15 I.-E.

Darauf wird die Toxizität stärker; so vermindert eine Erhöhung der Antitoxinmenge von 0,2 auf 0,25 I.-E. die Toxizität von 30 auf 20, d. h. um 2 Toxineinheiten pr. $^1/_{100}$ I.-E., ebenso zwischen 20 und 25. Die folgenden relativen Toxizitäten sind geringer und gehen zuletzt von 0,35 bis 0,5 I.-E, herab auf 0.6 pr. $^1/_{100}$ I.-E.

Dies drückt EHRLICH in einem Diagramm aus, wo er längs der Abszissenachse die Antitoxinmenge und als Ordinate die entsprechende Toxizität absetzt. Auf der unteren Figur findet sich die Skala rechts. Von einem solchen Diagramm kann man nach EHRLICH die Konstitution des Giftes ablesen, indem diese aus 5 ganz ungiftigen Teilen (Prototoxoid), darauf 10 Teile aus der Toxizität 1, darnach 10 Teile aus der Toxizität 2 (Deuterotoxin), 10 Teile aus der Toxizität 1 und endlich 15 aus der Toxizität 0,6 (Tritotoxin) bestehen soll.

MADSEN[42]) stellt dagegen das Neutralisationsbild zwischen Toxin und Antitoxin so dar, daß die Antitoxinmenge längst der Abzissenachse

und die entsprechende Toxicität als Ordinate abgesetzt werden. Diese Skala für die Toxicitäten findet sich links an der Figur.

Man erhält hierdurch eine gleichmäßig fallende Kurve (die schwarze in der Fig. 2).

Toxizität nach ARRHENIUS und MADSEN.

Toxizität nach EHRLICH.

Fig. 2.

Die in der Tabelle angegebene Schätzung der Toxizität durch Angabe der Menge tötender Dosen in jeder Verdünnung, ist indessen sehr zufällig. Ein bedeutendes genaueres Verfahren, das auf einer viel gründlicheren Ausnützung des Versuchsmaterials beruht, ist von ARRHENIUS und MADSEN[4]) empfohlen und im vorigen Kapitel behandelt. Die auf diese Weise erhaltenen Zahlen sind auf der Tabelle zuletzt angeführt. Der Übersichtlichkeit halber sind sie umgerechnet, so daß die Toxizität ohne Antitoxinzusetzung = 100 gesetzt ist.

Man sieht, daß diese Werte eine ziemlich gleichmäßig fallende Kurve bilden*). Die Ansichten über die Deutung dieser Phänomene gehen weit auseinander.

EHRLICH[13, 14, 19, 25, 51]) und seine Schule meinen, daß die Absättigung des Diphtheriegiftes durch Antitoxin genau so erfolgt, wie die einer starken Säure durch eine starke Base, und daß der Absättigungsverlauf durch eine gerade Linie und nicht durch eine Kurve dargestellt wird. Das Diphtheriegift besteht aus einer großen Menge Partialtoxine von verschiedener Toxizität und verschiedener Avidität zum Antitoxin.

ARRHENIUS und MADSEN[4, 42, 44]) sind dagegen der Ansicht, daß sich das Toxin und das Antitoxin mit einander mit schwacher Avidität und unter Dissoziationserscheinungen verbinden und daß sich die Neutralisationskurve nach den Massenwirkungsgesetzen berechnen läßt.

Es liegt außerhalb des Rahmens dieses Kapitels, näher auf die reichhaltige Literatur einzugehen, die diese Verschiedenheit der Anschauung geschaffen hat.

*) Die Werte sind mit - - - - eingezeichnet.

Literatur.

1) Abba, Fr., Über die Dauer des toxischen und antitoxischen Vermögens beim Diphtherietoxin und Antitoxin. Centralblatt für Bakt. 1898, Bd. XXIII.
2) Armand et Charrin, Formation des toxines. Bull. med. 1892, Nr. 47, pag. 957. Centralblatt für Bakt. etc. 1893, Bd. XIV.
3) Aronsohn, Weitere Untersuchungen über Diphtherie und das Diphtherieantitoxin. Berl. klin. Wochenschr. 1894, Nr. 18.
4) Arrhenius et Madsen, Le poison diphtérique. Acad. Royal des Sciences et des Lettres de Danemark 1904.
5) D'Arsonval et Charrin, Action des courants à haute frequence sur les toxines bacteriennes. Compt. Rend. de l'acad. 1896, Nr. 122, pag. 280.
6) Auclair, S., Recherches sur les poisons microbiens. Arch. de méd. expér. et d'anat. pathol. 1903, Tome XV, pag. 725—752. Centralblatt für Bakt. etc. Ref. 1904, Bd. XXXV.
7) Behring und Wernicke, Über Immunisierung und Heilung von Versuchstieren bei der Diphtherie. Zeitschr. für Hygiene etc. 1892, Bd. XII.
8) Bernheim, Über die Immunisierung von Versuchstieren gegen die Mischinfektion mit Diphtheriebazillen und Streptokokken. Archiv für Hygiene 1898, Bd. XXXIII.
9) Blumenthal, F, Über die Möglichkeit der Bildung von Diphtherietoxin aus Eiweißkörpern und auf Zucker enthaltendem Nährboden. Deutsche mediz. Wochenschr. 1897, Nr. 24.
10) Bonhoff, Über die Wirkung der Streptokokken auf Diphtheriekulturen. Hyg. Rundschau 1896, Nr. 3. Centralblatt für Bakt. etc. 1896, Bd. XIX.
11) Brieger und Boer, Über die Toxine der Diphtherie und des Tetanus. Deutsche med. Wochenschr. 1896, pag. 783.
12) Brieger und Fraenkel, Untersuchungen über Bakteriengifte. Berliner klin. Wochenschr. 1889, Nr. 11 und 12.
13) Calcar, van, Über die Konstitution des Diphtheriegiftes. Eine neue Methode zum Nachweis der Toxone. Berl. klin. Wochenschr. 1904, Nr. 39, pag. 1028.
14) Ders, Über Dialyse und einzelne ihrer Anwendungen. Zugleich eine Antwort an Römer. Berl. klin. Wochenschr. 1905, Nr. 43, pag. 1368.
15) Cobbet, Contribution à l'étude de la physiologie du bacille diphtérique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1897.
16) Dreyer, G., Über die Grenzen der Wirkung des Diphtherieheilserums gegenüber den Toxonen des Diphtheriegiftes. Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVII.
17) Dungern, v., Die Bedeutung der Mischinfektion bei Diphtherie. Zieglers Beiträge 1896, Bd. XXI.
18) Ders., Steigerung der Giftproduktion des Diphtheriebazillus. Centralblatt für Bakt. etc. 1896, Bd. XIX.
19) Ders., Beitrag zur Kenntnis der Bindungsverhältnisse bei der Vereinigung von Diphtheriegift und Antiserum. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 8 und 9.
20) Dzierzgowski et Rekowski, Recherches sur la transformation des milieux nutritifs par les bacilles de la diphtérie et sur la composition chimique de ces microbes. Centralblatt für Bakt. 1895, Bd. XVII.
21) Dzierzgowski, Sur la filtration des substances albuminoïdes à proprietès actives. Archives des sciences biol., Tome IV, pag. 3. Centralblatt für Bakt. etc. 1896, Bd. XIX.
22) Ehrlich, Croonian Lectures.
23) Ders., Wertbestimmung des Diphtherieheilserums. Jena 1897.
24) Ders., Konstitution des Diphtheriegiftes. Deutsche med. Wochenschr. 1898.
25) Ders., Über die Giftkomponenten des Diphtherietoxins. Berl. klin. Wochenschrift 1903, Nr. 35, 37.
26) Fraenkel, C., Immunisierungsversuche bei Diphtherie. Berliner klin. Wochenschrift 1890, pag. 1133.
27) Ders., Hygienische Rundschau 1894, Nr. 17.
28) Funck, Manuel de sérothérapie antidiphtérique, Paris 1895.
29) Gibier, Desscription d'un procédé permettent d'obtenir une toxine diphtérique extratoxique. Soc. de biologie 1897, pag. 393.
30) Guinochet, Contribution à l'étude de la toxine du bacille de la diphtérie. Archives de Médecine exper. 1892, Tome IV. Centralblatt für Bakt. etc. 1892, Bd. XII.
31) Ders., Sur la toxine du bacille de la diphtérie. La Semaine méd. 1892, Nr. 28. Centralblatt für Bakt. etc. 1892, Bd. XII.
32) Hilbert, P., Über die Steigerung der Giftproduktion der Diphtheriebazillen bei Symbiose mit Streptokokken. Zeitschr. für Hygiene 1898, Bd. XXIX.

33) Hitchens, Beziehung des Alkalitätsgrades zur Erzeugung von Diphtherietoxin. Centralblatt für Bakt., Ref. 1905, Bd. XXXVII.
34) Hitchens, A., Relation of the index of alkalinity to the production of diphtheria toxin. The Journ. of med. Research., Vol. XIII, Nr. 5.
35) Hougounnencq et Doyon, Les milieux de culture définis. Soc. de biol. 1896, Avril 18.
36) Klein, E., The preparation of Behrings diphtheriaantitoxin. The British med. Journ. 1894, Dec. 15. Centralblatt für Bakt. etc. 1895, Bd. XVIII.
37) Ders., Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der intracellulären Bakteriengifte. Centralblatt für Bakt. etc. 1894, Bd. XV.
38) Kossel, H., Zur Kenntnis des Diphtheriegiftes. Centralblatt für Bakt., Abt. I, Bd. XIX.
39) Krüger, Über die chemische Wirkung der Elektrizität auf toxische und immunis. Bakteriensubstanzen. Deutsche med. Wochenschr. 1895, pag. 331.
40) Madsen, Th., Zur Biologie des Diphtheriebacillus. Zeitschr. für Hygiene 1897, Bd. **26**, pag. 157.
41) Ders., Experimentelle Undersögelser over Difterigiften. Kopenhagen 1896.
42) Ders., La constitution du poison diphtérique. Bullet. de l'Acad. Royal des Sciences et des Lettres de Danemark 1903.
43) Ders., Sur la constitution du poison diphtérique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899.
44) Madsen et Arrhenius, Sur l'effet de Danysz. Medd. fra K. Vetenskapsakademiens Nobelinstitut 1906, Vol. I, Nr. 3.
45) Marenghi et Garino, Sulla preparazione dei prodo per la produzione della tossina difterica. Soc. Med. Chir. di Pavia 1898, Novembre.
46) Marmier, Les toxines et l'électricité. Ann. de l'Inst. Pasteur 1896, pag. 469.
47) Martin, L., Production de la Toxine Diphtérique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1896,
48) De Martini, L., Ricerche intorno al siero antidifterico ed alla sua preparazione. Centralblatt für Bakt. 1898, Bd. XXIV.
49) Marx, E., Die Bestimmung kleinster Mengen Diphtherieantitoxins. Centralblatt für Bakt. 1904. Orig.-Bd. XXXVI, pag. 141.
50) Minne, Études de l'action de la toxine diphtérique sur la température du corps et la circulation sanguine. Arch. internat. de Pharmacodyn. et de Thérapie, Tome XII.
51) Morgenroth, J., Untersuchungen über die Bindung von Diphtherietoxin und Antitoxin, zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Konstitution des Diphtheriegiftes. Zeitschr. für Hygiene 1904, Bd. XLVIII.
52) Murillo, F., Über die Diphtherietoxinkurve. Centralblatt für Bakt. 1904, Bd. XXXV, pag. 203.
53) Naegel, J., Über das Diphtheriegift, seine Konstitution, Herstellung und Wirkung. Dissertation 1901.
54) Nicolle, M., Préparation de la toxine diphtérique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1896, Nr. 6.
55) Park and Williams, The production of diphtheria toxin. Journ. of exper. Med. 1896, Vol. I, Nr. 1. Centralblatt für Bakt. 1896, Bd. XX.
56) Rist, Sur la toxicité des corps de bacilles diphtériques. Soc. de biol. 1903. Nr. 25. Ref. Centralblatt für Bakt., Bd. XXXIV, pag. 377.
57) Römer, P. H., Über dialysiertes Diphtheriegift. Berl. klin. Wochenschr. 1905, Nr. 8.
58) Rosenau, The immunity unit for standardizing Diphtheria antitoxin. Hygienic Laboratory Bull. April 1905, Nr. 21.
59) Roussel, Quelques procédés pour la production de la toxine diphtérique. Thèse pour le Doctorat en Médecine 1900, Mai 18.
60) Roux et Yersin, Contribution a l'Étude de la Diphtérie. Ann. de l'Institut Pasteur 1888, Nr. 12.
61) Dies., Contribution a l'Étude de la Diphtérie. Ann. de l'Institut Pasteur 1889, Nr. 6.
62) Dies., Contribution a l'Étude de la Diphtérie. Ann. de l'Institut Pasteur 1890, Nr. 7.
63) Roux et Martin, Contribution a l'Étude de la diphtérie. Ann. de l'Institut Pasteur 1894.
64) Ruete, Über Herstellung des Diphtherie-Heilserums. Münch. med. Wochenschrift 1897, pag. 213.
65) Schierbeck, N. P., Über den Einfluß der Kohlensäure auf das Wachstum und die Toxinbildung der Diphtheriebazillen. Archiv für Hygiene, Bd. XXVII, Heft 4. Centralblatt für Bakt. 1897, Bd. XXI.

66) SCHRFIDER, v., Über Mischkulturen von Streptokokken und Diphtheriebazillen. Centralblatt für Bakt. 1892, Bd. XII.
67) SMIRNOW, Über die Behandlung der Diphtherie mit künstlich dargestellten Antitoxinen. Berl. klin. Wochenschr. 1895, Nr. 30.
68) SMITH and WALKER, A comparative study of the toxin production of diphtheria bacilli. State Board of Health of Mass 1896, Vol. XXVIII.
69) Dies., A comparative study of the toxin production of diphtheria bacilli. Centralblatt für Bakt. 1898, Bd. XXIII.
70) SMITH, TH., Degrees of susceptibility to diphtheria toxin among guinea-pigs. Transmissions from parents to offspring. The Journal of Med. Research. 1905, Vol. XIII, pag. 341.
71) Ders., The relation of dextrose to the production of toxin in bouillon cultures of the diphtheria bacillus. The Journal of experim. Med. 1899, Vol. IV.
72) Ders., Conditions influencing the appearance of toxin in cultures of the bacillus of diphtheria. Medical Record 1896, May 9. Ref. Centralblatt für Bakt. 1896, Bd. XX.
73) SPRONCK, H., Sur les conditions dont dépend la production du poison dans les cultures diphtériques. Ann. de l'Institut Pasteur 1895, pag. 758.
74) Ders., Préparation de la toxine diphtérique. Ann. de l'Institut Pasteur 1898, pag. 701.
75) TURENHOUT, H. F. v., Over de bereiding van diphtheriegift. Dissert. Utrecht 1895. Ref. Centralblatt für Bakt. 1902, Bd. XXXI.
76) UFFENHEIMER, ALBERT, Der Nachweis des Toxins in dem Blute des Diphtheriekranken. Münch. med. Wochenschr. 1906, pag. 1607.
77) USCHINSKY, Über eine eiweißfreie Nährlösung für pathogene Bakterien nebst einigen Bemerkungen über Tetanusgift. Centralblatt für Bakt. 1893, Bd. XIV.
78) Ders., Über Diphtheriekulturen auf eiweißfreier Nährlösung. Centralblatt für Bakt. 1897, Bd. XXI.
79) WASSERMANN und PROSKAUER, Über die von den Diphtheriebazillen erzeugten Toxalbumine. Deutsche med. Wochenschr. 1891, pag. 585.
80) WOOD, CARTWRIGHT, On the difference in action of the homoeoplasmatic and heteroplasmatic toxines produced by the Diphtheria bacillus. Centralblatt für Bakt. 1902, Bd. XXXI, pag. 241.
81) WOOD, G. E. C., A preliminary note on a method for rapidly producing diphtheria antitoxins. The Lancet 1896, April 11. Centralblatt für Bakt. 1896, Bd. XX.
82) ZINNO, A., Beitrag zum Studium der Entstehung der Toxine, mit besonderer Berücksichtigung neuer Kulturböden mit starker Erzeugung von Toxinen. Centralblatt für Bakt. 1902, Bd. XXXI.

IV.

Tetanustoxin.

Von

Dr. M. v. Eisler und **Dr. E. Přibram**

in Wien.

Einleitung.

Der Tetanus ist eine bereits im Altertum bekannte Krankheit. Schon seit langem wußte man, daß der Wundstarrkrampf der Verunreinigung von Wunden mit Erde oder Staub seine Entstehung verdankt. Bereits um die Mitte des vorigen Jahrhunderts wurde die Entstehung eines Giftes in der Wunde angenommen. Carle und Rattone[23]) gelang es im Jahre 1884, durch Übertragung des Eiters eines Tetanischen auf Kaninchen bei diesen dieselbe Krankheit zu erzeugen. Damit war also der Beweis von der Infektiosität des Tetanus erbracht. Noch im selben Jahre fand Nicolaier[66]) eine Gartenerde, die, auf Mäuse, Meerschweinchen, Kaninchen übertragen, bei diesen Tetanus erzeugte. Die Krankheit ließ sich auch durch Übertragung des Wundeiters von Tier zu Tier fortpflanzen. In der Umgebung der Infektionsstelle fand Nicolaier unter anderen Mikroorganismen, einen langen, borstenförmigen Bazillus mit einer endständigen Spore. Die Reinzüchtung dieses Bazillus gelang nicht. Im Jahre 1886 fand Rosenbach[72]) auch bei einem Falle von menschlichem Tetanus ähnliche Stäbchen und konnte durch Überimpfung auf Versuchstiere auch bei diesen Tetanus erzeugen; eine Reinzüchtung gelang aber auch ihm nicht, ebensowenig wie vielen anderen Nachuntersuchern, die den charakteristischen Bazillenbefund bestätigten.

Brieger[12]) versuchte aus Mischkulturen des Tetanusbazillus in sterilem Fleischbrei Gifte zu isolieren und gewann aus solchen Kulturen folgende Gifte: Durch Fällung mit Platinchlorid erhielt er ein Ptomain „Tetanin" von der Formel $C_{13}H_{30}N_2O_4$, das, hypodermatisch beigebracht, eine ähnliche Wirkung hatte, wie der Tetanusbazillus. Ein zweites Gift, Tetanotoxin genannt, erhielt er durch Destillation der alkalisierten Kulturen in strömendem Wasserdampf; dieses hatte die Zusammensetzung $C_5H_{11}N$. Ferner beschreibt Brieger noch ein drittes, exquisiten Tetanus hervorbringendes, daneben die Speichel- und Tränensekretion anregendes, endlich ein viertes, heftige tonische und klonische Krämpfe erzeugendes Gift, das Spasmotoxin. Wie wir heute wissen, ist keines dieser von Brieger dargestellten Toxine mit dem eigentlichen Tetanusgifte identisch. Diese Briegerschen Gifte unterscheiden sich schon in ihrer Wirkungsweise sehr wesentlich vom spezifischen Gifte des Tetanusbazillus, da

z. B. das Tetanin bei Mäusen sofort nach der Injektion Starrheit, dann Krämpfe und Trismus, zuletzt Tod hervorbrachte, das Tetanotoxin 10 bis 15 Minuten nach der Einverleibung zu konvulsivischen Anfällen führte, die an Stärke und Ausdehnung zunehmend in allgemeinen Lähmungen endigten. Diese Gifte wirkten also schon ohne Inkubation und wurden von Brieger für den Alkaloiden nahestehende Körper angesprochen. Knud Faber[33]) arbeitete als erster mit dem Gifte des Tetanus Bacillus, das erst nach Ablauf einer bestimmten Inkubationzeit wirkt. Er stellte das Gift dar durch Kultivierung von 5 Minuten auf 100° erwärmter Gartenerde in flüssigem Serum und Filtration desselben durch Chamberlandkerzen.

Erst im Jahre 1891 gelang es Kitasato[47]), den Tetanusbazillus in Reinkultur zu züchten. Das von ihm zu diesem Zwecke angegebene Verfahren ist folgendes: Er strich den Eiter einer mit Tetanus infizierten Wunde auf schräges Blutserum oder Agar. Die geimpften Röhrchen bleiben 24 Stunden im Brutschrank. Nach dieser Zeit sind die übrigen Mikroorganismen gewachsen; zwischen ihnen sieht man bei mikroskopischer Untersuchung die Bazillen mit Köpfchensporen. Nach 48 Stunden sind sie reichlicher an Zahl. Diese Kultur wird dann $^3/_4$—1 Stunde lang im Wasserbade bei 80° C gehalten. Die übrigen Mikroorganismen sind dann abgetötet, die Tetanussporen aber noch lebensfähig. Von dieser Kultur impfte dann Kitasato eine Öse in Gelatine und goß Platten, die in einer Wasserstoffatmosphäre bei 18—20° C gehalten wurden. Nur auf diesen — nicht auf ebenso beschickten Platten, die aber nicht vor Sauerstoff geschützt waren — entwickelten sich nach einer Woche Kolonien, die den Tetanusbazillus in Reinkultur enthielten. Natürlich ist der Erfolg des Kitasatoschen Verfahrens an die Bedingung geknüpft, daß sich im betreffenden Wundsekrete nicht noch andere widerstandsfähige Sporen befinden. Statt einer einstündigen Erwärmung auf 80° erhitzte Nicolaier drei Minuten lang auf 100° C und konnte auf diese Weise ebenfalls Reinkulturen des Tetanusbazillus erhalten. Kitasato und Weyl[48]) verwendeten dann die Briegersche Methode der Giftdarstellung auch bei einer Reinkultur des Tetanus in schwach alkalischer Rindsbouillon. Sie stellten eine Platinverbindung des „Tetanus“ dar, die durch Schwefelwasserstoff in wässeriger Lösung zersetzt wird. Das erhaltene Chlorhydrat stellt sehr zerfließliche, schwach gelbliche, nadelförmige Kristalle dar. Dieses Gift bewirkt bei Mäusen erst in großen Dosen (0,1 g) Krampferscheinungen und Speichelfluß, ist also auch nicht mit dem eigentlichen Gifte zu identifizieren. Dagegen fanden Kitasato und Weyl außer dieser giftigen Platinverbindung noch ein zweites Gift, das sie Tetanotoxin nannten, und das noch in kleinen Mengen (0,003 g) Lähmungen der Extremitäten und Rückenmuskeln, aber keine Krämpfe erzeugte und das erst nach einer gewissen Inkubationszeit wirkte. Kitasato[47]) wies dann auch nach, daß man mit dem bakterienfreien Filtrat einer Tetanusbouillonkultur bei Tieren genau dieselbe Krankheit erzeugen kann als mit der Kultur, daß somit das Krankmachende nur das von den Bazillen produzierte Gift ist.

Gewinnung des Toxins.

a) Präparation der Bouillon.

Das allgemein übliche Verfahren zur Gewinnung des Tetanustoxins ist die Züchtung in Bouillon unter anaeroben Bedingungen. Nach

Kitasato[47]) verwendet man am besten gewöhnliche Rindsbouillon von neutraler oder schwach alkalischer Reaktion (10—15 ccm Normallauge pro Liter). Diese soll möglichst frisch sein; in älterer Bouillon erfolgt das Wachstum langsamer (Beginn erst nach zwei Tagen) und ist die Toxizität eine geringere. Nach Vaillard et Vincent[86]) verläuft das Wachstum in Rindsbouillon so, daß nach 24 Stunden bei 36° eine Trübung auftritt, die in den folgenden Tagen immer mehr zunimmt bis zum 15. Tage, dann tritt eine Verlangsamung des Wachstums ein und Bildung eines Bodensatzes. Die Kultur hat den charakteristischen Geruch nach Fettsäuren und läßt beim Schütteln Gasblasen aufsteigen. Nach zehn Tagen sind nur mehr sporentragende Bazillen in der Kultur.

Als wachstumfördernde Zusätze für Bouillon wurde eine ganze Reihe von Stoffen empfohlen, besonders Traubenzucker in der Menge von 1 bis 2 %. Der Zucker wirkt reduzierend und der Tetanusbazillus wächst viel üppiger; dagegen soll der Traubenzucker weniger günstig für die Toxinbildung sein. Nichts destoweniger haben wir auch in 2 %iger Traubenzuckerbouillon recht gute Gifte erhalten, welche mit Ammonsulfat ausgesalzen in Mengen von 0,00001—0,000001 g weiße Mäuse in drei bis vier Tagen töteten. Ebenso wie Glukose wirkt auch Maltose. Außer dem bereits erwähnten Zusatz von ameisensaurem Natrium oder indigschwefelsaurem Natrium empfiehlt Kitasato[47]) noch den Zusatz von 5 ccm Lackmustinktur auf 100 ccm Bouillon.

Eine Erhöhung der Giftigkeit der Tetanusbouillon kann man nach Brieger und Cohn[15]) bewirken durch Zufügen alter, stark eingedampfter, mit Alkohol gefällter und im Vakuum scharf getrockneter Typhuskultur oder indem man gefaultes Fleisch mit salzsäurehaltigem Wasser auslaugt, dann mit Alkohol fällt, den Niederschlag trocknet und zur Bouillon zusetzt.

Ferner gibt Brieger[13]) außer der von Roux und Yersin empfohlenen Milchsäure im Verhältnis 1 : 1000 höheren Gehalt der Bouillon an Chloriden, bis zu 2 %, als günstig für die Giftbildung an. Der fördernde Einfluß des durch Alkoholfällung aus alten Typhuskulturen gewonnenen Niederschlages wurde bereits erwähnt. Außerdem kann man aber auch auf eine mindestens 14 Tage alte abgetötete Typhusbouillonkultur mit gutem Erfolge impfen, nur muß man diese vor der neuen Impfung wegen der gebildeten Basen neutralisieren, am besten mit Milchsäure. Die auf eiweißhaltigem Nährboden vor sich gehende Basenbildung beeinträchtigt die Giftbildung. Ein Liter Tetanusbouillon enthält nach sieben Tagen so viel Basen, daß zu seiner Neutralisierung 17—38 ccm Normalsäure erforderlich sind. Durch Zusatz von 20 g Gips auf 1 l Bouillon wird das sich bildende schädliche kohlensaure Ammon in das unschädliche Ammonsulfat übergeführt und man erzielt höchst giftige Kulturen. Auf abgetöteten Cholerakulturen gedeiht der Tetanus nur dürftig. Einen abschwächenden Einfluß auf die Giftbildung haben geringe Zusätze von Mehl oder Dextrin, wenn auch durch Kalkkarbonat für die Neutralisierung sich eventuell bildender Säuren gesorgt wird.

Durch Zusatz von Lac sulfuris werden flüchtige schwefelhaltige Verbindungen gebildet und dadurch wird die Giftigkeit herabgesetzt. Der Tetanusbazillus bildet bei seinem Wachstum außer H_2S auch flüchtige organische Schwefelverbindungen, besonders Methylmercaptan. Nach Vaillard und Vincent[86]) ist auch der Zusatz von Eieralbumin, frischem Serum oder Blut von Rind, Meerschweinchen, Kaninchen, wenig günstig für das Wachstum.

Eine starke Steigerung der Toxinbildung erzielten Vaillard et Vincent[86]) dadurch, daß sie das Filtrat einer 20tägigen Tetanuskultur in 1%iger Rinderbouillon, von dem $^1/_{50}$ ccm ein Meerschweinchen tötete, mit frischem Tetanus impften. Das Filtrat dieser neuen Kultur nach 18 Tagen tötete ein Meerschweinchen noch in der Menge von $^1/_{500}$ ccm. Für eine dritte Aussaat waren in diesem Filtrate keine Nährstoffe mehr vorhanden. Fügt man aber etwas frische Bouillon zu, 20 ccm auf 350 ccm Filtrat, so erhält man noch hinreichendes Wachstum und ein sehr stark giftiges Filtrat, von dem sogar noch ein $^1/_{1000}$ ccm ein Meerschweinchen tötet.

Übrigens besteht kein direkter Zusammenhang zwischen Üppigkeit des Wachstums und Stärke der Giftbildung. So fanden Vaillard et Vincent[86]) in frischem Blut oder Serum spärliches Wachstum, aber starke Toxinbildung. Ebenso gibt auch Kitasato[16]) Blutserum als schlechten Nährboden für Tetanusbazillen an, während Tizzoni und Cattani[80]) gutes Wachstum damit erzielt haben wollen.

Über die Verwendung eiweißfreier Nährböden zur Kultivierung der Tetanusbazillen sind die Meinungen geteilt. Brieger[13]) behauptet, daß der Tetanusbazillus nicht so wie B. coli oder V. cholerae auch auf eiweißfreien Nährböden gedeiht, sondern zu seinem Wachstum der Eiweißkörper oder mindestens hoch komplizierter Abkömmlinge derselben bedarf. Dagegen erzielte Uschinsky[81]) auf dem von ihm angegebenen Nährboden (100 g Wasser, 30—40 g Glyzerin, 5—7 g NaCl, 0,1 g $NaCl_2$, 0,2—0,4 g $MgSo_4$, Dikaliumphosphat 2—2,5 g, 6—7 g Ammon. calc., 3,4 g Natrium asparaginicum) bei Zusatz von 1—2% Traubenzucker und Überschichtung mit Paraffinum liquid. gutes Wachstum. Derartige drei bis vier Wochen bei 36° C gehaltener Kulturen waren ebenso giftig wie gleich alte Bouillonkulturen.

Auch Buchner[21]) konnte mit dem Filtrate aus eiweißfreien (Asparagin, Mineralsalze) Tetanuskulturen tetanische Erscheinungen erzeugen. Praktisch kommt diese Art der Züchtung wohl nicht in Betracht.

In der Rindsbouillon mit oder ohne Traubenzuckerzusatz, als dem gewöhnlichen Nährboden zur Toxingewinnung, wächst, falls sie frisch ist, der Tetanusbazillus ziemlich rasch und ist das Maximum der Giftbildung zwischen 10. und 15. Tage erreicht, Züchtung bei Bruttemperatur vorausgesetzt. Kulturen, die bei 38° gehalten werden, sind schon nach 18 Stunden giftig. Viel langsamer erfolgt das Wachstum bei einer Temperatur von 20—25° C. Solche Kulturen werden erst zwischen der zweiten und dritten Woche toxisch.

Unter 14° C findet überhaupt kein Wachstum statt. In älterer Bouillon ist das Wachstum, wie bereits Kitasato[47]) angibt und ich auch mich überzeugen konnte, wesentlich langsamer und fand ich auch erst nach ca. drei Wochen Toxine. In solchen Kulturen hält sich aber das Toxin selbst durch mehrere Monate ziemlich unverändert. In frischen Bouillonkulturen wird, wie erwähnt, das Maximum der Giftigkeit schon zwischen dem 10. bis 15. Tage erreicht und nimmt von da an kontinuierlich ab.

Bezüglich der Giftproduktion verschiedener Stämme zeigen sich beim Tetanus keine so großen Unterschiede wie z. B. bei der Diphtherie. Die Verhältnisse liegen hier viel günstiger und alle Autoren haben mit ihren verschiedenen Stämmen bei geeigneter Züchtung wirksame Gifte erhalten. Ferner lassen sich Tetanusstämme lange Zeit auf künstlichen Nährböden fortzüchten, ohne ihre giftbildende Fähigkeit einzubüßen. Es genügt ungefähr alle 14 Tage auf Zuckeragar in Stichkultur zu übertragen.

b) Methoden der anaëroben Züchtung.

Der Tetanusbazillus bildet sein Gift vorzugsweise bei Züchtung unter anaeroben Bedingungen, doch ist die Abwesenheit des Sauerstoffs kein absolutes Erfordernis; unter gewissen Bedingungen kann der Tetanusbazillus auch bei mehr oder weniger reichlichem Luftzutritt gedeihen und Gift produzieren. Bei dem allgemein üblichen Verfahren zur Toxingewinnung wird aber die anaerobe Züchtung angewandt, deren Prinzip auf Verdrängung der Luft aus dem Nährboden oder auf Anwendung reduzierender Stoffe beruht. Diese beiden Zwecke können auf verschiedene Weise erreicht werden, und wir besitzen auch eine große Reihe von Arten der anaeroben Züchtung. Wenn wir von älteren Angaben [Tizzoni und Cattani[81]), Fermi und Pernossi[35])] absehen, nach denen der Tetanusbazillus in festem Nährboden, Gelatine und Agar, ein wirksameres Gift erzeugen soll als in der Bouillon, so ist der allgemein gebräuchliche Nährboden zur Toxingewinnung die Bouillon. Es sollen also hier nur die zu diesem Zwecke geeigneten Methoden der anaeroben Züchtung besprochen werden.

Bei einem von Gruber[39]) angegebenen Verfahren werden lange Reagenzgläser verwendet, deren oberes Drittel zu einem Hals verengt ist. Die Nährlösung wird mittelst engen Trichters eingeführt, und zwar gibt man auf 10 ccm derselben noch 2 ccm sterilen destillierten Wassers wegen der beim Evakuieren erfolgenden Eindickung. Nach Beschickung des Nährmaterials mit dem Impfstoff wird der Wattepfropf bis zum Halse hinuntergeschoben und darüber ein Gummipfropf eingesetzt, der eine Bohrung hat und durch ein Glasrohr mit einer Luft- oder Wasserstrahlpumpe verbunden wird. Nachdem alle Luft ausgepumpt ist, wird die verengte Stelle abgeschmolzen.

Nach Zupnik[92]) wird das Vakuum auf folgende Weise erzeugt. Zylindrische Kulturgefässe, die an beiden Enden verjüngt und mittelst Glashähnen luftdicht abschließbar sind, werden mit der Nährlösung gefüllt, sterilisiert und geimpft. An das eine Ende des Gefässes wird mittelst Gummischlauches ein mit Quecksilber gefülltes Glasrohr angefügt, die Öffnung des Rohres mit dem Finger zugehalten, der Apparat umgestülpt und unter Quecksilber gebracht. Jetzt wird der untere Hahn geöffnet; durch das nun erfolgende Ausfliessen der Nährlösung entsteht ein Vakuum im Kulturgefäß. Ist ein Teil der Bouillon abgesogen, so wird der Hahn wieder geschlossen, worauf das Wachstum unter anaeroben Verhältnissen erfolgen kann.

Die Verdrängung der Luft aus der Bouillon kann ferner durch Durchleiten eines anderen, für Bakterien natürlich indifferenten Gases erfolgen. Am besten eignet sich dazu Wasserstoff, während z. B. Kohlensäure für Bakterien giftig ist. Am bequemsten ist es, den Wasserstoff fertig in einer eisernen Bombe vorrätig zu halten. Eine solche käufliche Bombe enthält eine größere Menge Wasserstoff unter hohem Druck, ist mit einem Manometer und einem schraubbaren Ventil armiert, so daß die Zufuhr des Wasserstoffs zur Bouillon genau reguliert werden kann. Wenn man nicht über eine solche Bombe verfügt, so erzeugt man das Wasserstoffgas im Kippschen Apparat, durch Übergießen von gekröntem möglichst reinem Zink mit verdünnter Schwefelsäure. Das im Apparat erzeugte Gas wird zunächst noch durch mehrere Vorlaggefäße, Wulfsche Flaschen behufs Reinigung geleitet, und zwar eine Flasche mit 10 % Bleinitratlösung (zur Absorption etwaiger Schwefelwasserstoffspuren), eine

Flasche mit 10 % Silbernitratlösung (zur Absorption des Arsenwasserstoffes) und eine Flasche mit alkalischer 1 % Pyrogalluslösung (zur Absorption etwaigen Sauerstoffes). Zur Durchleitung des Wasserstoffs durch das Nährmaterial bedient man sich am einfachsten der von C. Fraenkel[37]) und Hueppe[44]) fast gleichzeitig angegebenen Vorrichtung. In der Öffnung des Kulturgefäßes sitzt ein gut schließender Gummistöpsel, der mit zwei Bohrungen versehen ist. Durch die eine Bohrung führt ein rechtwinkelig gebogenes Glasrohr fast bis an den Boden des Gefäßes; dieses steht mit dem Wasserstoffapparate in Verbindung, so daß das Gas gezwungen ist, durch die Bouillon seinen Weg zu nehmen und die Luft daraus zu verdrängen. Ein zweites, ebenfalls rechtwinkelig gebogenes Rohr reicht nicht ganz bis zur Oberfläche der Bouillon und dient zum Austritt des Wasserstoffes. Außer diesen einfachen Gefäßen wurden auch ähnliche von Petri und Maassen[69]) angegeben, bei denen Zu- und Ableitungsrohr angeblasen sind. Wenn alle Luft aus dem Kulturmaterial verdrängt ist, wovon man sich durch Anzünden des Wasserstoffgases an der Ausströmungsöffnung überzeugen kann — man beobachtet dabei die Vorsicht, erst nachdem einige Zeit Wasserstoff durchgeströmt ist, anzuzünden, um die Bildung von Knallgas zu vermeiden — wird zuerst das ableitende, dann das zuführende Rohr luftdicht verschlossen. Der Verschluß kann durch gut passende Gummipfropfen, durch Abschmelzen der Glasrohre oder in der Weise geschehen daß man die beiden Glasröhren des Kulturgefäßes mit einigen zentimeterlangen starken Kautschukschläuchen versieht und diese dann abklemmt.

Zur Erzeugung größerer Toxinmengen kann man zweckmäßig in folgender Weise vorgehen. Man impft eine Anzahl Kolben, die eine größere Menge Bouillon enthalten. Um einen vollkommen sichern Abschluß der Luft zu erzielen, wird über die Bouillon in den Kolben noch eine mehrere Zentimeter hohe Schichte von Paraffinum liquidum geschichtet, mit der die Bouillon bereits sterilisiert wird, so daß beim Kochen die Luft entweicht. Man wählt dazu starkwandige Kolben, weil

Fig. 1.

durch die später vor sich gehende Gasentwicklung dünnwandige Kolben zerspringen können Nach der Impfung werden die früher mit einem gewöhnlichen Wattepfropf verschlossenen Kolben mit dem doppelt durchbohrten Kautschukpfropfen, der die beiden Glasrohre enthält, versehen; an den freien Enden der Glasröhren sind Kautschukschläuche angebracht.

Natürlich werden alle die drei genannten Bestandteile vor dem Gebrauche sterilisiert. Zur Durchleitung des Wasserstoffgases werden die Kolben nun durch sterile Glasröhren miteinander verbunden, und zwar natürlich in der Weise, daß der erste Kolben durch sein langes Rohr mit dem Wasserstoffapparate, durch sein kurzes mit dem langen Rohre des zweiten Kolbens, dieser wieder durch sein kurzes Rohr mit dem langen des dritten usw. kommuniziert. (Fig. 1). Durch diese Verbindung wird erreicht, daß der Wasserstoff durch die Bouillon sämtlicher Kolben geht und beim kurzen Rohre des letzten Kolbens austritt. Nachdem durch ca. 15 Min. Wasserstoff durchgeströmt ist — man reguliert das Zuströmen des Gases so, daß ungefähr 1—2 Blasen in der Sekunde aufsteigen — wird der am kurzen Glasrohre des letzten Kolbens angebrachte Kautschukschlauch mit einer Klemme luftdicht geschlossen, hierauf in der gleichen Weise der Schlauch des langen Rohres des ersten Kolbens; endlich werden alle Verbindungsschläuche der einzelnen Kolben abgeklemmt, so daß der Inhalt jedes Kolbens nunmehr vor Luftzutritt vollständig geschützt ist. Vor dem Einstellen der Gefäße in den Brutschrank zieht man auch noch das lange Glasrohr aus der Bouillon ganz heraus, damit die sich entwickelnden Gase die Bouillon nicht durch das Rohr hinauftreiben können (siehe Fig. 2.) Vorsichtshalber kann man noch die beiden Bohrungen des Kautschukpfropfens und die Öffnung des Kolbens mit Paraffin abdichten.

Fig. 2

Statt die Luft durch Durchleiten von Wasserstoff zu verdrängen, kann man den Sauerstoff der Luft auch durch reduzierende Mittel entfernen, und zwar nach Buchner[20]) durch alkalische Pyrogallussäure. In ein größeres reagensglasähnliches Gefäß kommt nach der Angabe von Buchner 1 g Pyrogallussäure und 1 ccm einer $^1/_{10}$ %igen Kalilauge. Auf dem Boden des Gefäßes befindet sich ein Drahtgestell, auf welches das geimpfte Reagensglas mit etwas gelockertem Wattepfropf gestellt wird. Ein heute wohl nicht mehr geübtes Verfahren — von der Verwendung des Traubenzuckers abgesehen — besteht darin, dem Nährboden selbst reduzierende Mittel zuzusetzen. Als solche wurden hauptsächlich empfohlen: Ameisensaures Natrium in einer Menge von 0,3—0,5 % und indigoschwefelsaures Natrium in der Menge bis zu 0,1 %.

In weniger vollkommener Weise kann man Anaeroben zum Wachstum bringen dadurch, daß man diese Bakterien in hochgeschichteten Nährböden oder bei mechanischer Behinderung des Luftzutrittes kultiviert. Die Bouillon wird mit Paraffinum liquid. überschichtet, das sich nach Fermi u. Bassu[34]) am besten zu diesem Zwecke eignet; das Öl fanden diese Autoren ungeeignet. Sehr gut verwendbar sind Gefäße, wie das in Figur 3 abgebildete. Dasselbe besitzt oben eine kugelförmige Erweiterung zur Aufnahme des Paraffinum liquid. An die kugelförmige Auftreibung schließt sich ein enger Hals, der in einen Kolben übergeht (Fig. 3). Wenngleich sich auf diese Weise ein ganz gutes Wachstum des Tetanusbazillus erzielen läßt, namentlich wenn dieser von einer Reinkultur, also

Fig. 3.

in größerer Menge übertragen wird, ist dieses Verfahren zur Gewinnung hochwertiger Gifte nicht so geeignet, da dabei eine vollständige Abwesenheit von Sauerstoff nicht erreicht wird und dieser die Giftbildung ungünstig beeinflußt. Das Verfahren verdient also nur wegen seiner Einfachheit Erwähnung und kann ja im Notfalle immerhin verwendet werden.

c) Methoden der aeroben Züchtung.

Alle die bisher angegebenen Verfahren haben das Ziel, die Luft respektive den Sauerstoff derselben vom Nährmaterial abzuhalten. Aber auch bei Luftzutritt ist es gelungen, aus dem Tetanusbazillus wirksame Gifte zu erhalten. Diese Art der Züchtung rührt von Debrand [30]) her und beruht auf der Symbiose des Tetanusbazillus mit andern aeroben Bakterien. Dieser Autor geht dabei in folgender Weise vor. Mehrtägige, am besten sechs Tage alte Bouillonkultur von Bac. subtilis und Tetanusbazillus läßt man zwei Minuten lang zur Abtötung der Bazillen sieden; dann werden sie zur gleichmäßigen Verteilung der Sporen gut durchgeschüttelt. Diese Bouillon wird in Röhrchen verteilt, welche zugeschmolzen werden und so vor Luft und Licht geschützt bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank aufbewahrt werden können. Bei der Impfung behufs Toxingewinnung wird ein Liter Bouillon mit je 1 ccm der beschriebenen Subtilis- und Tetanusbouillon beschickt. Man wähle dabei Gefäße mit weitem Halse, um der Luft unbehinderten Zutritt zu verschaffen. Zuerst entwickelt sich die Kultur des Bac. subtilis; nach 24 Stunden beginnt der Tetanus zu wachsen. Die Bouillon wird in den nächsten Tagen gelblich und dicker wie bei einer gewöhnlichen anaeroben Tetanuskultur. Die Kultivierung erfolgt am besten bei 36° C. Da nach einer Beobachtung von Metschnikoff der lebende Bac. subtilis das Tetanusgift abschwächt, darf man die Kulturen nicht länger als 5—6 Tage im Brutschranke lassen, zu welcher Zeit das Maximum der Giftbildung eingetreten ist. Dieses Verhalten zeigt sich nach Debrand nur bei Verwendung frischer Bouillon, während in älterer Bouillon ($2^1/_2$ Monate alt) dieser schädliche Einfluß von ihm nicht konstatiert werden konnte. In einer alten Bouillon wird nach Debrand das Maximum der Giftigkeit ebenfalls am sechsten Tage erreicht; diese nimmt aber nicht wie in der frischen Bouillon rasch ab, sondern hält sich längere Zeit auf der gleichen Höhe. Einen gleich günstigen Effekt hatte die aerobe Züchtung des Tetanusbazillus mit Bac. mesentericus; bei Milzbrand war die Giftbildung eine schwächere. Der Bac. prodigiosus, welcher die Infektion mit B. tetani in vivo begünstigt, hatte in der Kultur keinen fördernden Einfluß. Debrand gibt ferner an, daß er mit seinem Verfahren ebenso wirksame Gifte erhalten habe als mit der gewöhnlichen anaeroben Züchtung, und daß das ducrh aerobe Züchtung erhaltene Toxin ebenso gutes Antitoxin liefert wie das gewöhnliche. Worauf dieser wachstumbefördernder Einfluß des Bac. subtilis beruht, darüber findet sich bei Debrand keine Angabe.

An dieser Stelle sei auch kurz erwähnt, daß es bereits Tizzoni und Cattani [80]) gelungen ist, den Tetanusbazillus in aerober Weise auf Kaninchenserum, das nach ihnen von virulenten Stämmen verflüssigt wird, zu züchten. Dasselbe erreichte Hibler [42]) durch Kultivierung auf Hirnbrei. In jüngster Zeit wurden diese Versuche wieder aufgenommen von Tarozzi [78]), der Organe gesunder Tiere in Bouillon brachte und in dieser den Tetanusbazillus bei Luftzutritt wachsen sah. Ähnliche Resultate erzielte Wrzosek [91]). Doch fehlt bisher jede Angabe, ob der so gewachsene Tetanusbazillus auch Gifte produziert.

d) Darstellung und Konservierung des Giftes.

Eine in der beschriebenen Weise gezüchtete Tetanusbouillon enthält das Gift in gelöster Form. Für die Auswertung des Toxins und auch für experimentelle Untersuchungen wird aber solches Gift nicht verwendet, weil dasselbe auch nach Zusatz der gebräuchlichen Antiseptika noch lebensfähige Sporen enthält, die in den Tierkörper eingebracht, auskeimen und unberechenbare Mengen von Gift produzieren können. Dazu kommt auch noch, daß das Arbeiten mit sporenhaltigem Material die Möglichkeit einer Infektion vergrößert. Die Entfernung der Sporen geschieht entweder durch scharfes Zentrifugieren der Bouillon oder durch Filtration. Die erstere Methode erfordert eine sehr gute Zentrifuge und ziemlich langes Zentrifugieren; auch dann ist das Resultat vielleicht kein ganz sicheres, da noch immer einzelne Sporen zurückbleiben können. Deshalb ist es viel sicherer, die Entfernung der Sporen und zugleich auch der Bazillen durch Filtration zu bewerkstelligen. Alle die gebräuchlichen Bakterienfilter können zu diesem Zwecke verwendet werden. Von französischen Autoren wurden die von Pasteur und Chamberland angegebenen Filter aus Biskuitporzellan benutzt. Kitasato verwendete ebenfalls Filter aus Porzellan. Sehr gut, besonders zur Filtration größerer Flüssigkeitsmengen sind auch die Pukallfilter aus gebranntem Kaolin. Bei dem Pukallschen Filter wird die Flüssigkeit von außen nach innen gesaugt. Die Tonzelle wird in die Bouillon eingesetzt und mit einem zentral gebohrten Kautschukpfropfen versehen. Durch die Bohrung geht ein rechtwinkelig gebogenes Glasrohr, das mit einer Luftpumpe oder Wasserstrahlpumpe in Verbindung steht, wodurch im Innern des Filters ein Vakuum hergestellt werden kann. Zwischen Filter und Luftpumpe kann man noch einen sterilen Glaskolben, der in der gleichen Weise, wie es bei der Toxingewinnung ausführlich beschrieben wurde, montiert ist, einschieben. Auf diese Weise können größere Mengen der Bouillon filtriert werden, ohne daß man gezwungen ist, den Apparat zur Entleerung des Filters auseinanderzunehmen. Die Giftverluste durch die Filtration sind für das Tetanusgift keine allzugroßen, jedenfalls erhält man auch im Filtrat sehr wirksame Gifte. Bekanntlich sind die einzelnen Filter selbst derselben Art in ihrer Durchlässigkeit sehr verschieden, was besonders für bereits öfter gebrauchte Filter gilt. Genauere Angaben über die Menge der im Filter zurückgelassenen Gifte haben Vaillard und Vincent[84]) gemacht. Sie fanden, daß, wenn sie eine gebrauchte Kerze 12 Stunden in sterilem Wasser getaucht hielten, das filtrierte Waschwasser noch imstande war, in größeren Mengen bei Meerschweinchen tödlichen Tetanus zu erzeugen. Selbst das zweite Waschwasser enthält noch etwas Gift.

Sowohl aus infiltrierter Kulturflüssigkeit, als auch aus der keimfrei gemachten Bouillon kann man das Gift auch in fester Form darstellen. Um den bereits erwähnten Übelstand — das Vorhandensein lebensfähiger Sporen — zu vermeiden, empfiehlt es sich auch bei der Darstellung des festen Toxins, die Bouillon vorher zu filtrieren. Die Darstellung des Trockentoxins beruht auf dessen Eigenschaft, aus der Bouillon durch Fällung der Eiweißkörper mitgerissen zu werden. Am besten eignet sich zu diesem Zwecke der zuerst von Brieger und Cohn[15]) verwendete Ammonsulfat, da man durch Fällung der Bouillon mit diesem Salze eine sehr gute Toxinausbeute erzielt und das Gift durch dieses Fällungsmittel nichts von seiner Wirksamkeit verliert. Die Bouillon wird bis zu ihrer voll-

ständigen Sättigung mit festem kristallisierten Ammonsulfat versetzt. Nach kräftigem Umrühren muß noch ein Rest von ungelöstem Ammonsulfat auf dem Boden des Gefäßes zurückbleiben. Um sicher zu sein, daß die Bouillon mit Ammonsulfat gesättigt ist, empfiehlt es sich, diese mit einem Überschuß des Salzes noch auf einige Stunden in den Brutofen zu stellen. Falls die Sättigung keine vollständige war, ist auch die Fällung und mithin die Menge des ausgeflockten Giftes eine geringere. Nach der Ausfällung, die zuerst in feineren Flocken erfolgt, sammelt sich das Eiweiß mit dem Gifte in Form von größeren Stücken auf der Oberfläche der Bouillon. Diese dunkelbräunlichen Massen können mittelst eines Spatels herausgefischt werden und werden hierauf zur Entfernung der Flüssigkeit und des überschüssigen Ammonsulfats auf Tontellern abgepreßt. Man darf dabei den Niederschlag nicht zu lange auf dem Tonteller lassen, weil er sonst antrocknet und so fest haftet, daß seine Entfernung Schwierigkeiten macht. Der auf dem Tonteller abgepreßte Niederschlag wird zu seiner vollständigen Trocknung auf Glasplatten ausgebreitet und in einen Exsikkator mit konzentrierter Schwefelsäure gebracht. Das auf diese Weise dargestellte Trockentoxin kann dann in einer gewöhnlichen Reibschale pulverisiert werden. Dieses Pulver ist sehr gut löslich in Wasser oder Kochsalzlösung und eignet sich sehr gut zum Arbeiten, da man sich durch Abwägen einer bestimmten Menge immer eine gleich starke Lösung herstellen kann. Der Hauptvorteil dieses Trockengiftes liegt aber in seiner ausgezeichneten Konservierbarkeit. Dieses Gift kann ohne irgend welche Kautelen, bei freiem Luftzutritt, wenn es nur vor Licht geschützt wird, bei Zimmertemperatur beliebig lange Zeit aufgehoben werden, ohne in seiner Wirksamkeit zurückzugehen. Selbst höhere Temperaturen schaden diesem Gifte, solange es trocken ist, nicht.

Auch durch Trocknen im Vakuum läßt sich das Gift in festem Zustande herstellen, freilich nicht in so bequemer und einfacher Weise, wie durch die Fällung im Ammonsulfat. Nach der Angabe von Courmont und Doyon[28]) bringt man die filtrierte Bouillon in dünner Schicht ausgebreitet in einen Vakuumapparat und verdampft die Bouillon bei einer Temperatur von 30° C. Nach dem Verdampfen pulverisiert man den Rückstand und hebt ihn in einem luftleer gemachten Rezipienten vor Licht und Wärme geschützt auf. Nach jeder Entnahme stellt man das Vakuum wieder her.

Die so überaus einfache Konservierbarkeit des mit Ammonsulfat ausgesalzenen Trockengiftes fällt um so schwerer ins Gewicht, als die Aufbewahrung des flüssigen Giftes ohne Einbuße seiner Wirksamkeit kaum gelingt. In dieser Beziehung ist das Tetanusgift viel empfindlicher als das Diphtheriegift, welches in Flaschen vor Licht und Wärme geschützt, ganz gut mehrere Monate ohne wesentliche Verluste aufbewahrt werden kann. Das Tetanusgift geht, unter solchen Bedingungen aufbewahrt, beständig und sehr stark in seiner Wirksamkeit zurück. Auch verschiedene Zusätze (Natriumphosphat, Malachitgrün) oder das von Knorr[50]) empfohlene Versetzen der Giftlösung mit Kochsalz bis zu 10% haben sich nicht vollständig bewährt. Das nach Knorr konservierte Gift ist außerdem sehr empfindlich gegen Erwärmen, schon gegen Brutschranktemperatur und wird auch durch Zusatz von Karbolsäure geschädigt. Auch bei Aufbewahrung unter Toluol, oder wie Courmont und Doyon[28]) angeben, unter Öl läßt sich das Gift nicht ganz unverändert aufbewahren. Um also ein vollkommen konstantes Gift zu

haben, was besonders für Prüfungen von Antitoxin große praktische Bedeutung hat, muß man dieses in trockenem Zustande aufbewahren, man verwendet die Ammonsulfatfällung oder die freilich nicht so einfache Methode von E. Marx[61]). Dieses Verfahren zur Erhaltung konstanter Tetanusgifte wurde von Marx angegeben, um das jedesmalige Abwägen, wie es bei Verwendung des Ammonsulfaltgiftes nötig ist, zu vermeiden. Man geht dabei in folgender Weise vor: Da man von dem mit Ammonsulfat ausgesalzenen Trockengift nicht bestimmte Gewichtsmengen in Vakuumröhrchen einschließen kann, weil beim Evakuieren leicht Gift zerstäubt wird, wird das frische mit Ammonsulfat gefällte und wieder gelöste Gift, das noch viele Sporen enthält, eine Stunde lang mit 4000 Touren pro Minute zentrifugiert. Der klare Abguß wird wieder mit Ammonsulfat ausgesalzen, gelöst und wieder zentrifugiert. Nach 3 bis 4maliger Wiederholung dieser Prozedur ist das Gift relativ sporenfrei. Natürlich könnte man statt des langdauernden Zentrifugierens auch die Filtration zur Entfernung der Sporen benutzen. Das auf eine oder die andere Weise sporenfrei gemachte Gift wird in dem 10fachen Gewichtsverhältnisse Wasser gelöst, und von dieser Lösung werden Ehrlichsche Vakuumapparate mit genau abgemessenen (Präzisionspipetten) Mengen beschickt. Die Röhrchen werden im Exsikkator über Nacht getrocknet und dann am andern Tage nach Zusammensetzung der Apparate und Beschickung derselben mit Phosphorsäureanhydrid völlig evakuiert. An einem oder einigen solcher Röhrchen ermittelt man nun in wieviel Wasser man den Inhalt eines Röhrchens zweckmäßig löst, um die für eine Prüfung nötigen Dosen in einer passenden Flüssigkeitsmenge zu haben. Das auf diese Weise konservierte Gift ist natürlich unbegrenzt haltbar, aber auch gegen äußere Eingriffe ist es sehr resistent. So erwiesen sich Gifte, die einen Monat bei 37° C gehalten wurden, völlig unverändert und selbst solche, die wochenlang einer Temperatür von 50° oder $^1/_4$ Stunde von 100° ausgesetzt worden waren, zeigten nur relativ geringe Abschwächung.

Reindarstellung, Natur und Eigenschaften des Giftes.

a) Methoden zur Reinigung.

Nach den bereits in der Einleitung erwähnten Versuchen von Brieger[12]) sowie von Kitasato und Weyl[48]), in denen diese Autoren aus Tetanuskulturen giftige Körper gewannen, welche jedoch mit dem spezifischen von diesem Bazillus produzierten Toxin nicht identisch waren, wurde dann im Jahre 1890 fast gleichzeitig von Brieger und Fraenkel[16]) sowie von Kitasato und Weyl ein eiweißähnlicher Körper (Toxalbumin) in den Tetanusbouillonkulturen gefunden, der dieselben Erscheinungen bei Tieren hervorbrachte, wie die Bazillen selbst.

Brieger und Fraenkel fällten damals auch ebenso wie bei der Diphtherie das Gift aus der Bouillonkultur durch Sättigung mit Ammonsulfat; außerdem verwendeten sie auch absoluten Alkohol zur Fällung. Sie dampften das Filtrat einer Bouillonkultur bei 30° C im Vakuum auf $^1/_3$ seiner Volumens ein und ließen dann das eingeengte Filtrat in die 10fache Menge absoluten Alkohols, dem einige Tropfen Essigsäure zugesetzt waren, einfallen. Der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert. Der wasserlösliche Ammonsulfatniederschlag wurde durch Dialyse gereinigt. Die Verfasser glaubten damals, das diese Toxalbumine aus den Eiweißkörpern des Tierkörpers oder des Nährbodens durch die Bakterien gebildet werden.

Demgegenüber nahm Buchner[21]), da es ihm gelungen war, den Tetanusbazillus auf eiweißfreien Nährboden zu kultivieren und mit den Filtraten dieser Nährböden tetanische Erscheinungen zu erzeugen, an, daß das Toxalbumin aus den Bakterienleibern selbst stamme und dadurch die Spezifität der Giftwirkung erklärbar sei.

Auch Vaillard und Vincent[86]) benutzten bei ihren Studien über den Tetanus Eiweißfällungsmittel zum Mitreißen des Giftes. Sie erzeugten in der Giftbouillon Niederschläge mit Kalk oder Aluminiumphosphat, konnten aber dadurch keine vollständige Ausfällung des Giftes bewirken, denn selbst nach sechs Ausfällungen bleibt die Flüssigkeit noch aktiv. Der Gehalt an organischer Substanz eines solchen Phosphatniederschlages ist gering; auf 1 mg Niederschlag kommt 0,3 mg organische Substanz. Vaillard und Vincent impften, wie bereits beschrieben wurde, zur Steigerung der Giftbildung, das Filtrat einer 20tägigen Tetanusbouillonkultur abermals mit Tetanus. Von dem Filtrat einer hergestellten Giftlösung gab 1 ccm im Vakuum getrocknet, 0,04 g Trockensubstanz; von dieser sind 0,025 g organische Substanz. Selbst angenommen, daß alle diese organische Substanz Toxin wäre, was doch sicher nicht zutrifft, wäre die Dos. letal. für ein Meerschweinchen 0,000025 g, für eine Maus nur 0,000,00025 g.

Versuche einer Reindarstellung des Giftes verdanken wir namentlich Brieger und seinen Mitarbeitern, Brieger und Cohn[15]) fällten die durch Pukallfilter geschickte Tetanusbouillon in der bereits beschriebenen Weise durch Sättigung mit Ammonsulfat. Der gut abgepresste und getrocknete Niederschlag enthält noch 6.5 % Ammonsulfat. Das Filtrat war nach der Fällung unwirksam, so daß man bei der Fälluug durch Ammonsulfat von einer quantitativen Fällung sprechen kann. Die Dos. letal. des Filtrates vor der Fällung betrug 0,00005 ccm, die des Trockentoxins 0,0000001 gr. Das so gewonnene Toxin war natürlich noch außer durch Salze auch durch die mitgefällten Eiweißkörper der Bouillon verunreinigt. Die Entfernung des Eiweißes erzielten Brieger und Cohn durch vorsichtige Behandlung des Niederschlags mit basischem Bleiacetat unter Zusatz minimaler Mengen von Ammoniak. Diese Prozedur setzte die Giftigkeit nicht herab, war aber auch häufig von Mißerfolg begleitet, da bei einem Plus oder Minus von Bleiacetat Eiweiß in Lösung bleibt. Das Unlöslichmachen des Eiweißes durch Erhitzen, durch Alkohol, durch Sublimat war erfolglos. Durch 24—48stündiges Dialysieren gegen strömendes Wasser wurden noch die Peptone, Amidosäuren und Salze entfernt; eine wesentliche Einbuße des Gifts erfolgte durch das Dialysieren nicht. Die durch Dialyse gereinigte, gifthaltige Flüßigkeit wurde im Vakuum bei 20—22° C eingedampft; dabei wurden auch die riechenden Produkte verflüchtigt. Das gereinigte Toxin bildet beim Trocknen schwach gelbliche, durchsichtige Häutchen. Diese sind leicht in Wasser löslich, geruchlos, schmecken nach Gummi arabikum und drehen die Polarisationsebene nach links. Dieses Gift enthält, wenn es ausgiebig dialysiert wurde, nur wenig Asche, gibt keine Millon'sche und keine Xanthoproteinreaktion mehr, ferner beim Kochen mit Eisenchlorid keine Rotfärbung, enthält also nicht mehr Amidosäuren. Dagegen gibt es mit Kupfersulfat und Lauge schwache Violettfärbung, nicht aber die eigentliche Rosafärbung, der Biuretreaktion. Das Gift enthält keinen Phosphor und nur unwägbare Mengen von Schwefel. Dieses gereinigte Gift ist nicht mehr fällbar, weder durch Natriumchlorid, Natriumsulfat oder Magnesiumsulfat, noch durch Calciumphosphat, kohlensaure Magnesia oder Aluminium-

hydroxyd. Das gereinigte Toxin ist also kein Eiweißkörper im eigentlichen Sinne, denn seine Eigenschaften entsprechen nicht dem Charakter des gewöhnlichen Eiweißes. Bei subkutaner Injektion ist die Dos. letal. dieses Giftes für eine weiße Maus 0,00000005 g. Das gereinigte Gift ist sehr wenig beständig; beim Aufbewahren, selbst unter Abschluß von Luft, Licht und Feuchtigkeit zersetzt es sich langsam.

Einen ähnlichen Weg zur Reinigung des Giftes schlug TIZZONI[82]) ein. Er filtrierte die Tetanusbouillon durch BERKEFELD-Filter und fällte das Filtrat mit Ammonsulfat. Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst und abermals mit Ammonsulfat gefällt. Der Niederschlag der zweiten Fällung wurde in Wasser oder 1 $^0/_0$ iger Kochsalzlösung gelöst sind 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert. Dann wurde die Flüssigkeit im Vakuum bei 20—22° C eingedampft, der Rückstand über Schwefelsäure vollständig getrocknet, gab gelbbraune, glänzende Plättchen.

BRIEGER und COHN[15]) haben bereits gefunden, daß ihr gereinigtes Gift durch die gewöhnlichen Eiweißfällungsmittel nicht mehr ausgeflockt wird. In einer späteren Arbeit machte BRIEGER[13]) die Beobachtung, daß mit zunehmender Giftigkeit der Bouillon zugleich auch die Aussalzbarkeit des Giftes durch Ammonsulfat schwindet. BRIEGER erklärt dieses Verhalten dadurch, daß die Giftbildung auf Kosten der Peptone respektive Albumosen erfolgt, und die Niederschlagskraft des Ammonsulfats von dem Vorhandensein der Albumosen abhängt, mit denen das Gift mechanisch mitgerissen wird. Derartige mechanische Ausfällungen des Tetanusgiftes erreichte BRIEGER auch durch sukzessive Behandlung der Filtrate mit Chlorcalcium und phosphorsaurem Natron. Das gereinigte Gift wird aber auch durch diese Salze nicht gefällt. Zur Ausfällung des Toxins aus hochgiftigen Kulturen verwendete BRIEGER mit gutem Erfolge neutrales Bleiacetat, und zwar 5 g auf 100 ccm Bouillon. Diese wird mit dem Bleisalz gut durchgeschüttelt, der Niederschlag mit Wasser gewaschen. Das Freimachen des Giftes aus dem Niederschlag gelang durch Schütteln desselben mit schwefelsaurem Natron. Am Schlusse seiner Arbeit sagt BRIEGER, daß eine vollständige Reinigung bis zum Schwinden der Biuretreaktion ohne gleichzeitige Einbuße an Giftigkeit bisher nicht gelungen sei; doch scheine ihm die Biuretreaktion nicht dem Gifte als solchen, sondern schwer zu entfernenden Verunreinigung desselben anzuhaften.

BRIEGER und BOER[14]) erreichten ferner auch mit Zinkchlorid eine quantitative Fällung des Toxins. Dieser Niederschlag ist in destilliertem Wasser ganz unlöslich, daher gut waschbar, löslich in kochsalzhaltigem oder schwach alkalischem Wasser. Durch Einleiten von Kohlensäure in das durch Alkali gelöste Zinktoxin, bleibt das Gift stets beim Metall. Die gereinigte Zinktoxinverbindung enthält keine Spur von Eiweiß oder Pepton; sie gibt weder die Xanthoprotein, Biuret noch die ADAMKIEWICZ'sche Reaktion, beim Kochen mit MILLON'schen Reagens tritt keine Rotfärbung auf, die Polarisationsebene wird nicht abgelenkt. 1 Liter Tetanusbouillon gibt 3 g Zinktoxin, die ca. 0,3 g organische Substanz enthalten. Eine Trennung der Toxin-Zinkverbindung, die nur durch CO_2, nicht durch Mineralsalze fällbar ist, ist nur durch Natriumphosphat möglich. Dem befreiten Toxin, haften hartnäckig anorganische Substanzen an.

VAILLARD und VINCENT[86]) haben das Filtrat einer giftigen Bouillonkultur im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet. Sie erhielten dabei einen amorphen, braunen Rückstand, der den Kulturgeruch hatte und sehr toxisch war. 90 $^0/_0$ Alkohol löst nur einen geringen Teil dieses Rückstandes. Durch Verdampfen des Alkohols erhält man einen weiß-

grauen Rückstand, von dem ein Teil an der Luft krystallisiert. Der alkohollösliche Teil hat keine toxischen Eigenschaften. Der vom Alkohol nicht gelöste Teil des Rückstandes ist wasserlöslich und sehr toxisch. Aus der wässerigen Lösung wird er durch Alkohol in grauen Flocken gefällt.

b) Natur des Giftes.

Da bisher eine vollständige Reindarstellung des giftigen Prinzipes nicht gelungen ist, so können wir auch über die Natur des Giftes nichts Bestimmtes aussagen. Unsere Kenntnisse über das Tetanustoxin sind in dieser Hinsicht ebenso mangelhaft wie in Bezug auf die andern bakteriellen Toxine. Wegen der in vielen Punkten bestehenden Ähnlichkeit wurden sowohl das Diphtherie- als auch das Tetanusgift häufig mit den Fermenten verglichen oder sogar indenfiziert. Diese Ähnlichkeit liegt in der Wirksamkeit dieser Körper in kolossal geringen Mengen, in der schädlichen Einwirkung von Licht und höheren Temperaturen und dem geringen osmotischen Drucke. Freilich haben wir durch diesen Vergleich nicht viel gewonnen, weil wir auch über die Natur der Fermente aus demselben Grunde wie bei den Toxinen im Unklaren sind. Das Tetanusgift verdaut nach Vaillard und Vincent[86]) nicht Eiweiß, läßt auch den Zucker unverändert, wohl aber ist in der Tatanusbouillon ein Gelatine verflüssigendes Ferment vorhanden. Auch die Einreihung des Tetanustoxins unter die Alkaloide konnte nicht aufrecht erhalten werden. Fermi und Pernossi[35]) fanden, daß das Tetanusgift unlöslich ist in den gewöhnlichen Lösungsmitteln der Alkaloide und im Gegensatz zu diesen durch tierische Membranen nicht diffundiert. Auch von anderen Autoren (Brieger, Tizzoni und Cattani, Vaillard und Vincent) wurde die Eigenschaft des Tetanusgiftes nicht oder nur sehr schwer zu dialysieren, festgestellt. Nach Versuchen von Vaillard und Vincent[86]) ist erst nach dreitägiger Dialyse soviel Gift in der Außenflüssigkeit, daß $^1/_5$ ccm ein Meerschweinchen tötet.

c) Abschwächung des Giftes. Physikalische und chemische Einflüsse.

Es wurde bereits bei der Konservierung des Toxins erwähnt, daß dieses im flüssigen Zustande äußerst labil ist. Auch beim Aufbewahren im Eisschrank geht das Gift beständig zurück. Nach Untersuchungen von Behring[4]) nimmt das Gift im Eisschrank unter dem Einflusse des Luftsauerstoffes innerhalb drei Wochen um das drei- bis vierfache ab. Selbst bei Aufbewahrung unter Toluol tritt mit der Zeit eine Abschwächung des Giftes ein. Außer auf natürlichem Wege kann eine Abschwächung auch durch verschiedene Chemikalien erzielt werden. In erster Linie ist das Jod zu nennen. Roux und Martin[73]) empfahlen Lugol'sche Lösung. Am besten bekannt und auch zu Immunisierungszwecken verwendet ist die von Behring und seinen Schülern studierte Abschwächung durch Jodtrichlorid. Behring und Knorr[6]) fanden bei Einwirkung nur 0,05 $^0/_0$ Jodtrichloridlösung auf eine Giftösung in 10 $^0/_0$ Kochsalzinnerhalb 24 Stunden eine Abschwächung um das 400fache, nach fünf Monaten um das 4000fache. Bei stärkeren Lösungen von Jodtrichlorid fand Behring[4]) eine entsprechende stärkere Giftabschwächung. Z. B. bei Einwirkung einer 0,15 $^0/_0$igen Lösung auf eine wässerige Lösung des Tetanusgiftes eine 500fache Abschwächung nach 36 Stunden, durch eine 0,2 $^0/_0$ige Lösung war nach 36 Stunden selbst die 4000fache Menge der Dos. let. von unsicherer Wirkung.

Durch Behandlung von Tetanusgift mit Schwefelkohlenstoff erzielte EHRLICH eine rasche Entgiftung. (Klin. Jahrbuch, Bd. VI.) Er konnte von dem so vorbehandelten Gifte 6,5—10 ccm weißen Mäusen ohne Schaden injizieren. Da die so behandelten Mäuse schon nach 8 Tagen eine Grundimmunität gegen Tetanusgift, die durch unverändertes Gift bei diesen Tieren nur sehr schwer und erst nach langer Zeit zu erreichen ist, erlangten und dieses modifizierte Gift befähigt ist, Antikörper zu bilden, nahm EHRLICH an, daß durch die Einwirkung des Schwefelkohlenstoffes auf das Tetanusgift Toxoide entstehen.

Das mit 10% NaCl Zusatz gelöste Gift ist aber gegen chemische Einflüsse viel empfindlicher als bei geringerem Kochsalzgehalt. Nach BEHRING und RANSOM[7]) zeigen die abgeschwächten Gifte, sowohl die auf natürliche Weise als die durch Jodtrichlorid, Unterschiede gegenüber den frischen Giften. Bei diesen abgeschwächten Giften ist die Differenz zwischen tödlicher und krankmachender Dosis verändert. Bei Toluolgiften ist sie größer, bei Jodtrichloridgiften kleiner als beim genuinen Toxin. Ferner bedürfen diese Gifte zur Neutralisation der gleichen Anzahl letaler Dosen mehr Antitoxin als das nicht abgeschwächte Gift, ein Verhalten, das nach den Untersuchungen EHRLICHS über das Diphtheriegift für das Vorhandensein von Toxoiden sprechen würde. Diese Gifte haben auch eine veränderte Inkubationszeit; diese ist bei den Jodtrichloridgiften erheblich verlängert. Endlich fand BEHRING[4]) eine Veränderung des spezifischen Giftwertes gegenüber verschiedenen Tieren. So z. B. entspricht die einfache letale Dosis für eine weiße Maus dem 150. Teile der dosis letal. für ein Kaninchen auf 1 g lebende Körpersubstanz berechnet. Bei einem Toluolgift fand BEHRING nicht mehr dies Verhältnis Maus: Kaninchen wie 1 : 150, sondern wie 1 : 15, bei einem andern war der Wert für Kaninchen sogar noch niederer. Eine Zusammenstellung über die Wirkung verschiedener Chemikalien auf das Tetanusgift findet sich schon bei KITASATO[47]). Er konnte schon damals den abschwächenden Einfluß des Jodtrichlorid und Kreosots feststellen, dagegen war das Jodoform ohne Wirkung. Eine 0,55%ige Lösung von Salzsäure zerstört das Gift in einer Stunde, eine 0,365%ige in 24 Stunden. Auch gegen andere Säuren, besonders Mineralsäuren und Alkalien ist das Gift nach KITASATO ziemlich empfindlich. Ähnliche Resultate erhielten FERMI und PERNOSSI[35]); längere Zeit widersteht das Gift der Essigsäure.. Das durch Säuren unwirksam gewordene Gift kann durch Neutralisation nicht mehr activiert werden. Nach TIZZONI und CATTANI[81]) hat Kohlensäure auf eine wässerige Giftlösung weder einen fällenden noch einen zerstörenden Einfluß. Essigsäure wirkt erst in größeren Mengen schädigend, Salzsäure zerstört das Gift, ohne Einfluß fanden diese Autoren Alkalien, ebenso Neutralsalze. Alkohol schädigt das Gift, Äther, Chloroform, Äthylacetat, propionsaures, ameisensaures, Äthyl sind nach KITASATO ohne Einfluß, ebenso Verdünnungen mit Bouillon oder Wasser. Das normale Serum verschiedener Tiere verändert ebenfalls nicht das Tetanusgift. FERMI und PSRNOSSI[35]) untersuchten auch den Einfluß verschiedener Fermente auf das Gift. Ohne Wirkung waren Ptyalin, Diastase, Emulsin, zweifelhaft war die Wirkung beim Trypsin. Die Zerstörung des Giftes durch Magensaft beruht auf dessen Gehalt an Salzsäure, nicht auf dem Pepsingehalt. Das Toxin widersteht auch der Wirkung verschiedener Mikroben. Das Unwirksamwerden des Giftes durch den lebenden Darm von Meerschweinchen und Katzen, nicht von Hunden oder Hühnern, erklären FERMI und PERNOSSI durch die

Wirkung des Epithels. Brieger, Kitasato und Wassermann[17]) fanden, daß der wässerige Auszug aus frischer Kalbsthymus, zur Tetanusbouillon zugesetzt, die Giftproduktion herabsetzt. Wenn sie zu einer sporenfreien Tetanusbouillon, erhalten durch Kultivierung in streng neutraler Peptonbouillon unter Wasserstoff, in der sich trotz üppigen Wachstums innerhalb der ersten 30 Stunden keine Sporen entwickeln, Thymusauszug zusetzten, trat bei sofort nach der Mischung erfolgter Injektion keine Abschwächung ein, wohl war aber diese deutlich, wenn die Giftthymusmischung vor der Injektion 24 Stunden lang im Eisschrank stehen blieb.

Einen zerstörenden Einfluß auf das Tetanustoxin haben Substanzen, die oxydierend wirken. Nach Versuchen von Sieber[76]) ist besonders Calciumsuperoxyd wirksam. Durch 0,5 g dieses Körpers werden 1000 letal. Dosen des Tetanustoxins innerhalb einiger Stunden entgiftet. Etwas weniger intensiv wirkte Wasserstoffsuperoxyd; doch konnte Sieber mit 0,5 ccm mit einer 1%igen Lösung noch bis 600 letale Dosen innerhalb weniger Stunden entgiften. Einen ähnlichen Einfluß auf das Toxin haben Oxydasen, sowohl aus tierischen Organen (Leber, Milz, Niere) hergestellte als auch eine pflanzliche, Lakkase genannt. Ähnliche Untersuchungen über die Wirkung des Wasserstoffsuperoxyd auf das Tetanusgift machte Loewenstein[55]). Wenn er zu 5000 letalen Dosen 1 ccm einer 3%iger H_2O_2 Lösung zusetzte, so war nach 24 Stunden noch unzersetztes H_2O_2 und wirksames Toxin vorhanden; nach 72 Stunden war der Entgiftungsprozeß abgelaufen, vorausgesetzt, daß das H_2O_2 nicht zu alt war. Je älter dieses ist, desto mehr bedarf man davon zur Entgiftung. Das Toxin wird durch das Wasserstoffsuperoxyd vollständig zerstört, denn es wirkt nicht mehr giftig, es bindet kein Antitoxin mehr, und es ist auch nicht mehr möglich mit einem derartig vorbehandelten Gifte zu immunisieren.

In letzter Zeit veröffentlichte Wolff-Eisner[90]) Versuche, in denen er nach der Methode von Bergell, nämlich Einwirkung von wasserfreier Salzsäure bei Temperatur der flüssigen Luft, hergestelltes Tetanustoxin studierte. Er fand eine eigentümliche Veränderung des so behandelten Giftes. Vom nativen Toxin tötete 1 ccm, einer Verdünnung 1:1000000, eine Maus in zwei Tagen. Das nach Bergell hydrolisierte Toxin hatte seine tödliche Wirkung verloren, die krampferzeugende behalten. 4 ccm 1:100000 des vorbehandelten Giftes vermag eine Maus nicht mehr zu töten. Nach Wolff-Eisner handelt es sich nicht um eine einfache Giftabschwächung, weil er auch bei Injektion von 4 ccm 1:1000000 des vorbehandelten Giftes die krampferzeugende Wirkung erhalten fand. Versuche über die immunisatorische Wirkung derartig modifizierter Gifte stehen noch aus.

Der schädigende Einfluß der Luft respektive des Sauerstoffs wurde bereits bei der Aufbewahrung und Abschwächung der Gifte beim Stehenlassen erwähnt. Sehr zahlreiche Untersuchungen wurden über die Giftzerstörung durch Wärme gemacht. Wenngleich feststeht, daß das Gift durch höhere Temperaturen abgeschwächt respektive bei deren längerer Einwirkung zerstört wird, so schwanken die Angaben der verschiedenen Autoren über die Höhe dieser Zerstörungstemperatur nicht unbeträchtlich. Kitasato[47]) gibt an, daß das Toxin $1^1/_4$ Stunde der Temperatur von 55° C ausgesetzt, noch wirksam ist, nach $1^1/_2$ Stunde nicht mehr. 60° C kann das Toxin 15 Minuten lang vertragen, nach 30 Minuten ist es schon abgeschwächt. Temperaturen von 68° und darüber zerstören das Gift schon nach 5 Minuten. Diese Versuche Kitasatos beziehen sich auf sporenfreies, flüssiges Gift. Die Sporen sind ja bekanntlich

gegen Wärme sehr resistent, ebenso verträgt auch das Toxin im trockenen Zustande höhere Wärmegrade. Ähnliche Angaben machte KNUD FABER[33]), VAILLARD und ROUGET[85]) fanden bei 65° C bloß eine Abschwächung des Giftes, ja selbst wenn dieses durch 1 Stunde auf 80° C erhitzt wurde, konnten sie mit einer größeren Menge (13 ccm) noch schweren Tetanus erzeugen. Die Sporen enthalten nach diesen Forschern auch Gift, außer dem in die Bouillon übergegangenen, und zwar soll dieses Gift gegen Erhitzen widerstandsfähiger sein als freies. Auch SANCHEZ-TOLEDO[75]) bekam mit einer größeren Menge auf 80° und selbst 90° erhitzten Giftes noch Tetanus. FERMI und PERNOSSI[35]) fanden 85° C als Zerstörungstemperatur für das flüssige Gift, das vollkommen trockene verträgt selbst Erhitzung auf 120° ohne Schaden. Nach KNORR[50]) wird das flüssige Gift selbst durch Erhitzen auf 100° zuweilen noch nicht vollständig zerstört. Versuche über den Einfluß der Wärme machten auch TIZZONI und CATTANI[81]), die als Zerstörungstemperatur 60—80° angeben, ferner MORAX und MARIE[58]) und zwar mit Trockentoxin. Dieses verliert 15 bis 20 Minuten auf 120° erhitzt nicht wesentlich an Wirksamkeit. Erst durch 15 Minuten langes Erhitzen auf 150° tritt starke Abschwächuug ein, aber auch Temperaturen unter 150° haben bei entsprechend langer Einwirkung dieselben Effekte. Durch 3 Stunden langes Erhitzen auf 140° wurde das Gift vollkommen zerstört.

Neben dem schädigenden Einfluß des Sauerstoffs und der Wärme kommt noch hauptsächlich das Licht in Betracht. Besonders stark wirkt direktes Sonnenlicht, viel schwächer das diffuse Tageslicht. Nach KITASATO[47]) wird das Gift durch direktes Sonnenlicht in 15—18 Stunden vollständig zerstört. FERMI und PERNOSSI[35]) fanden ebenfalls Zerstörung des Giftes durch Sonnenlicht innerhalb 10—15 Stunden für wässerige Lösungen. Trocken oder im Amylalkohol, Chloroform, Benzol gelöst widersteht das Gift 100 Stunden lang der Wirkung des Sonnenlichtes.

Die Untersuchungen TAPPEINERS über den Einfluß photodynamischer Stoffe auf lebende Zellen, Fermente und Toxine wurden auch auf das Tetanusgift ausgedehnt. JODLBAUER und v. TAPPEINER[45]) fanden, daß das mit 5% Eosin gemischtes Tetanustoxin, wenn es durch 3 Tage dem Lichte ausgesetzt war, eine starke Einbuße seiner Wirksamkeit erlitten hatte. In der Menge bis zu 5 letal. Dosen war dieses Gift nur mehr imstande lokalen Tetanus hervorzubringen; in der Menge von 25 letal. Dosen oder darüber wirkte es noch tötlich. HUBER[43]) stellte fest, daß die Hinzufügung von 1% Eosin zum Toxin und 6stündiger Aufenthalt im Lichte genügen, um das Gift zu zerstören. Dieselbe Mischung im Dunkeln gehalten, wurde nicht abgeschwächt.

SCHWONER*) fand ebenfalls Abschwächung des Giftes durch Zusatz von Eosin, außerdem noch durch Erythrosin und Methylenblau, wenn diese Lösungen durch 3 Tage dem Lichte ausgesetzt waren. Das Erythrosin und Eosin wirkten stärker entgiftend als das Eosin. Übrigens wirkt das Eosin in größeren Mengen auch im Dunkeln schädigend auf das Tetanusgift. FLEXNER und NOGUCHI[36]) fanden, daß 5—2,5% Zusatz von Eosin das Gift im Dunkeln schon innerhalb einer Stunde zerstört und daß noch bei 0,6% eine Abschwächung eintritt. Bei getrennter Injektion von Gift und Eosin in den Tierkörper konnten sie bloß Verlängerung des Lebens, niemals aber Freibleiben von Tetanus erzielen. Alle so behandelten Tiere starben an Tetanus.

---

*) Diese Versuche sind bisher nicht veröffentlicht worden.

Zu erwähnen wäre auch noch der Einfluß des elektrischen Stromes. Fermi und Pernossi[35]) zeigten, daß das Gift durch zweistündige Einwirkung eines elektrischen Stromes von 0,5 Ampère vollständig zerstört wird.

Wirkungsweise im Organismus.

a) Symptome und Inkubation.

Die beiden Hauptsymptome des Tetanus, tonische Starre der Muskeln und erhöhte Reflexerregbarkeit, welche sich in klonischen Krämpfen äußert, sind sowohl beim natürlichen als beim experimentellen Tetanus vorhanden. Daneben treten noch Dyspnoe, Beschleunigung der Herztätigkeit und inkonstante Temperaturerhöhungen auf. Bei den meisten unserer Versuchstiere (Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund etc.) tritt die tonische Starre bei subkutaner oder muskulärer Injektion des Giftes — die übrigen für gewöhnlich nicht angewandten Applikationsweisen werden noch genauer besprochen werden — zuerst in den der Injektionsstelle benachbarten Muskeln auf. Wenn die injizierte Giftmenge blos Bruchteile der letalen Dosis beträgt, so beschränken sich die Kontrakturen auf eine Muskelgruppe oder eine Extremität, „lokaler Tetanus". (Fig. 4). Nach Injektion größerer Giftmengen schreiten die Kontrakturen

Fig. 4.

von den zuerst ergriffenen Muskeln weiter fort, ergreifen auch die entsprechenden Teile der andern Körperhälfte, um sich zum Schlusse als generalisierter Tetanus auf sämtliche Muskeln auszudehnen. Beim Menschen und bei einigen Tieren ist die Reihenfolge der von der Starre befallenen Muskeln ein andere. Es werden nicht zuerst die der Injektionsstelle benachbarten Muskeln ergriffen, sondern beim Menschen zuerst die Kaumuskeln, Trimus, beim Esel und Pferde (Injektion in die Brustmuskulatur) die Muskeln des Schweifes und der Ohren. Diese Reihenfolge mag in dem besondern Verhalten der einzelnen Muskelgruppen verschiedener Tiere (Verhältnis der Agonisten zu den Antagonisten) eine Erklärung finden. (Zupnik).

Obwohl bereits sehr zahlreiche experimentelle Untersuchungen über den Tetanus vorliegen, sind unsere Kenntnisse über die Pathogenese dieser Krankheit noch keineswegs zu einem befriedigenden Abschluß ge-

kommen und sind namentlich die Anschauungen über die Fortleitung des Giftes im infizierten Organismus geteilt. Eine von allen Experimentatoren festgestellte Eigenschaft des Giftes ist die erst nach einer gewissen Inkubation zu wirken, worauf zuerst Courmont und Doyon[24]) aufmerksam gemacht haben. Diese Autoren zeigten, daß sich die Inkubationszeit weder durch irgend eine Art der Applikation des Giftes noch durch sehr große Dosen beseitigen läßt. Selbst bei direkter Injektion des Toxins ins Gehirn von Kaninchen beobachteten Roux und Borel[73]) noch eine Latenzperiode von 8—12 Stunden bis zum Ausbruch der Symptome; beim Meerschweinchen war die Inkubation bei cerebraler Injektion sogar länger als bei subkutaner.

Versuche von Courmont und Doyon am Meerschweinchen zeigen, daß selbst die 30000fache letale Dosis die Inkubation nur um zwei Stunden, die 90000fache um drei Stunden vermindert, so daß diese 12—13 Stunden beträgt. Eine weitere Verkürzung ließ sich auf keine Weise mehr erzielen. Je größer die Giftmenge war, desto rascher starben die Tiere nach dem Auftreten der ersten Symptome. Das Meerschweinchen, das 90000 letale Dosen erhalten hatte, starb schon zwei Stunden nach Ausbruch des Tetanus. Je kleiner die Giftdosis ist, desto längere Zeit vergeht bis zum Ausbruch des Tetanus. Behring und Ransom konnten bei weißen Mäusen durch Injektion von 1000 letal. Dosen die Inkubationszeit auf acht Stunden reduzieren. Bei der einfachen oder wenig höheren letalen Dosis ist die Inkubationszeit für weiße Mäuse ca. 24 Stunden, bei kleineren Dosen entsprechend länger aber kaum länger als 3—4 Tage. Bei anderen Tieren, nicht zu große Giftdosen vorausgesetzt, ist sie länger. Beim Meerschweinchen 24—48 Stunden, beim Kaninchen 3—4 Tage, noch länger beim Pferde, beim Huhne 8—9 Tage.

b) Einverleibung des Giftes.

Die gewöhnliche Applkationsweise des Toxins ist, wie gesagt, die subkutane oder intramuskuläre. Bei intravenöser Injektion tritt nach Ablauf der Inkubationszeit Tetanus in allen Muskeln gleichzeitig auf, ebenso bei intraperitoonealer und subarachnoidaler. Bemerkenswert ist, daß man bei intravenöser Injektion in der Regel 8—10 mal mehr Toxin injizieren muß, um den gleichen Effekt zu erzielen als bei subkutaner Injektion. Roux und Borel[73]) haben das Toxin direkt ins Gehirn injiziert, indem sie nach Trepanation des Schädeldaches mit einer Spritze bis zu einer durch einen Widerstand geregelten Tiefe in die Gehirnsubstanz einstachen. Sie beschrieben bei den so infizierten Tieren ein eigentümliches Krankheitsbild, sogenannter cerebraler Tetanus, bei dem an Stelle der permanenten Kontrakturen des gewöhnlichen Tetanus Exzitation, epileptiforme Anfälle, Polyurie nnd motorische Störungen treten Ein anderes eigentümliches Krankheitsbild, „Tetanus dolorosus", beschrieben Meyer und Ransom[65]). Sie injizierten bei Katzen und Hunden in die hinteren Wurzeln der Lendennerven Bruchteile der bei subkutaner Applikation tötlichen Dosen. Ca. 18 Stunden nach der Injektion werden die Tiere von äußerst heftigen Schmerzanfällen ergriffen, die einige Sekunden andauern, sich aber nach einiger Zeit wiederholen, und auch durch spontane Reize auslösbar sind. Die Tiere antworten auf den heftigen Schmerzreiz ausschließlich mit Hirnreflexen, Rückenmarksreflexe oder Streckkrämpfe fehlen jedoch vollständig. Der Tod der Tiere erfolgt an Erschöpfung.

Zupnik[94]) hält diesen Tetanus dolorosus für keine spezifische Erkrankung, da man dasselbe Krankheitsbild durch Durchschneidung der hinteren Wurzeln erzeugen kann. Eine besondere Tetanusform erhielt noch Dönitz[32]) durch intravenöse Injektion kleiner Toxinmengen bei Kaninchen. Diese Tiere magern stark ab, und gehen ohne Tetanus oder nur unter ganz leichten Erscheinungen kachektisch zugrunde. Dönitz nannte die Krankheitsform „Tetanus sine tetano". Bei Mäusen und Meerschweinchen konnte er die Erscheinungen nicht beobachten. Er erklärt dieses Verhalten dadurch, daß beim Kaninchen die giftbindenden Gruppen weiter verbreitet seien als beim Meerschweinchen und der Maus, daher beim ersteren das Gift durch Bindung an die Organe rasch aus dem Blut verschwindet, bei den letzteren aber durch die geringere Verbreitung der giftbindenden Gruppen länger im Kreislauf bleiben. Die Einführung des Toxins durch den Intestinaltrakt bleibt ohne Wirkung, wie Vaillard und Vincent[86]) sowie Ransom[70]) zeigten. Dieser fand, daß selbst sehr große Mengen von Gift, Meerschweinchen intestinal beigebracht, unschädlich sind, Intaktheit des Magens und Darmkanals vorausgesetzt. Das Gift wird weder vom Magen noch vom Darmkanal absorbiert, auch nicht zerstört, sondern unverändert per anum ausgeschieden. Vincenzi[87]) konnte allerdings durch Überimpfung von aus Magen oder Darminhalt ausgepreßter Flüssigkeit keinen Tetanus erzeugen und nimmt daher eine Zerstörung des intestinal beigebrachten Giftes an. Natürlich sei die antitoxische Fähigkeit des Magen-Darmkanals begrenzt. Ransom[70]) bemerkt dazu, daß er bedeutend größere Giftdosen beibrachte, wodurch die Auffindung des ausgeschiedenen Giftes erleichtert sei. Jedenfalls dürfte der Salzsäuregehalt des Magens für das Gift nicht ganz ohne Bedeutung sein. Versuche von Thalmann[79]) mit sporenhaltigem Material ergaben selbst nach künstlicher Verletzung der Darmschleimhaut des Meerschweinchens keine Infektion. Dagegen gelang die Infektion durch Inhalation sporenhaltigen Materials von der mechanisch lädierten oder durch Einatmen von schwefliger Säure katarrhalisch gemachten Schleimhaut.

Sowohl bei der natürlichen Infektion, welche mit Bazillen respektive sporenhaltigem Material stattfindet, als auch bei der künstlichen, bei welcher als zweiter Injektionsmodus, die Einbringung des keimfreien Giftes in Betracht kommt, handelt es sich im Prinzip um denselben Vorgang, da den Bakterien als solchen keine pathogene Wirkung zukommt; diese wird nur durch das von ihnen produzierte Toxin hervorgerufen. Allerdings bedarf es bei der natürlichen Infektion besonderer begünstigender Umstände, die den Bakterien eine genügend reichliche Giftproduktion ermöglichen, wodurch das verhältnismäßig seltene Auftreten des Wundstarrkrampfes im Gegensatze zu dem häufigen Vorkommen des Bazillus eine Erklärung findet. Namentlich die eingehenden Untersuchungen von Vaillard und Vincent[86]) haben den Beweis erbracht, daß die sterile Einverleibung von giftlosen Kulturen oder von giftlosen Sporen allein keinen Tetanus erzeugt. Um giftlose Kulturen zu erhalten, ließen Vaillard und Vincent die geimpfte Bouillon fünf Tage bei 22° C. Nach dieser Zeit ist die Kultur bereits üppig gewachsen, enthält aber noch kein Toxin. Giftfreie Sporen erhielten sie durch 20 Minuten langes Erhitzen der Kultur auf 65° C. Den Grund für das Ausbleiben des Tetanus fanden Vaillard und Vincent darin, daß das steril in den Tierkörper eingebrachte giftfreie Bakterien- und Sporenmaterial sich nicht vermehren kann und fertiges Gift fehlt. Durch verschiedene künstliche Mittel kann man aber leicht Wachstum

der giftfreien Bakterien, mithin Bildung von Gift und Erkrankung erzeugen. So erhielten VAILLARD u. VINCENT, wenn sie $^1/_{15}$ ccm ihrer giftlosen Kultur mit $^1/_4$ ccm einer fünffach verdünnten Lösung von Milchsäure mischten Tetanus. Denselben Erfolg hatten sie mit Trimethylamin, Fremdkörpern, wie Holz, Sand, und Verletzungen; Beimengung von anderen Bakterien zur Tetanuskultur riefen ebenfalls die Erkrankung hervor. Die Verfasser injizierten z. B. 0,5 ccm einer einen Monat alten Bouillonkultur von Bac. prodigiosus. Mit filtrierter oder eine Stunde auf 60° erhitzten Kultur blieb der Effekt aus. Mit Erfolg verwendeten VAILLARD und VINCENT zur Erzeugung des Tetanus auch Staphylokokken, Bac. Friedländer und Streptokokken. Verletzungen der Eintrittspforte des Tetanusbazillus in den Tierkörper, Verunreinigungen mit andern Bakterien, mit Holz und Sand kommen aber auch häufig bei der natürlichen Art der Infektion vor und erklären so ohne weiteres das Auftreten der Erkrankung. Der Grund, warum giftfreie Kulturen der Tetanusbazillen steril und ohne fremde Beimengungen in den Tierkörper eingebracht, nicht zur Erkrankung führen, liegt nach VAILLARD und VINCENT in dem schädigenden Einfluß der Leukozyten. Milchsäure, Fremdkörper etc. halten die Leukozyten von den Tetanusbazillen ab und ermöglichen so deren Entwicklung. Bac. Prodigiosus ruft zwar Leukozytose hervor, nimmt aber die Phagozyten für sich in Anspruch, wodurch also wieder die Tetanusbazillen geschützt sind. Auch das Toxin hat einen abwehrenden Einfluß gegenüber den Leukozyten. Bringt man eine Kapillare mit erhitzter und eine andere mit nicht erhitzter, also noch gifthaltiger Tetanuskultur unter die Haut eines Kaninchenohres, so sieht man nach kurzer Zeit am Ende des Kapillarohres mit der erhitzten Kultur Leukozytenpfröpfe und findet infolgedessen nach 13 Stunden keine entwicklungsfähigen Sporen mehr. VAILLARD und ROUGET[85]) zeigten dann noch, daß wenn man giftfreie Sporeneinem Tiere in sterilen Papiersäckchen eingeschlossen einführt, die das Durchdringen der Säfte nicht aber der Leukozyten gestatten, die Erkrankung an Tetanus erfolgt, weil die Sporen vor den Leukozyten geschützt auskeimen und Gift produzieren können. Zur künstlichen Infektion von Tieren mit giftfreien Tetanussporen erhitzt man eine Tetanusbouillonkultur eine Stunde lang auf 80°, tränkt dann Holzsplitter mit dieser Kultur und bringt einen solchen unter die Haut des Tieres.

Die Bakterien vermehren sich gewöhnlich nur an der Injektionsstelle, respektive bei natürlicher Infektion an der Eintrittspforte, verbreiten sich aber nicht im Körper. Schon KNUD FABER[33]) und dann KITASATO[47]) untersuchten das Blut und die Organe infizierter Tiere mit negativem Erfolge auf Bazillen. Bei Injektion großer Bakterienmengen können die Bazillen allerdings auch ins Blut und die Organe gelangen. Auch VAILLARD und VINCENT[86]) fanden nur an der Injektionsstelle Bazillen. Übrigens ist nach ihnen die Vermehrung der Bazillen an der Eintrittspforte eine mäßige, denn die Bazillen lassen sich gewöhnlich nur durch die Kultur nachweisen. Ferner zeigten VAILLARD und ROUGET[85]), daß bei fortgesetzter Übertragung von Eiter eines Meerschweinchens auf andere bei der 3. bis 4. Passage gewöhnlich keine Erkrankung mehr folgt, weil die Anzahl der Bakterien beständig abnimmt, wie sie in Plattenversuchen nachwiesen und nicht wie BOSSANO[11]) meinte durch Abschwächung des Virus. VAILLARD[84]) zeigte weiter, daß auch im immunisierten Tiere keine Abtötung, sondern gutes Wachstum der Tetanus-Sporen stattfindet, wenn diese nur vor der Einwirkung der Leukocyten geschützt sind. Giftfreie (auf 80° C erhitzte) Sporen wurden in Papier-

säckchen eingeschlossen unter die Haut eines normalen und eines immunisierten Kaninchens gebracht. Das normale Tier starb am dritten Tage, das Immuntier war gesund. Der Inhalt der beiden Säckchen ergab bei der Untersuchung reichliches Auskeimen der Sporen. Von beiden Säckchen wurden Bouillonkulturen angelegt, die sich gleich toxisch erwiesen. Auch ohne intermediäre Kultur verursachten die Bazillen aus dem Säckchen des Immuntieres auf ein normales Tier übertragen, dessen Tod an Tetanus

c) Schicksal des Toxins im Organismus.

Wie sich also zeigt, kommt für die Pathologie des Tetanus bloß das Toxin in Betracht, von dem allein daher im folgenden die Rede sein soll. Für die Wirkung des Toxins im Organismus sind zwei Dinge von größter Bedeutung, nämlich der Angriffspunkt des Toxins und die Fortleitung des Giftes von der Eintrittstelle zu dem Orte, d. h. den Zellen, wo es seine Wirksamkeit entfaltet. Hier sollen entsprechend dem Zwecke des Buches nur die wichtigsten, im Experimente gefundenen Tatsachen und die daraus gezogenen Schlüsse angeführt werden, um ein Urteil über die derzeit herrschenden Anschauungen bezüglich der Wirkungsweise des Tetanusgiftes zu gewinnen. Die Anführung nur des Wichtigsten dürfte um so mehr am Platze sein, als die Frage noch nicht endgiltig gelöst ist. Zwei Theorien, wenn man so sagen darf, werden derzeit verfochten. Die eine schon durch frühere Arbeiten, namentlich von Marie und Morax sowie Gumprecht, angebahnt, durch Meyer und Ransom neuerdings aufgenommen, nimmt die ausschließliche Leitung des Giftes durch die peripheren Nerven zum Rückenmark, dem alleinigen Angriffspunkt des Toxins an. Die andere, durch die Arbeiten von Zupnik gestützt, behauptet, daß das Gift durch die Blutbahn zum Zentralnervensystem geleitet wird, und daß das Toxin außer im Nervensystem auch in den Muskeln einen Angriffspunkt findet. Entsprechend dieser verschiedenen Anschauung ist der lokale Tetanus nach Zupnik eine Erkrankung der betreffenden Muskeln, Meyer und Ransom dagegen verlegen auch beim lokalen Tetanus den Sitz der Erkrankung ins Zentralnervensystem und erklären ihn durch Erkrankung des dem Muskel zugehörigen Neurons. Bevor die Arbeiten von Meyer und Ransom, sowie von Zupnik einer näheren Besprechung unterzogen werden, möchten wir vorher noch kurz die Resultate früherer Untersuchungen über das Schicksal des Tetanusgiftes im Tierkörper anführen.

Vor allem war die Frage von Interesse, was mit dem in den Organismus gebrachten Toxin zunächst geschieht. Bereits Pestana[68a]), Nissen[68]) und Kitasato[47]) konnten das Gift im Blute der injizierten Tiere nachweisen, da sie durch Übertragung des Blutes tetanischer Tiere auf Mäuse Tetanus erhielten. Durch Injektion von Organen tetanischer Tiere bekam Kitasato keinen Tetanus. Im Blute fanden ferner das Gift Buschke und Oergel[22]), Courmont und Doyon[24, 25]), Knorr[50]), Marie[56]), Blumenthal[10]), Asakawa[1]), Ransom[71]). Die Zeitdauer, während welcher das Toxin im Blute nachweisbar ist, schwankt allerdings. Das Gift dürfte wohl zum größten Teil an die Organe gebunden werden. Knorr[50]) fand, daß, wenn er Kaninchen größere Mengen Gift beibrachte, sowohl subkutan als intravenös, in kurzer Zeit ein großer Teil des Toxins aus dem Blute verschwunden war. Da wegen der Kürze der Zeit eine Ausscheidung unmöglich war, nahm Knorr Bindung oder

Zerstörung des Giftes an. In einer späteren Arbeit fand KNORR[51]) beim Huhn nach Injektion größerer Dosen einen starken Giftverlust im Blute, der mit dem Auftreten der Krankheitssymptome zusammenfiel. Da bei Zerstörung des Giftes gerade das Umgekehrte hätte erfolgen müssen, nimmt KNORR eine Bindung des Toxins an die Organe an. Jedoch gelang es ihm nicht, das Gift als solches aus den Organen wieder zu gewinnen. ASAKAWA[1] beobachtete beim Huhn noch sechs Tage nach der Injektion das Gift ohne Veränderung im Blute, ferner auch in den Organen, Leber, Milz, Niere, Hoden Muskel, nicht aber im Rückenmark und Gehirn. RANSOM[71]) fand 26 Stunden nach intravenöser Injektion das Toxin gleichmäßig, sowohl in Blut- wie Lymphbahn: auch die Abnahme war in beiden gleichmäßig. Das subkutan injizierte Gift tritt auf dem Wege der Lymphgefäße in die Blutbahn. Beim Kaninchen machte MARIE[56]) systematische Untersuchungen über das Verschwinden des Giftes und konnte 17 Stunden nach der Injektion weder im Blute noch in den verschiedenen Organen Gift nachweisen. Viel länger findet sich das Gift nach BLUMENTHAL[10]) im Blute und den Organen des Meerschweinchens. Man kann also keineswegs die bei einem Tiere gefundenen Resultate verallgemeinern; jedenfalls unterscheiden sich die Organe verschiedener Tiere sehr wesentlich in ihrem Vermögen, das Tetanusgift zu binden. Es kann auch kein direkter Zusammenhang zwischen Empfänglickeit und Giftbindungsvermögen konstatiert werden, da doch das Meerschweinchen viel empfänglicher ist als das Kaninchen, und bei letzterem das Gift weniger lang nachweisbar ist als bei ersterem. An dieser Stelle mögen auch die hauptsächlich von COURMONT und DOYON[24—26]), sowie BLUMENTHAL[9]) ausgesprochene Ansicht erwähnt werden, daß im Körper durch einen fermentativen Prozeß oder durch Bindung des Giftes an die Organzellen ein ohne Inkubation nach Art des Strychnin wirkendes Gift entstehe. Veranlaßt wurden die genannten Forscher zu dieser Anschauung durch ihre Versuche über das Schicksal des Toxins im Organismus. Sie injizierten Organextrakte tetanischer Tiere Mäusen und Meerschweinchen. Doch hatten COURMONT und DOYON keine konstanten Erfolge; unter fünf Fällen erzielten sie dreimal Erkrankung, zweimal nicht, und BLUMENTHAL gibt selbt an, daß er mit nicht viel größeren Dosen aus Organen normaler Tiere dieselben Erscheinungen erhielt. Die ohne Inkubation auftretenden Krankheitssymptome unterscheiden sich übrigens auch wesentlich von dem gewöhnlichen Bilde des Tetanus. Diesen positiven Resultaten stehen zahlreiche negative gegenüber (KITASATO, BRUNNER, MARIE). Auch RANSOM, der Tauben mit größeren Toxinmengen injizierte, fand nur in der Umgebung der Injektionsstelle größere Giftmengen, in den übrigen Muskeln und Organen sehr wenig, im Rückenmark gar kein Gift. Neben den Organen wurden auch die Se- und Exkrete tetanischer Tiere auf das Vorhandensein von Gift untersucht. Auch hier sind die Resultate recht widersprechende. BUSCHKE und OERGEL[22]) untersuchten Schweiß und Speichel mit negativem Erfolge. Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Urin zugewendet. BRUCHETTINI will Mäuse mit dem Urin tetanuskranker Menschen tetanisch gemacht haben, KARTULIS dagegen kam nicht zu dem gleichen Resultat. Ebensowenig fanden BLUMENTHAL[10]) und MARIE[56]), der auch die Exkremente darauf untersuchte, im Urin Tetanischer das Gift. Zu dem gleichen Resultat kamen COURMONT und DOYON[25]). In späteren Versuchen beschreiben dagegen COURMONT und DOYON[28]) ohne Inkubation auftretende tetanusartige Erscheinungen bei Kaninchen durch Injektion des

Urins von tetanuskranken Hunden, die sie wiederum einem „strychnisierenden“, ohne Inkubation wirkenden Gifte zuschreiben.

d) Bindung des Giftes im Centralnervensystem.

Wenn auch die Angaben über das Vorkommen des Giftes in den Organen nicht übereinstimmen, so wurde doch von allen Untersuchern festgestellt, daß sie durch Injektion des Zentralnervensystems tetanuskranker Tiere auf gesunde, bei diesen niemals die Krankkeit erzeugen konnten. Wir kommen dadurch auf die bekannten Versuche von WASSERMANN[88]), sowie WASSERMANN und TAKAKI[89] zu sprechen. Diese Autoren fanden, daß das Gehirn, in etwas schwächerem Maße auch das Rückenmark von Meerschweinchen und Kaninchen die Eigenschaft besitzt, das Tetanusgift, wenn sie mit diesem einige Zeit vor der Injektion gemischt wurden, zu neutralisieren. Wenn 1 g Meerschweinchengehirn mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung verrieben wird, so ist 1 ccm dieser Emulsion imstande bis zu 10 letale Dosen für weiße Mäuse zu neutralisieren und bei 60 letalen Dosen noch eine Abschwächung hervorzubringen. Auch das Gehirn von der Taube, vom Menschen und Pferd besitzt diese entgiftende Eigenschaft. Dieser von WASSERMANN und TAKAKI erhobene Befund wurde von vielen Seiten nachgeprüft und bestätigt. Dagegen sind die von den genannten Autoren aus ihren Versuchen gezogenen Schlüsse nicht ohne Widerspruch geblieben. WASSERMANN und TAKAKI identifizierten nämlich die giftbindende Wirkung des Zentralnervensystems mit der des spezifischen Antitoxins und sahen der EHRLICHschen Theorie zufolge in diesem Organe auch die Bildungsstätte des Antitoxins. Gegen diese Deutungen wurden namentlich von französischer Seite Einwände erhoben.

METSCHNIKOFF[63]) untersuchte außer dem Gehirne der Nager, für die er die Beobachtung WASSERMANNS bestätigte, auch das Gehirn für Tetanus wenig empfänglicher oder ganz unempfänglicher Tiere. Er fand das Gehirn der Schildkröte, die gegen Tetanus refraktär ist, ferner das Froschgehirn ohne Wirkung auf das Gift. Das Gehirn des wenig empfänglichen Huhnes hatte nur schwaches Neutralisationsvermögen. Gegen die Auffassung von WASSERMANN führt METSCHNIKOFF folgenden Versuch an: Das Gehirn eines Meerschweinchens ist nicht imstande, dieses vor der einfachen Dosis letal. zu schützen, wogegen dieselbe Gehirnmenge, wenn sie mit der zehnfachen Giftmenge vor der Injektion gemischt wurde, ein Meerschweinchen vor der Erkrankung bewahrt. METSCHNIKOFF erklärt die Schutzwirkung des Gehirns durch diese entzündungserregende resp. Leukocytenauswanderung bewirkende Eigenschaft. Auch das Gehirn des erwärmten, für Tetanus empfänglichen Frosches ist wie COURMONT u. DOYON[27]) zeigten, nicht imstande Gift zu binden. MARIE[57]) fand die graue Rinde wirksamer gegen das Tetanusgift als die weiße Substanz. Er konnte ein Tier auch mit seiner eigenen Gehirnsubstanz vor Tetanus schützen. Um aber irgend eine Schutzwirkung durch das Gehirn auszuführen, ist es unbedingt nötig, dieses und das Gift vor der Injektion in Kontakt zu bringen. Bei getrennter Injektion von Gehirn und Toxin bleibt jede Schutzwirkung aus; die Tiere gehen gleichzeitig mit den Kontrolltieren ein. DANYSZ[29]) beobachtete, daß die giftbindende Wirkung des Gehirns am stärksten in dem flüssigen Medium vor sich geht, das die Gehirnzellen am besten konserviert. Am besten also in physiologischer Kochsalzlösung, weniger in Aqua dest., noch weniger in

10%iger Salzlösung. Die Fixation des Giftes durch das Gehirn ist nicht beständig; das früher neutrale Gehirn-Toxingemisch wird nach fünftägiger Mazeration mit Kochsalzlösung toxisch, daher läßt die giftbindende Fähigkeit des Gehirns keinen Vergleich mit dem Antitoxin zu. MILCHNER[64]) stellte fest, daß sowohl der abzentrifugierte Gehirnbrei als auch die darüber stehende Flüssigkeit ungiftig seien. Bei Zusatz steigender Giftmengen erreicht man die Grenze des Bindungsvermögens. Das Zentrifugierte ist dann nicht mehr ungiftig, enthält aber doch nur einen Teil des ursprünglich vorhandenen Giftes. Durch Kochen des Gehirnes wird seine Bindungskraft für das Tetanustoxin zerstört. Wichtige Versuche gegen die Anschauung WASSERMANNS brachte BESREDKA[8]) bei. Er zeigte, daß das Gehirn mehr Toxin fixieren als neutralisieren kann; ferner, daß, wenn man einer mit Toxin gesättigten Hirnmasse Antitoxin zusetzt, dieselbe wieder ihre Integrität erhält. Die Wirkung des Gehirns summiert sich also nicht mit der des Antitoxins. DIMITRIEWSKY[31]) endlich fand, daß das Gehirn von gegen Tetanus immunisierten Tieren kein stärkeres Bindungsvermögen besitze als das normaler. Dagegen zeigten Versuche von MARX[62]), daß Tiere, die eine Antitoxindosis erhielten, die zur Neutralisation des Giftes nicht ausreichte, durch Zusatz von Gehirnsubstanz vor dem sonst sicheren Tode gerettet werden konnten. Übrigens fand MARX im Laufe seiner ausgedehnten Versuche, daß das giftneutralisierende Vermögen der einzelnen Gehirne individuellen Schwankungen unterliegt. Versuche von ASAKAWA[1]) bestätigen, daß auch das Gehirn vom Huhn, in geringerem Grade auch das Rückenmark, wenn auch schwächer als das Zentralnervensystem der Nager, das Tetanusgift zu binden vermögen. Dem Blut, der Leber, Niere, Milz und den Muskeln fehlt diese Fähigkeit vollständig. Das Giftbindungsvermögen des Gehirns kommt auch nach ASAKAWA nur bei Mischung mit dem Toxin zum Ausdruck, bei getrennter Injektion hat es gar keinen Einfluß auf den Krankheitsverlauf. ASAKAWA nimmt im Gehirne eine unbekannte Substanz X an, die mit dem Toxin eine Verbindung eingeht. Diese Substanz X ist in Kochsalz unlöslich und im Hühnergehirn nur in geringer Menge enthalten, worauf die relative Unempfänglichkeit des Huhnes beruhen soll. Auch WASSERMANN[88]) hatte angegeben, daß die Filtrate der Gehirnemulsionen unwirksam waren.

Versuche von LANDSTEINER und v. EISLER[54]) scheinen geeignet, dieses Verhalten zu erklären und die unbekannte Substanz dem Verständnisse näher zu bringen. Die Autoren haben in diesen Versuchen gezeigt, daß durch Vorbehandlung des Gehirnbreies mit Äther dessen giftbindende Fähigkeit sehr bedeutend abnimmt. Wenngleich ätherische oder alkoholische Extrakte aus Gehirn allein, sowie Chlolesterin und Lecithin nur in sehr geringem Grade geeignet sind, das Tetanusgift zu neutralisieren, so dürfte doch nach unseren Versuchen die Zusammensetzung der Nervensubstanz aus Proteinen und reichlichen Lipoiden für die Giftbindung von wesentlicher Bedeutung sein, wenngleich WASSERMANN (Centralblatt für Bakt. 1906, Ref.) den Einwand erhob, daß die an Lipoiden vielleicht reichere weiße Gehirnsubstanz kein Bindungsvermögen für Tetanusgift besitzt; dieses kommt nur der grauen Substanz zu. Dagegen ist zu bemerken, daß eben für die Giftbindung nicht die Lipoide allein, sondern deren Verbindung mit bestimmten Proteinen in Betracht kommt. Nach den angeführten Versuchen kommt somit nur dem Zentralnervensystem, hauptsächlich dem Gehirn, ein bedeutendes Giftbindungsvermögen zu. Andere Organe besitzen es gar nicht oder höchstens in sehr geringem Maße.

So konnte z. B. Kondratteff[53]) aus Milch und Nebennieren vom Pferde durch Fällung mittelst Chlorzink eine Substanz darstellen, die Mäuse in der Hälfte der Fälle gegen die einfache Dosis letalis schützte.

e) Leitung und Angriffspunkt des Toxins.

Nach der Anschauung der meisten Autoren besorgt das Nervensystem auch die Fortleitung des Giftes von der Eintrittspforte zu der Stelle, wo es hauptsächlich seine Wirksamkeit entfaltet, nämlich zum Rückenmark. Schon im Jahre 1892 hatte Brunner[18]) Versuche mitgeteilt, in denen er nach Anwendung von Curare oder Durchschneidung der Nerven des betreffenden Gliedes Aufhören der Krämpfe beobachtete. Diese Versuche Brunners wurden von Courmont und Doyon[24]) bestätigt; einen ähnlichen Effekt wie durch Curare erzielten die beiden Autoren auch mit Chloroform. Das Aufhören der Kontrakturen nach Durchschneidung der betreffenden motorischen Nerven oder der Rückenmarkswurzeln bestätigten auch noch die Versuche von Tizzoni und Cattani[81]), von Autokratow[2]) und Gumprecht[40]). Denselben Erfolg hat natürlich auch die Durchtrennung des Rückenmarkes. Nach Zerstörung des Lumbalmarkes hört der Tetanus der hinteren Körperhälfte auf, oder bleibt, falls erst nach der Zerstörung das Gift injiziert wird, frei von Krämpfen (Courmont und Doyon). Natürlich wurde auch die Bedeutung der sensiblen Nerven für den Tetanus studiert. Autokratow[2]) fand nach Durchschneidung der sensiblen Nerven einer Extremität Schwinden der Kontraktur und nahm daher eine Reizung der sensiblen Nervenendigungen an. Auch Courmont und Doyon[25]) machten dieselbe Beobachtung und stellten die Behauptung auf, daß ein durch die motorischen Nerven mit seinem medullaren Zentrum in Verbindung stehender Muskel nicht der tetanischen Starre verfallen könne, wenn nicht zugleich auch sensible Fasern erhalten seien. Auch Brunner[19]) meint, daß es zur Hervorbringung des tetanischen Krampfes eines sensiblen Impulses auf das Rückenmark bedürfe, das sich durch das Gift im Zustande einer abnormen Erregbarkeit befinde. Ob das Gift die sensiblen Nervenendigungen direkt erregt, hat er in seinen Versuchen nicht entschieden. Nach Goldscheider[38]) ist zur Entstehung eines lokalen Tedie Leitung des Giftes bis zum Rückenmarkszentrum unnötig. Eine lokale Kontraktur entsteht durch Affektion des peripheren Neuroms. Dem gegenüber behauptet Gumprecht[40]), daß der lokale Starrkrampf ebenso wie der allgemeine durch eine toxische Affektion des Zentralnervensystems erzeugt werde. Er leugnet die Bedeutung der sensiblen Nerven für das Zustandekommen des Tetanus, da er auch nach Durchschneidung sämtlicher hinteren Wurzeln vom Lumbal bis zum letzten Sakralwirbel in der anästhetischen Extremität beim Hunde Tetanus erhält.

In einer ausführlichen Arbeit werden von Gumprecht[41]) das Aufhören der Kontrakturen nach Durchschneidung der betreffenden motorischen Nerven, nach Zerstörung des Markes, nach Kurarevergiftung und Anwendung von Anaesthetica (Chloroform, Chloral, Morphin) beschrieben. Die Zuckungskurve eines elektrisch direkt gereizten Muskels des tetanischen Beines ist normal. Ebenso werden die motorischen Nerven nicht durch das Gift verändert. Wenn jedoch der tetanische Kontraktionszustand des Muskels längere Zeit gedauert, sinkt dessen elekrische Erregbarkeit, sowohl die direkte als die vom Nerven aus. Die sensiblen Nervenendigungen werden durch den Tetanus nicht beeinflußt.

Krämpfe lassen sich ebenso durch periphere Reize als durch Rückenmarksreizung auslösen. Neuerdings wird festgestellt, daß das Durchschneiden der hinteren Nervenwurzeln einer Extremität und nachfolgende Impfung nicht den Eintritt des lokalen Tetanus verhindert. Die Krämpfe werden ähnlich wie bei Strychninvergiftung durch erhöhte Reflexerregbarkeit des Rückenmarkes hervorgerufen. Nach den angeführten Versuchen ist zum Entstehen der Krämpfe Intaktheit der motorischen und sensiblen Nervenfasern oder wenigstens der motorischen allein nötig. Die Fortleitung des Giftes besorgen nach GUMPRECHT[41]) die peripheren Nerven und zwar geschieht der Transport in den peri- und endoneuralen Lymphräumen, welche mit dem Subduralraume in offener Verbindung stehen. Der Verlauf der Vergiftung gestaltet sich folgendermaßen: nach Impfung in einen Körperteil wird Gift vom Blute im ganzen Körper herumgeführt, die Verdünnung ist aber so stark, daß sie eine längere Inkubationszeit bedingt. Zugleich wird durch die Lymphräume der Nerven der betreffenden Körperstelle Gift der entsprechenden Rückenmarkstelle zugeführt und so durch die stärkere Kontraktion des Virus an dieser Stelle lokaler Tetanus ausgelöst. Ist die Dosis klein genug, so erschöpft sich das Toxin an der zuerst betroffenen Stelle, und allgemeiner Tetanus bleibt aus. War aber die Giftmenge genügend groß, so ergreift das Gift noch weitere Bezirke des Rückenmarks, es kommt zum Fortschreiten des Tetanus; unterdessen ist auch die Inkubationszeit für das im Blute befindliche Toxin abgelaufen und es kommt nun zum generalisierten Tetanus.

Eine analoge Vorstellung über die Fortleitung des Giftes im Organismus hat STINZING[77]). Nach ihm wird ein Teil des Giftes vom Blute aufgenommen, ein Teil in den Maschen des Perincuriums centripetal vorwärts geleitet und wirkt zunächst an der Einmündungsstelle ins Rückenmark. Gegen diese von GUMPRECHT und STINZING angenommene Leitung des Giftes in den endo- und perinkuralen Räumen, fanden MARIE und MORAX[59]) eine spezifische Verwandtschaft des Toxins zu den Achsenzylindern der Nerven, die allerdings in vitro nicht zu Tage tritt. Die Fortleitung geschieht durch die Achsenzylinder und hängt von deren Intaktheit ab. Zur Entscheidung der Frage, ob das Toxin von verschiedenen Nerven gleich gut absorbiert wird, injizierten MARIE und MORAX[60]) in verschiedene Körperstellen bei Hunden, Pferden und Affen das Toxin. Sie präparierten dann die vorzüglich motorische, sensible oder vasomotorische Fasern enthaltenden Nerven heraus und brachten diese oder deren Extrakt subkutan Mäusen bei. Durch diese Untersuchungen fanden sie, daß alle drei Arten der Nerven zur Bindung des Toxins befähigt sind. Die ausschließliche Bedeutung des Nervensystems sowohl für die Fortleitung des Giftes als auch für die Erklärung sämtlicher Krankheitssymptome wird besonders durch die Arbeit von MEYER und RANSOM[65]) vertreten.

Diese Autoren kommen durch ihre experimentellen Untersuchungen zu dem Schlusse, daß das Gift nur durch die Nerven zu den medullaren Zentren geführt wird, durch dessen Vergiftung die Symptome der tonischen Muskelstarre und der gesteigerten Reflexerregbarkeit hervorgerufen werden. Auch der lokale Tetanus ist ausschließlich zentralen Ursprungs. Die Versuche MAYERS und RANSOMS über die Entstehung des lokalen Tetanus, und den Transport des Giftes in den Nerven sind folgende. Sie injizierten Meerschweinchen subkutan in die hintere Extremität Tetanusgift. Die Tiere wurden nach verschiedenen Zeiten (20 bis 41 Stunden) getötet und Blut, Stücke vom Gehirn, Rückenmark, der Nervi ischiadici und

brachiales auf weiße Mäuse geimpft. Nur mit dem Blute und dem Nervus ischiadicus der geimpften Seite erhielten sie Tetanus. Durch Injektion einer im Verhältnis zur Giftdosis geringen Antioxinmenge in den Nerven (Sperrung des zuführenden Nerven durch Antitoxin) konnten sie ein Freibleiben der betreffenden Extremität erreichen. Z. B. ein Kaninchen erhält in dem rechten Nervus ischiadicus Antitoxin, gleich darauf links und rechts längs der Tibia subkutan Toxin. Nach zwei Tagen ist das linke Hinterbein steif, das rechte frei, und bleibt es auch trotz Fortschreiten des Tetanus, sogar bis zu dem am fünften Tage erfolgenden Tode. Bei einem Hunde trat bei einer ähnlichen Versuchsanordnung zwar am 10. Tage in der bis dahin frei gebliebenen Extremität Tetanus auf, doch erklären Meyer und Ramsom dieses Verhalten damit, daß das Antitoxin von den Nerven nicht festgehalten wird, von der Peripherie aus aber ein Nachschub von Gift stattfindet, so daß dieses nach einiger Zeit die Nervenbahn wieder frei findet. Selbst nach intravenöser Injektion des Giftes gelang es durch Antitoxininjektion in die Nervi femorales und ischiadici, die hinteren Extremitäten bis zum Tode des Tieres frei zu erhalten. Zwei Katzen, von denen der einen das Rückenmark zwischen dem zweiten und dritten Lendenwirbel durchtrennt worden war, wurde in beide Nervi ischiadici Tetanusgift injiziert. Das dabei etwa durch Resorption von der Umgebung ins Blut gelangte Gift wird durch eine sehr große Antitoxindosis neutralisiert. Die normale Katze bekommt zuerst in den beiden Hinterbeinen Tetanus, der sich nach und nach über den ganzen Körper verbreitet und dem das Tier am sechsten Tage erliegt. Die andere Katze mit dem durchtrennten Rückenmark hat nach zwei Tagen Tetanus der beiden hinteren Extremitäten, der ganze übrige Körper bleibt auch in den folgenden Tagen bis zum Tode des Tieres, der nach drei Wochen unter zunehmender Abmagerung, Steifigkeit der hinteren Extremitäten erfolgt. Ferner fanden Meyer und Ransom, daß die letale Dosis bei Injektion in den Nerven viel kleiner ist als bei subkutaner, bei einem Hunde z. B. $^1/_5$, und die Inkubationszeit abgekürzt ist. Eine weitere Verkürzung der Inkubationszeit haben die Autoren durch direkte Injektion des Giftes ins Rückenmark erhalten, so daß sie die Latenzperiode mit der Wanderung des Giftes durch die Nerven zum Zentralnervensystem erklären. Als weitere Stütze dieser Annahme führen Meyer und Ransom an, daß, weil die Länge des Nervenwegs für die Inkubationszeit von wesentlicher Bedeutung ist, die Inkubation bei Warmblütlern mit der Größe der Tiere zunimmt. Aus den angeführten und ähnlichen Versuchen folgern Meyer und Ransom, daß das Tetanusgift von den Nervenendigungen in der Peripherie aufgenommen, durch die Nervenbahn, und zwar nur durch sie den medullaren Zentren zugeführt wird, durch deren alleinige Vergiftung die Symptome der tonischen Muskelstarre sowie des Reflextetanus hervorgerufen werden.

Bei Injektion des Giftes in die hintere Rückenmarkswurzel bekamen die Verf. ein eigentümliches Krankheitsbild, „Tetanus dolorosus“, welches sich durch heftige Schmerzanfälle nur in dem, dem ergriffenen Rückenmarksapparat entsprechenden Körperteil äußert. Diese Anfälle werden schon durch den leisesten Reiz ausgelöst. Die so erkrankten Tiere zeigen niemals Starre oder erhöhte motorische Reflexerregbarkeit und gehen an Erschöpfung zugrunde. Hieraus folgt, daß bei sonstiger Vergiftung das Toxin nie durch die sensiblen Nervenbahnen zum Rückenmark gelangt, sondern nur durch die motorischen; zweitens, daß die dolorosen Apparate des Rückenmarks von den motorischen so isoliert sind, daß

die Vergiftung der einen nicht auf die andern übergeht. Drittens, daß die wirksame Verbreitung des Giftes im Nervensystem nicht in den Lymphbahnen, sondern im Protoplasma selbst stattfindet, da sonst die Schranke, die das Ganglion spinale dem Fortschreiten des Giftes setzt, unverständlich bliebe, denn die Lymphräume des Ganglion stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit den Subarachnoidalräumen und den Lymphbahnen des Nerven.

Auch die Reflexerregbarkeit ist nach Versuchen von MEYER und RANSOM vorerst örtlich beschränkt, so daß vom kranken Gliede Reflexzuckungen auch anderer Teile des Körpers, dagegen von jeder andern sensiblen Körperstelle meist typischer Reflextetanus des erkrankten Gliedes ausgelöst wird.

Auf Grund der mitgeteilten Tatsachen haben MEYER und RANSOM folgende Theorie des experimentellen Tetanus aufgestellt: Das Gift wird aus den Lymphspalten von den motorischen Nerven, und zwar wahrscheinlich von ihren marklosen Endigungen, aufgenommen und gelangt zu den motorischen Rückenmarksganglien. Diese werden in den Zustand der Übererregbarkeit versetzt, so daß die von den sensiblen Neuronen zufließenden Reize, die sonst bloß den normalen Muskeltonus hervorbringen, nun diesen zur tetanischen Starre steigern. In den Fasern des Rückenmarks wird das überschüssige Gift weitergeführt und zwar zuerst zu den motorischen Apparaten der anderen Seite, es entsteht Starre des korrespondierenden Gliedes. Dann erfaßt das Toxin, falls genügende Mengen injiziert wurden, die taktilen Apparate des Reflexbogens, es kommt zur allgemeinen Steigerung der Reflexe auf Reizung des erkrankten Gliedes. Bei fortschreitender Vergiftung verbreitet sich der motorische Tetanus und die Steigerung der Reflexerregbarkeit und es folgt Starre fast aller Muskeln und allgemeiner Reflextetanus. Bei Vergiftung von der Blutbahn tritt das Gift an alle motorischen Nervenendigungen, die Erkrankung ist diffus. Dabei kann der Tetanus an gewissen Prädilektionsstellen zuerst ausbrechen, bei Katzen an den Beugern der Vorderpfoten, beim Menschen in den Kaumuskeln (Trismus).

Eine ganz andere Auffassung vertritt L. ZUPNIK. Er nimmt außer dem Rückenmark, durch dessen Vergiftung die erhöhte Reflexerregbarkeit entsteht, auch den Muskel als Angriffspunkt für das Toxin an. Durch Ergriffenwerden des Muskels entsteht die Starre, das andere Hauptsymptom des Tetanus. Für seine Anschauung bringt ZUPNIK sehr beachtenswerte und interessante Versuche bei. Schon im Jahre 1900 zeigte ZUPNIK[93]), daß das Auftreten oder Ausbleiben der lokalen Starre bei Warmblütlern, sowie deren Aszendenz oder Deszendenz nur mit dem Zusammenbringen oder Fernhalten des Toxins vom Muskelgewebe abhängt. Die intramuskuläre oder subkutane in muskelhaltigen Gebieten vorgenommene Injektion des Giftes erzeugt ausnahmslos lokale Starre mit folgender Aszendenz. Impft man aber in einem muskelfreien Gebiete, z. B. dicht über dem Sprunggelenke zwischen Tibia und Achillessehne, dann stellt sich, falls man den Muskel nicht bloßgelegt und nur $^1/_{100}$ ccm Flüssigkeit injiziert hat, immer zuerst Trismus und dann Deszendenz der Starre ein. In einer späteren Arbeit führt ZUPNIK[94]) sehr sorgfältige Versuche zur Stütze seiner Anschauung an. Sowohl bei künstlicher als natürlicher Infektion der Menschen und der Tiere waren alle Fälle mit lokaler Starre auch von Muskelverletzung begleitet. ZUPNIK erklärt nun auch die von allen Experimentatoren gefundene Tatsache, daß das in die enervierten Muskeln injizierte Toxin keinen Tetanus er-

zeugt. Er sagt, daß dieses Verhalten nur bei zu kleinen (subletalen) Dosen oder zu großen (vielfache Multipla der Dosis let.) zutreffe. Die ca. doppelte Dosis let. minima erzeugt aber nach subkutaner und besonders nach intramuskulärer Injektion primäre Starre des jeden Zusammenhangs mit dem Zentrum beraubten Muskels. Für den muskulären Ursprung der Starre führt Zupnik noch folgendes an: Eine seit kurzem bestehende Starre ist durch Narkose, Durchschneidung der zugehörigen Nerven, Zerstörung des Rückenmarks, Tötung des Tieres zu beheben. Nach 24stündigem Bestehen der Starre kann aber diese durch kein Mittel mehr aufgehoben werden. Welches Element des Muskelgewebes den Angriffspunkt des Toxins bildet, ist noch unentschieden. Für die zentripetale Leitung des Giftes kommen die motorischen Nerven nicht in Betracht, denn sonst müßte die direkte Injektion von subletalen Dosen in den Nerven, welche sonst lokale Starre hervorbringen, es auch in diesem Falle tun. Bei Anwendung der erwähnten Versuchstechnik, erhielt aber Zupnik nie lokale Starre, sondern es entwickelt sich ein Tetanus deszendens, dessen erste Symptome in den mimischen Muskeln auftreten. Die Tiere haben die Stirnhaut in Längsfalten gelegt, die Ohren nähergerückt, die Oberlieder in die Höhe gezogen. Dann treten Schluckbeschwerden und Trismus auf. Zur Injektion des Giftes in den Nerven geht Zupnik folgendermaßen vor: Am besten eignen sich langbeinige Hunde. Man wählt eine möglichst muskelfreie Stelle zwischen Tibia und Achillessehne. Der Hautschnitt beginne dicht am Calcaneus und muß weit unterhalb der Muskelmasse enden. Man muß zu dem Versuche ein starkes Toxin nehmen, damit einige Hundertel ccm genügen. Bei Injektion größerer Flüssigkeitsmengen kann Toxin leicht mit dem Muskel in Berührung kommen. In tiefer Narkose wird die Haut zuerst antiseptisch behandelt, dann das Sublimat mit viel destilliertem Wasser weggespült. Der Hautschnitt wird dicht am Calcaneus und parallel der Achillessehne $^1/_2$ ccm lang angelegt. Die Arterie und Vene werden wegpräpariert, der Nerv in eine Schlinge genommen und unter ihn aseptische Watte gebracht. Nun sticht man die Injektionsnadel peripheriewärts in den gespannten Nerven ein, worauf die Nadel in den Nervenbündeln, nicht zwischen ihnen, 1 ccm weit vorgeschoben wird. Nun wird die Schlinge ganz entspannt, so daß der Nerv schlaff ist und die Spitze der Nadel deutlich durchschimmert. Jetzt injiziert man langsam, wobei der Nerv anschwillt und sich dunkel färbt. Im Laufe der Injektion schreitet die Schwellung und Färbung gegen die Peripherie fort. Sobald sie einen gewissen Grad erreicht haben, wird der Nerv an der Einstichstelle der Kanüle mit einer Pinzette gefaßt und die Nadel um einige Millimeter zurückgezogen. In den nun losgelassenen Nerven wird weiter injiziert. Dieser Vorgang wird nach Bedarf wiederholt. Nach vollendeter Injektion läßt man die Nadel noch einige Zeit ruhig im Nerven stecken, dann wird die knapp an der Mündungsstelle der Nadel untergelegte Schlinge fest angezogen und die Nadel langsam entfernt. Die stark zugezogene Schlinge hindert das Zurückfließen des Giftes. Nach dem Herausziehen der Nadel wird die Schlinge noch $^1/_2$—1 Minute belassen, dann langsam entspannt und entfernt.

Die peripheren Nerven haben also keine spezifischen Beziehungen zum Toxin. Der Weg des Giftes zu den Nervenzentren ist die Blutbahn. Auch bei direkter Injektion des Giftes ins Rückenmark tritt infolgedessen keine Abkürzung der Inkubation ein, da ja das Toxin auch bei subkutaner Injektion nach wenigen Minuten im Blute kreist. $^1/_{10}$—$^1/_{30}$ der von der

Subkutis aus ermittelten Dos. letal. ins Rückenmark injiziert erzeugt bei Katzen nach einer Inkubation von mindestens 14 Stunden reflektorische Übererregbarkeit der zugehörigen Extremität, dann beider, zuletzt des ganzen Körpers. Ein leiser Reiz, wie Anblasen genügt, um Streckkrampf aller Extremitäten und Opisthotonus hervorzurufen. Beide Kardinalsymptome des Tetanus lassen sich somit getrennt erzeugen. Geringe Toxinmengen dem Muskel zugeführt bedingen lokale Starre, ins Rückenmark injiziert Steigerung der Reflexerregbarkeit. Das Gift, welches sich auf dem Wege der Blutbahn weiter verbreitet, wird gleichmäßig von Rückenmark und Muskulatur gebunden, Daß bei der natürlichen Infektion der Menschen zuerst Trismus auftritt, erklärt Zupnik damit, weil in diesen Muskelgruppen das größte Mißverhältnis zwischen Agonisten und Antagonisten besteht.

Der sichere Angriffspunkt des Toxins, das Rückenmark, wurde auch histologisch auf spezifische Veränderungen untersucht.

Schon Beck[3]) und Nissl[67]) haben Veränderungen im Rückenmarke tetanischer Meerschweinchen und Kaninchen gefunden. Besonders Marinesco beschrieb Veränderungen in den Zellen der Vorderhörner, die er als charakteristisch für den Tetanus hielt. Dagegen behaupten Goldscheider und Flatau[38a]), sowie Courmont, Doyon und Paviot[28a]) daß die Zellenveränderungen nicht konstant seien und auch nichts Charakteristisches böten, da sie auch bei andern Vergiftungen solche Befunde hatten. Auch nach Untersuchungen von H. Marcus (Zeitschr. für Heilkunde, Bd. IV) sind Zellveränderungen bei Tetanus kein konstanter Befund.

f) Empfänglichkeit.

Was die Empfänglichkeit der verschiedenen Tierarten für den Tetanus betrifft, so nimmt das Pferd die erste Stelle ein. Es wird in seiner Empfänglichkeit nur noch vom Menschen erreicht oder sogar noch übertroffen. In Labaratoriumsversuchen werden gewöhnlich Mäuse, Meerschweinchen, Kaninchen, eventuell auch Ziegen verwendet; weniger empfindlich ist der Hund. Von größern Tieren ist außer dem Pferde auch der Esel für Tetanus empfänglich. Unter den Vögeln wurde Tetanus erzeugt bei der Taube, mit der hauptsächlich Behring und Ransom gearbeitet haben, und beim Huhne, bei diesem allerdings nur mit großen Giftmengen; wegen seiner geringen Empfänglichkeit wurde das Huhn noch von Kitasato für unempfänglich gehalten. Klemperer[49]) sowie Courmont und Doyon[28]) haben aber gezeigt, daß man durch Injektion genügend großer Giftmengen auch das Huhn tetanisch machen könne. Unter den Kaltblütlern wurde von Metschnikoff die Schildkröte ganz refraktär gefunden. ebenso verträgt der Alligator große Mengen Toxin ohne zu erkranken, gleichgiltig ob er in der Kälte oder Wärme ist, desgleichen der Skorpion. . Die Bedeutung der Temperatur für die Empfänglichkeit haben die interessanten Versuche von Courmont und Doyon[27]) am Frosche gezeigt. Dieses Tier ist im Winter und in der Kälte refraktär gegen Tetanus, im Sommer oder bei künstlicher Erwärmung empfänglich. Die Unempfänglichkeit reicht bis zu einer Temperatur von 10—16° C. Das injizierte Gift verschwindet rascher aus dem Blute und den Organen des Warm- als des Kaltfrosches. Bei diesem findet man, wenn man 5—6 letale Dosen injiziert hat, noch nach Monaten Toxin, bei Injektion einer letal. Dos. verschwindet es gegen den 30. Tag.

Knorr hat eine Empfindlichkeitsskala für die gebräuchlichen Tiere aufgestellt. Das Pferd steht an erster Stelle. Wenn man die Dosis Gift, welche im Stande ist 1 g Pferd zu töten = 1 setzt, so ist nach Knorr die Dos. letal. für 1 g Meerschweinchen = 2, für 1 g Ziege = 4, 1 g Maus = 13, 1 g Kaninchen = 2000, 1 g Huhn 200000.

Behring gibt unter Zugrundelegung derjenigen Giftmenge, die 1 g lebender Maus tötet, folgende Zahlen an: 1 + Ms = 12 + Pferd = 6 + Meerschweinchen = $^1/_2$ + Ziege = $^1/_{100}$ + Kaninchen + $^1/_{1000}$ = Gans = $^1/_{4000}$ + Taube = $^1/_{30\,000}$ + Huhn.

Je nach der Menge des Giftes unterscheidet er eine tötliche Dosis, eine krankmachende, und eine nicht mehr pathologisch wohl aber noch physiologisch wirkende, „immunisierende Dosis". Jeder dieser Wirkungsgrade läßt sich abgrenzen. Der Zwischenraum zwischen unwirksamer und tötlicher Dosis wird von Knorr Empfindlichkeitsbreite genannt. Bei wenig empfänglichen Tieren (Huhn) ist sie sehr groß, beim Pferde sehr klein. Die doppelte Menge des Giftes, welches noch keine Veränderungen erzeugt, tötet schon das Pferd.

Prüfung und Auswertung des Toxins.

Da das flüssige Tetanusgift sehr labil ist, benutzt man zur Auswertung am besten Trockengifte, entweder das mit Ammonsulfat ausgesalzene und im Exsikator getrocknete oder das nach Marx[61]) konservierte Gift. Zur Wertbestimmung eines Giftes verwendet man Meerschweinchen oder weiße Mäuse, gewöhnlich die letzteren. Zur Vornahme der Prüfung bereitet man sich von dem Trockengifte stets eine frische Lösung in Wasser oder phys. Kochsalzlösung, von der man weitere Verdünnungen macht. Mäuse injiziert man am besten unter die Rückenhaut. Man wählt dazu eine Spritze mit dünner Kanüle und schiebt die Nadel möglichst weit unter der Haut vor. Nach erfolgter Injektion und dem Herausziehen der Kanüle empfiehlt es sich die Einstichöffnung mit zwei Fingern oder einer Pinzette zuzuklemmen und die Flüssigkeit durch sanftes Reiben zu verteilen. Auf solche Weise vermeidet man sicher ein Herausfliessen von Flüssigkeit, das natürlich zu groben Fehlern Anlaß geben könnte. Wenn man unter die Rückenhaut bei Mäusen injiziert hat, so tritt Krümmung der Wirbelsäule auf. Den Beginn der Krankheit kann man erkennen, wenn man die Maus an der Schwanzspitze aufhebt und hoch hält. Wenn sie krank ist, werden die Hinterbeine unsymetrisch gehalten, das gesunde wird gerade gestreckt, das Kranke gekrümmt gehalten. Wenn man Mäuse beim Beginn der Erkrankung beobachtet, sieht man auch häufig, daß sie breitspurig laufen. Als einfache letale Dosis wählt man diejenige Giftmenge, welche eine Maus am 4. bis 5. Tage tötet. Individuelle Schwankungen kommen dabei praktisch nicht in Betracht. Nach Versuchen von Behring und Ransom[7]) geht jede Maus auf die einfache letale Dosis zugrunde und erholt sich auf $^1/_3$ der letalen Dosis. Behring[6]) unterschweidet zwei Giftwerte, einen direkten = + Ms, d. h. wie viel Gramm lebendes Mäusegewicht von 1 g Trokentoxin tötet (z. B. 0,00001 g tötet eine Maus von 15 g, so tötet 1 g des Giftes 100000 Mäuse à 15 g = 1500000 g Mäuse) und einen indirekten Giftwert = + ms d. i. wie viel vom Trockengifte erforderlich ist um $^1/_{1000}$ A.-E. (Antitoxin-Einheit) zu neutralisieren. Eine A.-E. ist nach Behring[7]) diejenige Menge, die gerade 40000000 + Ms neutralisiert. Die

indirekte Giftbestimmung*) ist nur für aus frischer Bouillon ausgesalzene Gifte verwendbar, da sich bei längerem Stehen der Bouillon die Gifte in der Weise verändern, daß ihre Toxizität abnimmt, nicht aber das Bindungsverfahren für das Antitoxin, frische noch nicht modifizierte Gifte nennt BEHRING Gleichgifte und bei ihnen ist das Verhältnis von $+$ Ms : $+$ ms $= 1:1$. Wenn man Meerschweinchen zur Auswertung des Toxins verwendet, injiziert man am besten in die Oberschenkelmuskulatur der hinteren Extremität. Die Tiere gehen dann unter zunehmenden Kontrakturen und Lähmungserscheinungen hauptsächlich der hinteren Extremitäten (Robbenstellung) ein.

Literatur.

1) ASAKAWA, Centralblatt für Bakt., Bd. XXIV, pag. 166 und 284.
2) AUTOKRATOW, Arch. de med. exper. 1892.
3) BECK, Neurolog. Centralblatt 1894, pag. 900.
4) BEHRING, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XII.
5) Ders., Fortschr. der Med. 1899. N. 21.
6) BEHRING und KNORR, Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIII.
7) BEHRING und RANSOM, Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 12.
8) BESREDKA, Ann. de l'Inst. Pasteur 1903, pag. 138.
9) BLUMENTHAL, Zeitschr. für klin. Medizin, Bd. XXXII, pag. 138.
10) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 11 und 12.
11) BOSSANO, Compt. rend. de l'Acad. de sciences 1888.
12) BRIEGER, Deutsche med. Wochenschr. 1887.
13) Ders., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XIX, pag. 101.
14) BRIEGER und BOER, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXI.
15) BRIEGER und COHN, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XV, pag. 1.
16) BRIEGER und FRAENKEL, Berliner klin. Wochenschr. 1890.
17) BRIEGER, KITASATO und Wassermann, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XII.
18) BRUNNER, Beiträge für klin. Chirurgie 1892, Bd. IX.
19) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1894, Nr. 5.
20) BUCHNER, Centralblatt für Bakt. 1888, Bd. IV.
21) Ders., Münch. med. Wochenschr. 1903, pag. 450.
22) BUSCHKE und OERGEL, Deutsche med. Wochenschr. 1893, Nr. 7.
23) CARLE et RATTONE, Giornale della R. acad. di med. di Torino 1884.
24) COURMONT et DOYON, Arch. de phys. 1893.
25) Dies., Semaine med. 1893.
26) Dies., Compt. rend. de la soc. de biol. 1893.
27) Dies., Compt. rend. de la soc. de biol. 1898.
28) Dies., Le Tétanos, Paris 1899.
28a) COURMONT, DOYON et PAVIOT, Soc. de biologie 1897 und 1898.
29) DANYSZ, Ann. de l'Inst. Pasteur 1989, Nr. 2.
30) DEBRAND, Ann. de l'Institut Pasteur 1900 und 1902.
31) DIMITRIEWSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur 1903, pag. 148.
32) DÖNILZ, Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 428.
33) FABER, KNUD, Berliner klin. Wochenschr. 1890, pag. 717.
34) FERMI und BASSU, Centralblatt für Bakt. 1904, Bd. XXXV.
35) FERMI und PERNOSSI, Centralblatt für Bakt., Bd. XV, pag. 303.
36) FLEXNER and NOGUCHI, Studies from the Rockfeller Institute 1905, Vol. V.
37) FRAENKEL, C., Centralblatt für Bakt. 1888, Bd. IV.
38) GOLDSCHEIDER, Fortschr. der Med. 1898.
38a) GOLDSCHEIDER und FLATAU, Fortschr. der Med. 1897 und Deutsche med. Wochenschrift 1898.
39) GRUBER, Centralblatt für Bakt. 1887, Bd. I.
40) GUMPRECHT, Deutsche med. Wochenschr. 1894, Nr. 26.
41) Ders., Pflügers Archiv 1895.
42) HIBLER, Centralblatt für Bakt., Bd. XXV, pag. 603.
43) HUBER, Archiv für Hygiene 1905.

*) Näheres s. im Kapitel über Tetanusantitoxin.

44) Hueppe, Centralblatt für Bakt. 1888, Bd. IV.
45) Jodlbauer und Tappeiner, Münch. med. Wochenschr. 1904, pag. 737.
46) Kitasato, Zeitschr. für Hygiene, Bd. VII, pag. 225.
47) Ders., Zeitschr. für Hygiene 1891, Bd. X.
48) Kitasato und Weyl, Zeitschr. für Hygiene 1890, Bd. VIII.
49) Klempner, Archiv für experim. Pharmakologie und Pathologie 1893, Bd. XXXI.
50) Knorr, Habilitationsschrift, Marburg 1895.
51) Ders., Fortschr. der Med. 1897, Nr. 17.
52) Ders., Münch. med. Wochenschr. 1898, Nr. 11 und 12.
53) Kondratjeff, Centralblatt für Bakt. 1897, pag. 407.
54) Landsteiner und von Eisler, Centralblatt für Bakt. 1905, Bd. XXXIX.
55) Loewenstein, Wiener klin. Wochenschr. 1903.
56) Marie, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897, pag. 591.
57) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, pag. 91.
58) Marie und Morax. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, pag. 418.
59) Dies., Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, pag. 849.
60) Dies., Ann. de l'Inst. Pasteur 1903, pag. 335.
61) Marx, E., Festschrift für Robert Koch. Jena 1903.
62) Ders., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XL, pag. 231.
63) Metschnikoff, Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, pag. 84.
64) Milchner, Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 17.
65) Meyer und Ransom, Arch. für experim. Pharmakologie u. Pathologie, Bd. XLIX.
66) Nicolaier, Deutsche med. Wochenschr. 1884, Nr. 12.
67) Nissl, Centralblatt für Neurologie 1894 und Fortschr. der Med. 1897.
68) Nissen, Deutsche med. Wochenschr. 1891.
68a) Pestana, Soc. de biol. 1891, pag. 511.
69) Petri und Maassen, Mitteil. aus dem Kaiserl. Gesundh.-Amte, Bd. VIII.
70) Ransom, Deutsche med. Wochenschr. 1898.
71) Ders., Zeitschr. für physiol. Chemie 1900, Bd. XXXIV.
72) Rosenbach, Langenbecks Archiv 1886, Bd. XXXIV.
73) Roux und Borrel, Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, Nr. 9.
74) Roux und Martin, Ann. de l'Inst. Pasteur 1894.
75) Sanchez-Toledo, Soc. de biol. 1891, Juni.
76) Siebert, Zeitschr. für physiol. Chemie 1901.
77) Stintzing, Grenzgebiete der Medizin und Chirurgie, Bd. III, Heft 3 und 4.
78) Tarozzi, Centralblatt für Bakt., Bd. XXXVIII, pag. 619.
79) Thalmann, Zeitschr. für Hygiene 1900, Bd. XXXIII.
80) Tizzoni und Cattani, Centralblatt für Bakt., Bd. XI.
81) Dies., Archiv für experim. Pharmakologie und Pathologie 1890, pag. 432.
82) Tizzoni, Riforma med. 1899.
83) Uschinsky, Centralblatt für Bakt. 1893.
84) Vaillard, Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, pag. 676.
85) Vaillard und Rouget, Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, Nr. 6.
86) Vaillard et Vincent, Ann. de l'Inst. Pasteur 1891, Nr. 1.
87) Vincenzi, Arch. per le science med. 1892 und Riform. med. 1895.
88) Wassermann, Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 1.
89) Wassermann und Takaki, Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 1.
90) Wolff-Eisner, Münch. med. Wochenschr. 1906, pag. 2745.
91) Wrzosek, Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 48 u. Centralblatt für Bakt. 1906.
92) Zupnik, Centralblatt für Bakt., Bd. XXIV.
93) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1900.
94) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1905.

V.

Botulismustoxin.

Von

Thorvald Madsen.

Bac. botulinus.

Durch VAN ERMENGEMS[2]) grundlegende Untersuchungen über die Fleischvergiftungsepidemie in Ellezelles ist man zur Klarheit über die Ätiologie dieser Krankheiten gekommen. Man erhielt einen festen Anhaltspunkt für den Unterschied zwischen dem eigentlichen Botulismus und der durch Bazillen der Coli- und Proteusgruppe u. a. bewirkten Giftbildung in verschiedenen Nahrungsmitteln.

Das als Botulismus bezeichnete Krankheitsbild rührt von der Vergiftung mit einem spezifischen Toxin, dem Botulismustoxin her, das von einem Saprophyten, dem Bacillus botulinus erzeugt wird.

VAN ERMENGEM[2]) und RÖMER[15]) fanden ihn im Schinken, KEMPNER[7a]) in den Schweinefäces, MADSEN in der giftigen Makrele, und SCHNEIDEMÜHL[17]) hält ihn auch für die Ursache der sogenannten Geburtsparalyse bei Rindern.

Der Bacillus botulinus ist ein ziemlich großes und gerades Stäbchen von 4—6 μ Länge und 0,9—1,2 μ Breite mit etwas abgerundeten Enden. Er macht ganz schwache Eigenbewegungen und hat 4—8 ganz feine peritriche Geißeln. Zuweilen sind die Bazillen zu zweien oder in sehr kurzen Fäden aneinandergereiht. In Agar- und Gelatineplatten erscheinen sie oft in Spindel- und Chlostridiumformen. Er wird nach GRAM leicht gefärbt.

Wachstum und Erhaltung der Kultur.

Der Bazillus, welcher obligat anaerob ist, gedeiht gut in Traubenzuckergelatine. In dieser haben die jungen, 4—6 Tage alten Kolonien ein charakteristisches Aussehen. Sie sind kreisrund, durchsichtig, leicht gelblich und setzen sich aus groben Granulationen zusammen, welche in kontinuierlicher Bewegung (besonders an der Peripherie) sind. Nach FORSSMAN[4]) kommt diese eigentümliche Zirkulation nicht zustande, wenn die Gelatine zu viel Kalk enthält. Um die Kolonie herum kommt es zur Verflüssigung der Gelatine.

Durch längeres Stehen in einer Glukosegelatinekultur werden, jedoch nicht regelmäßig, am Ende der Stäbchen, nur selten in der Mitte, Sporen gebildet. Nach VAN ERMENGEM tritt diese Sporenbildung am konstantesten in stark alkalischen Gelatinekulturen mit 20% Traubenzucker auf.

Der Bazillus gedeiht nicht in Kulturen, welche die geringste sauere Reaktion zeigen, und selbst freie Kohlensäure wirkt sehr hemmend auf das Wachstum.

Es kommt häufig vor, daß die Traubenzuckergelatine oder die Agarkulturen plötzlich ihre Überimpfbarkeit verlieren. Um dies zu vermeiden, muß man jede 3.—4. Woche überimpfen und zur Aussaat die dicken Flocken benutzen, welche sich am Grunde der verflüssigten Gelatinekulturen finden. Das Nährsubstrat muß gründlich gekocht werden, um die Luft zu entfernen und man darf nicht vergessen, daß die Reaktion deutlich alkalisch sein muß.

Um die Vitalität der Kulturen zu erhalten, ist es nach FORSSMANS Ansicht wichtig, zuweilen das Nährsubstrat zu wechseln. Am besten wechselt man mit Glukosebouillon und Glukosegelatine.

Der Bacillus botulinus ist ein echter Saprophyt, der am besten bei niedriger Temperatur gedeiht. Die Wachstumbedingungen sind am günstigsten zwischen 18 und 25°. Unter 18° ist das Wachstum langsam und beschränkt. Bei einer Temperatur von über 38° wächst er nur äußerst schlecht und bildet keine Sporen; wird er danach einer Temperatur von 25° ausgesetzt, so kommt das Wachstum wieder zustande.

Darstellung des Toxins und seine Eigenschaften.

Den flüssigen Nährboden bereitet man nach VAN ERMENGEM aus Schweinefleisch. Die Bouillon wird nach Alkalisierung mit Glukose (1%), Pepton (1%), NaCl (1%) und Gelatine (2%) versetzt.

Derselbe Forscher bekam ein kräftig wirkendes Toxin in Bouillon mit 2% Glukose, 1% Pepton, 0,6% NaCl, deren Alkaleszenz pro Liter 10—15 ccm normales Na_2Co_3 betrug.

Bei 20—25° trübt sich eine solche Bouillon regelmäßig und entwickelt große Mengen Gas (H, CH_4, CO_2). Die Gaserzeugung dauert mehrere Wochen fort. Bei alten Kulturen findet sich ein charakteristischer Geruch, der etwas Säuerliches hat, wie der der ranzigen Butter.

Ein ganz ähnliches Medium benutzte TCHITCHKIN[18]). Zur Bouillon (500 g Schweinefleisch zu 1 Liter Wasser) setzte er 1% Pepton, 1% Dextrose und ½% Chlornatrium zu, und verteilte sie in Kolben mit langen Hälsen, in denen sich etwas reines Calciumkarbonat befand, das auf dem Boden liegen bleibt. Die Flüssigkeit wurde mit einer dünnen Schicht flüssigen Vaselins bedeckt. Darauf schloß man die Kolben mit Watte und sterilisiert sie bei einer in drei aufeinanderfolgenden Tagen jedesmal ½ Stunde dauernden Erwärmung von 100°. Wenn die Kultur 2—3—4 Wochen bei 20° gestanden hatte, zeigte sie sich so toxisch, daß 0,001 ccm durchschnittlich genügten, um ein 300—500 g schweres Meerschweinchen zu töten; jedoch war die Toxizität sehr verschieden, und die tödliche Minimaldosis schwankte zwischen 0,01 und 0,00005 ccm.

FORSSMAN bekam nicht immer Toxinbildung in VAN ERMENGEMS Bouillon. Er fand als das beste Kulturmedium Schaffleischbouillon.

Schaffleisch und 0,6 % NaCl-lösung werden in gleicher Gewichtsmenge ohne Filtration und ohne weiteren Zusatz gemischt. Nach Autoklavierung wird die Brühe geimpft und 14 Tage lang bei 25° gehalten. In dieser Zeit muß man dafür sorgen, daß die sehr reichlich entwickelte Luft entweichen kann. Die Filtration der Kultur geschieht durch Chamberland-Kerzen.

Wie vorher erwähnt fand Forssman, daß das Wechseln des Substrats die Vitalität der Kultur beeinflusse; dasselbe gilt auch für die Toxinproduktion. Er bekam konstant ein schwächeres Toxin, wenn diese Fleischbrühe mit einer anderen Bouillonkultur, als wenn sie mit einer frischen Gelatinekultur besät wurde.

Wie man sieht, alkalisierte Forssman die Bouillon nicht. Durch vergleichende Versuche fand er nämlich, im Gegensatz zu van Ermengem, daß die Toxinproduktion am besten in einem schwach sauren Medium vor sich gehe.

Die Herstellung des anaeroben Zustandes geschieht am leichtesten durch Wasserstoffdurchleitung. Kohlensäure darf man nicht anwenden, da sie nach van Ermengem schwach antiseptisch auf den Bazillus wirkt.

Was den Gehalt des Mediums an Chlornatrium betrifft, so gehen die Angaben auseinander. Nach van Ermengem hemmt ein Überschuß Kochsalz über 2 % das Wachstum. Forssman fand, daß ein NaCl-gehalt von 0,5 % bis 1 % am günstigsten, nicht bloß für die Entwicklung der Kulturen, sondern auch für die Toxinbildung sei. Im Gegensatz hierzu hatte er aus Krals Laboratorium eine Kultur mit der Anweisung erhalten, daß zu einem kräftigen Wachstum ein großer — gegen 5 % — Kochsalzgehalt notwendig sei.

Diese Verschiedenheit der Angaben beruht vielleicht darauf, daß die Toxinbildung durch den Bacillus botulinus dieselbe Launenhaftigkeit zeigt wie bei den meisten anderen Mikroben, und selbst wenn man die von van Ermengem und Forssman angegebenen Methoden aufs genaueste beobachtet, gelingt es nicht immer, ein starkes Toxin zu erzeugen.

Nährsubstrate nach Angaben Petermanns, Maasens, Uchinskys oder Proskauers und Becks hergestellt, sind zur Toxindarstellung ungeeignet.

Das Toxin, welches man nach dreiwöchentlichem Wachstum bei 25° erhält, zeichnet sich, selbst nach Filtration durch Chamberland-Filter, durch welches es ohne Schwierigkeit und ohne größeren Verlust hindurchgeht, durch seinen eigentümlichen, penetranten, an Buttersäure erinnernden Geruch aus.

Das Toxin ist sehr empfindlich gegen Alkohol, Äther und Oxydationsmittel, während es reduzierende Substanzen und selbst Natriumamalgam besser verträgt. In der Luft und im Lichte wird es schnell vernichtet.

Bewahrt man es in geschmolzenen Röhren im Dunkeln auf, so behält es mindestens zehn Monate lang seine Wirkung unverändert (Forssman[4]), wie es auch im getrockneten Zustande sehr haltbar ist. Bei 37° erfolgt die Schwächung viel schneller, als bei niedrigerer Temperatur, sowohl in luftgefüllten als in luftleeren Röhren.

Es verliert seine Wirkung, wenn es drei Stunden auf 58° und ½ Stunde auf 80° erwärmt wird.

Alkalien, z. B. eine 3 % Sodalösung macht es fast augenblicklich unwirksam, wohingegen es Säuren viel besser verträgt. In Alkohol und Äther ist das Toxin unlöslich.

BRIEGER und KEMPNER[1]) haben versucht, das wirksame Prinzip im Botulismustoxin auf folgende Weise zu isolieren.

Das toxische Filtrat wird mit dem doppelten Volumen einer dreiprozentigen Chlorzinklösung versetzt. Bei zu starker Azidität der Kulturfiltrate geht manchmal noch ein erheblicher Bruchteil des Giftes in das Filtrat hinein. Dies kann man dadurch verhindern, daß man den zu erheblichen Säureüberschuß durch Zusatz von Spuren Ammoniak etwas abstumpft. Der Niederschlag wird sorgfältig ausgewaschen und soviel Ammoniumbicarbonat einer einprozentigen Lösung hinzugesetzt, daß eine äußerst schwach alkalische Reaktion entsteht. Die Zinkverbindung wird alsdann mit Ammoniumphosphat gänzlich gesprengt, wobei das unlösliche phosphorsaure Zink ausfällt. Hiervon wird abfiltriert und nun durch Aussalzen mit Ammoniumsulphat das Gift nebst Albumosen zur Ausscheidung gebracht.

BRIEGER und KEMPNER haben nach dieser Darstellungsmethode einen Rückstand bekommen, der größtenteils im gehärteten Filter zurückgehalten wurde, so daß die äußerst geringen, vom Filter abstreifbaren Partikelchen kaum einer Wägung zugängig waren. Die Ausbeute war stets quantitativ.

Versuche zur weiteren Reinigung durch Natriumsulphatfällung der Albumosen scheiterten indessen daran, daß die Verluste zu bedeutend waren.

Wirkungen des Toxins.

Das Botulismusgift wird in den tierischen Organismus durch alle bekannten Eingangspforten aufgenommen und besitzt die Eigentümlichkeit, daß es im Gegensatz zu vielen anderen Toxinen vom Darmkanal resorbiert wird.

Das Syndrom des Botulismus ist erschöpfend dargestellt von VAN ERMENGEM[2 und 3]), an dessen Darstellung wir uns im Folgenden wesentlich halten

Es wird hauptsächlich charakterisiert:

1. durch eine Ab- oder Zunahme der Speichel- und Schleimabsonderung des Mundes, Rachens usw.

2. durch eine mehr oder weniger ausgesprochene externe und interne Ophthalmoplegie (Blepharoptosis, Mydriasis, Accomodationslähmung, Diplopie, Strabismus int.).

3. durch Dysphagie bis Aphagie, Aphonie, hartnäckige Obstipation, Urinretention.

4. durch das Fehlen von Fieber, von Sensibilitäts- und Gehirnstörungen.

5. Diesem Symptomkomplex schließen sich oft Atmungs- und Herzstörungen an, die mehr oder weniger schnell unter den Erscheinungen der Bulbärparalyse zum Tode führen können.

6. Endlich treten die charakteristischen Symptome, am frühesten nach 12 bis 24 Stunden, nach der Einverleibung auf. Man nimmt ge-

wöhnlich an, daß das Botulismusgift die Nervenzellen der grauen Substanz zerstöre. Am empfindlichsten ist der unter dem Aquaeductus Sylvii gelegene Teil des Oculomotoriuskernes, der die Accomodation versorgt. Dann folgt der für den Dilat. pupillae, der für M. rect. int., für den M. levat. palp. sup., der sensitive Kern des Trigeminus. Von den am Boden des vierten Ventrikels liegenden Kernen werden von dem Toxin angegriffen: Der Facialis-Kern und der des N. abducens, von denen der Medulla oblongata der des Glossopharyngeus. Spinalen Ursprungs ist das Aufhören der Schweißsekretion und als Ausdruck einer Affektion des Centrum vesicospinale die erschwerte Innervation der Blase [11]).

Sehr empfindlich gegen die Injektion sind Kaninchen, Meerschweinchen, Mäuse, Katzen.

Bei der Ingestion ist die Giftigkeit viel geringer. Ratten und Tauben können große Mengen verzehren, ohne die geringsten Störungen zu erfahren.

Hühner, Hunde und Katzen zeigen nach sehr beträchtlichen Mengen mehr vorhergehende Erscheinungen, wie Erbrechen, leichten Durchfall, Anorexie etc. und bisweilen einige paretische Symptome.

Frösche und Fische scheinen völlig unempfindlich zu sein.

Das charakteristische Bild ist bei Katzen, die besonders zum Studium der Symptomatologie geeignet sind, ausgeprägt.

Es gelingt leicht bei diesen Tieren die lokalisierten, fast pathognomonischen Paresen hervorzurufen, beträchtliche und dauernde Mydriasis, Änderung der Pharyngeal- und Bronchialsekretion, Lähmung der Blinzelhaut, vollständige Aphonie, krupartigen Husten, Aphagie, Retention der Fäces und des Urins. Hohe Dosen töten innerhalb 36—48 Stunden nach einem Latenzstadium von 6—12 Stunden. Der Kollaps und die allgemeine Parese treten rasch ein, und die Tiere verenden mit Erstikkungsanfällen krupösen Hustens, Pupillenerweiterung usw. In sehr akuten Fällen kann der Zungenprolaps ausbleiben, ist sonst aber sehr charakteristisch.

Bei Kaninchen sieht man nach subkutaner Injektion von großen Dosen ein kurzes Latenzstadium von wenigen Stunden, worauf die Tiere plötzlich dyspnöische Anfälle bekommen. Sie fallen vollständig gelähmt, bisweilen mit einem scharfen Schrei auf die Seite und sterben unter Zuckungen infolge der rapiden Respirationslähmung nach einer Viertel- bis halben Stunde. Bei geringeren Dosen ist die Latenzzeit länger, 2 bis 3 bis 4 Tage; die Symptome stellen sich plötzlich wenige Stunden vor dem Tode ein und bestehen in Speichelfluß und besonders in Lähmung. Zuweilen beschränkt sich die Parese mehr auf einzelne Muskelgruppen. Der Kopf fällt zur Seite, die vorderen Extremitäten sind ausgestreckt; die hinteren unter den Leib gezogen behalten ihre volle Kraft. Sonst sind die hinteren Extremitäten allein gelähmt, und das Kaninchen schleppt sich mühsam auf den Vorderpfoten mit gehobener Schnauze weiter. Während mehrerer Wochen beobachtet man bei diesen Tieren Speichelfluß, Erweiterung der Pupillen und Aphonie. Vom Magen aus wirkt das Gift bedeutend langsamer, und oft tritt der Tod erst nach Wochen ein.

Mäuse sind sehr empfindlich. Nach Einverleibung kleinster Mengen des Toxins tritt die Parese der hinteren Extremitäten und der Tod innerhalb weniger Stunden ein.

Zu quantitativen Bestimmungen ist das Meerschweinchen meistens benützt worden.

Das Krankheitsbild, welches diese Tiere bei subkutaner Injektion darbieten, gleicht dem bei Kaninchen beschriebenen. Starke Muskelerschlaffung, grünlicher Ausfluß vom Munde, Aphonie, Aphagie und bei männlichen Tieren oft Penisprolaps, Stuhlverstopfung, Pupillendilatation, eiterige Sekretion in den Augenwinkeln, großer Gewichtsverlust. Erst ziemlich spät im Vergiftungsstadium treten Atmungsbeschwerden auf, so daß die Frequenz bis auf 30—40 in der Minute fällt.

Hat die Vergiftung einige Tage gedauert, so hat das Tier ein sehr charakteristisches Aussehen. Es sitzt ganz still; die Schnauze hängt auf die Erde, die Augenlider sind zusammengeklebt und ganz mit Eiter gefüllt. Die Respiration ist beschwerlich, unregelmäßig und geht mit interkostalen Einziehungen vor sich. Auffallend ist die große Muskelschlaffheit, die besonders deutlich ist, wenn man das Tier anfaßt. Bei einiger Übung ist man imstande, kleine Vergiftungsgrade an der Schlaffheit der Bauchmuskeln zu fühlen.

Bei der Autopsie beobachtet man namentlich eine starke Hyperämie der Gehirngefäße, besonders derjenigen der Basis und ebenfalls ist die graue Substanz im Rückenmark, hautsächlich in dessen Lumbal- und Cervicalteil stark hyperämisch.

Das Sektionsbild ist nicht besonders charakteristisch: Hyperämie in den Bauchorganen und in den Nieren, etwas vermehrte Feuchtigkeit des Peritonäums, gefüllte Harn- und Gallenblase, sowie kleine pneumonische Herde in den Lungen.

Forssmann fand, daß die Inkubationszeit und das Krankheitsbild ganz gleich waren, wenn das Toxin subkutan, intracerebral, subdural, intraarteriell, intravenös, intratestikulär und in die Lymphdrüsen injiziert wurde. Dagegen zeigte sich ein anderes Bild, wenn die Injektion intraperitoneal, intrapleural oder intrapulmonär vorgenommen wurde. Die letale Dosis wird dann viel geringer; z. B. ist die Dosis, welche in 48 Stunden tötet, bei der intrapleuralen Injektion $^1/_5$—$^1/_9$ der subkutan injizierten. Ebenfalls ist die Inkubationszeit bedeutend kürzer. Während diese bei der subkutanen Injektion nicht unter ein Minimum von sechs Stunden herabgesetzt werden kann, kann sie bei diesen Applikationsweisen bis auf vier Stunden heruntergehen.

Das Krankheitsbild (Meerschweinchen), welches bei der intraperitonealen, der intrapulmonalen und der intrapleuralen Injektion entsteht, wird vor allem durch eine progrediente, gegen Schluß vollständige Paralyse des Diaphragma beherrscht, die eine sehr starke Dyspnoe bewirkt. Die Respirationsfrequenz sinkt von der normalen (120—160 in der Minute) auf 20—30; der Respirationstypus ist ausgesprochen kostal, bei jedem Atemzuge werden die Seiten und der Bauch eingezogen. In der Dyspnoe schnappt das Tier hörbar nach Luft. Die anderen Botulismussymptome, die Paresen, treten erst viel später auf.

Dasselbe ist bei Kaninchen der Fall.

Die Empfindlichkeit ist bei der intraperitonealen, der intrapleuralen, resp. intrapulmonalen und der subkutanen Injektion verschieden. Forssman gibt an, daß dieselbe Dosis ein Meerschweinchen in vier Tagen durch subkutane, in zwei durch intraperitoneale und in einem Tage durch intrapulmonale Injektion tötet.

Eine Dosis, die, intrapulmonal angewandt, in 80 Stunden tötet, gibt, intraperitoneal injiziert nur eine schwere Dyspnoe, wovon sich das Tier

erholt, während weder die subkutan, intrazerebral, subdural, intraarteriell oder intravenös mit derselben Dosis injizierten Tiere nicht das geringste Zeichen von Unwohlsein zeigten.

Zu quantitativen Bestimmungen werden subkutane Injektionen (Meerschweinchen) am meisten verwendet. Außer dem Gewichtsverlust und dem Tode erhält man eine sehr feine Reaktion in der eigentümlichen Erschlaffung der Muskeln, namentlich der Bauchmuskeln, die man bei einiger Übung leicht fühlen kann und die lange dauert.

Tabelle 1.

Dosis in ccm	Ausfall	Dosis in ccm	Ausfall
0,0015	† 1 Tag	0,0009	Schlaffheit in 3 Wochen.
0,0015	† $1^1/_2$ „	0,0009	Gewichtsverlust.
0,0015	† 2 „	0,0009	Gewichtsverlust.
0,0013	† 2 „	0,0009	Gewichtsverlust.
0,0013	† 5 „	0,0007	Gewichtsverlust 2 Wochen.
0,0013	† 6 „	0,0007	Gewichtsverlust 1 Woche.
0,001	† 4 „	0,0007	Gewichtsverlust 1 Woche.
0,001	† 5 „	0,0005	Gewichtsverlust 1 Woche.
0,001	† $5^1/_2$ „	0,0003	Unbedeutende, ein paar Tage dauernde Schlaffheit.

Diese kleine Tabelle gewährt einen Überblick über die Faktoren, welche bei der Bestimmung der tötenden Minimaldosis bei der subkutanen Injektion auf Meerschweinchen in Betracht kommen.

Die ersten krankhaften Zeichen einer Vergiftung treten in Form von Muskelschlaffheit bei Dosen auf, die $= {}^1/_3 - {}^1/_4$ der letalen ist und welche sich ziemlich scharf begrenzen läßt.

Literatur.

1) Brieger und Kempner, Beitrag zur Lehre der Fleischvergiftung. Deutsche med. Wochenschrift 1897. Nr. 33.
2) Ermengem, van, Über einen neuen anaeroben Bazillus und seine Beziehungen zum Botulismus. Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXVI, pag. 1.
3) Ders., Die pathogenen Bakterien der Fleischvergiftungen. Kolle und Wassermann. Handbuch der pathog. Mikroorganismen, Bd. II, pag. 637.
4) Forssman, Bidrag til Kännedomen om Botulismen Bakteriologi, Lund 1900.
5) Forssman et Lundström, L'immunisation active contre le Botulismus. Ann. de l'Inst. Pasteur, Avril 1902, Tome XVI.
6) Forssman, J., Studien über die Antitoxinbildung bei aktiver Immunisierung gegen Botulismus. Centralblatt für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII, pag. 463—468.
7) Kempner und Pollack, Die Wirkung des Botulismustoxins (Fleischgiftes) und seines spezifischen Antitoxins auf die Nervenzellen. Deutsche med. Wochenschrift 1897, Nr. 32.
7a) Kempner, Weiterer Beitrag zur Lehre von der Fleischvergiftung. Das Antitoxin des Botulismus. Zeitschr. für Hygiene 1897, Bd. XXVI.
8) Lochte, Die amtsärztliche Beurteilung der Fleischvergiftung (Botulismus). Centralblatt für Bakt., Ref. Bd. XXXIII, pag. 517.
9) Madsen, Th., Über das Wurstgift und sein Gegengift. Centralblatt für Bakt. I 1905. Ref. Bd. XXXVII, siehe auch Verhandl. der dänischen Akademie der Wissenschaften, 16. Dezember 1904.

10) MARINESCO, Lésions des centres nerveux produites par la toxine du bacillus botulinus. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1896, Tome III, pag. 989—991.
11) MORELLI, Dreifacher Fall von Wurstvergiftung (Botulismus). Wiener med. Wochenschr. 1904, Nr. 45. Ref. Biochem. Centralblatt, Bd. III, 1131.
12) OSSIPOFF, Influence de l'intoxication botulinique sur le système nerveux central. Ann. de l'Institut Pasteur 1900, Tome XIV.
13) OTTO und SACHS, Über Dissoziationserscheinungen bei der Toxin-Antitoxinverbindung. Zeitschr. für exper. Pathologie und Therapie, Bd. III.
14) PELZL, Über Botulismus. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 31.
15) RÖMER, Ein Beitrag zur Ätiologie des Botulismus. Centralblatt f. Bakt., Bd. XXVII, pag. 857.
16) RÖMER und STEIN, Experimenteller Beitrag zur Frage nach dem Sitz uud Wesen der Akkomodationsparese bei bakteriellen Intoxikationskrankheiten. I. Die Akkomodationsparese bei Botulismus. Graefes Arch. Bd. LVIII, Heft 2.
17) SCHNEIDEMÜHL, Über Botulismus beim Menschen und die sogenannte Geburtsparalyse bei Rindern. Centralblatt für Bakt., Bd. XXIV, pag. 577 und 619.
18) TCHITCHKINE, Essai d'immunisation par le voíe gastro-intestinale contre la toxine botulique. Ann. de l'Institut Pasteur 1905, pag. 335.

VI.

Das Dysenterietoxin.

Von

Dr. R. Doerr

in Wien.

Die bazilläre, epidemisch auftretende Ruhr besitzt, wie bekannt, keine einheitliche Ätiologie. Sie kann durch zwei verschiedene Erreger hervorgerufen werden, die man nach ihren Entdeckern als Typus Shiga-Kruse und Typus Flexner zu bezeichnen pflegt, die sich kulturell durch ihr Verhalten zum Mannit und agglulinatorisch durch hochwertige Sera von einander differenzieren lassen.

Hierzu gesellt sich aber noch ein weiterer Unterschied von ganz prinzipieller Bedeutung, den zuerst Kraus und Doerr[10–12]) und unabhängig von ihnen Todd[22, 23]) erkannt hat. Die Shiga-Kruseschen Bazillen produzieren ein echtes, lösliches Toxin, welches bei bestimmten Versuchstieren (Kaninchen, Affen, Hunden) nicht nur in geringen Dosen letal wirkt, sondern auch imstande ist, bei geeigneter Applikation pathologische Veränderungen des Darmes und Zentralnervensystems zu erzeugen, die klinisch und anatomisch eine völlige Identität mit dem Bilde der menschlichen Dysenterie darbieten.

Bei den Flexnerschen Stäbchen ist weder Kraus und Doerr noch Todd oder in jüngster Zeit Flexner und Sweet[8]) der Nachweis derartiger löslicher, typisch wirkender Gifte geglückt.

Diese Tatsache, deren Erkenntnis wir der experimentellen Richtung der ätiologischen Forschung zu verdanken haben, hat aber nicht nur für den tierischen Organismus Gültigkeit. Wir finden, daß die durch die atoxischen Flexnerstäbchen hervorgerufenen Erkrankungen einen leichten Charakter darbieten, und abgesehen von Komplikationen oder Sekundärinfektionen meist schnell verlaufen. Sie entsprechen mehr einer lokalen Infektion der Dickdarmmukosa und dürften sich klinisch wohl zum großen Teile mit dem decken, was man bisher als Sommerdiarrhoe, Kinderdysenterie etc. zu benennen pflegte. Die Infektionen mit Shiga-Kruse-Typus dagegen bieten das klassische Bild der schweren Ruhr. Sie verlaufen protrahierter, haben oft eine hohe Mortalität und, was für uns hier besonders wichtig, sie besitzen einen Symptomenkomplex, der vorwiegend nur auf eine Toxämie, auf eine Vergiftung mit löslichen Stoffwechselprodukten der Bakterien bezogen werden kann. Die cerebralen Symptome, das inkonstante Verhalten des Fiebers, die akuten Störungen von Seite des Herzens, die charakteristischen Nachkrankheiten (Hemi- und

Paraplegien, Gelenk- und Sehnenscheidenentzündungen, Augenaffektionen etc.) lassen wohl kaum eine andere Deutung zu.

Im besten Einklange mit dieser Auffassung der Shiga-Kruse-Dysenterie als einer Toxämie stehen die bakteriologischen Befunde, die man bisher bei Sektionen von an Dysenterie Verstorbenen erheben konnte. Stets fanden sich die Bakterien nur auf, respektive in der Dickdarmschleimhaut, selten in den mesenterialen Lymphknoten (postmortale Einwanderung?), nie aber im Blute und den inneren Organen. Auch die Blutuntersuchungen bei dysenterischen Patienten hatten stets ein negatives Ergebnis. Hierzu kommt noch, daß die Zahl der Keime am Orte ihrer primären Ansiedelung stets auffallend gering bleibt (Kruse [13]), v. Drigalski [7]), Doerr [3]), so daß wir die schweren Erscheinungen in loco sowohl als besonders in entfernten Organen wohl nur auf die Aktion hochgiftiger, resorbierbarer Toxine zurückzuführen vermögen.

Alles in allem besteht also eine vollständige Analogie dieser Form der bazillären Ruhr mit anderen bakteriellen Toxikosen, wie sie in der Diphtherie und im Tetanus ihre typischen Vertreter finden.

Durch diese Feststellungen hat sich uns nicht nur ein tiefer Einblick in die Pathogenese der einzelnen Phaenomene des dysenterischen Krankheitsbildes eröffnet, es war auch die Möglichkeit gegeben, die antitoxische Serotherapie, deren Erfolge bei der Diphtherie heute nicht mehr diskutabel erscheinen, bei der Shigaschen Form der bazillären Ruhr praktisch zu verwerten. Inwieweit es gelungen ist, eine experimentelle Basis für die ätiologische Therapie der Ruhr zu schaffen, und wirkliche Heilerfolge beim Menschen zu erzielen, soll im Kapitel „Dysenterieantitoxin" ausführlich auseinandergesetzt werden.

An dieser Stelle soll zunächst das spezifische Ruhrgift einer eingehenden Besprechung unterzogen werden. Betont sei nur nochmals, daß damit stets das Gift der Shiga-Kruseschen Stäbchen gemeint ist, da der Flexnertypus, wie einleitend bemerkt, überhaupt keine konstanten, charakteristisch wirkenden Toxine bildet, wenigstens soweit das Tierexperiment darüber Aufschluß geben kann. Es ist keinesfalls überflüssig, auf diesen Punkt eindringlich aufmerksam zu machen, da nicht nur ältere Publikationen (Vaillard und Dopter [24]), sondern auch neuere Arbeiten (Flexner und Sweet [8]) und zusammenfassende Darstellungen (Kolle und Hetsch [9]), den prinzipiellen Unterschied zwischen atoxischen (Flexner-) und toxischen (Shigaschen) Erregern der Dysenterie entweder leugnen oder nicht scharf genug präzisieren.

Darstellung des Toxins.

Schon diejenigen Autoren, die sich zunächst nur mit dem Vorkommen und den Eigenschaften der Shiga-Kruseschen Stäbchen befaßten, erkannten bei der Prüfung der Pathogenität die hohe Giftigkeit dieser Bakterienart speziell für Kaninchen. v. Drigalski [7]), Conradi [2]), Müller [19]), Vaillard und Dopter [24]), Doerr [3]) fanden übereinstimmend, daß schon sehr geringe Dosen ($^1/_{10}$—$^1/_{20}$ Öse) großen Kaninchen intravenös oder subkutan injiziert, den Tod unter charakteristischen Erscheinungen nach sich ziehen. Besonders bei den Versuchen, durch Immunisierung solcher Tiere hochwertige Agglutinationssera zu gewinnen, trat die enorme Pathogenität deutlich hervor, die von vornherein richtig als Giftwirkung gedeutet wurde, da abgetötete Kulturen in gleich niedrigen Mengen denselben Effekt hatten, und da auch bei Injektion lebenden Materiales das Blut und die inneren Organe steril blieben.

So mag sich zunächst die Vorstellung gebildet haben, daß dieses Gift intrazellulärer Natur sei, und als strenges Endotoxin im Sinne PFEIFFERS betrachtet werden müsse. Eine Stütze fand diese Auffassung in den Angaben von CONRADI[2]), sowie von VAILLARD und DOPTER[24]), die keimfreie Filtrate selbst älterer Bouillonkulturen auch dann wirkungslos fanden, wenn sie zu hohen Dosen griffen.

Das Bestreben, diese vermeintlich fest an die Bakterienzelle gebundenen Gifte in löslicher Form zu gewinnen, zeitigte nun eine ganze Reihe ziemlich komplizierter Methoden, die technisch alle darauf hinausliefen, die Dysenteriebazillen auf möglichst schonendem Wege zu zerstören, ohne das freiwerdende spezifische Toxin erheblich zu schädigen.

Der erste, der diesen Weg betrat, war CONRADI[2]): Er verwendete das Verfahren der sogenannten aseptischen Autolyse, d. h. er überließ die emulgierten Bakterien der Setbstverdauung bei Bruttemperatur. Im einzelnen gestaltete sich die Prozedur folgendermaßen: In großen Kulturschalen wurden auf schwach alkalischem 3 % Fleischwasseragar mit Zusatz von 1 % Tropon Massenkulturen von SHIGA-KRUSEschen Bazillen angelegt, der Bakterienrasen nach 20 Stunden mit sterilem Nickelspatel abgekratzt und auf mehrere enge, sterile Zentrifugierröhrchen verteilt. Zu jedem Röhrchen wurden $^2/_3$ des Volums der Bakteriemasse 0,85 % Kochsalzlösung hinzugefügt, und die Röhrchen sodann für 24, höchstens 48 Stunden in den Thermostaten (37° C.) gebracht. Nach dieser Zeit wurde die überstehende, klare, gelblich gefärbte Flüssigkeit sorgfältig abpipettiert, die vereinigten Flüssigkeitsmengen auf das Fünffache mit Kochsalzlösung verdünnt und durch BERKEFELDsche Tonkerzen filtriert. Die auf ihre Sterilität geprüften Filtrate werden im Vakuum auf $^1/_{10}$—$^1/_{50}$ ihres Volumens bei 35° C eingedampft. Dieses eingeengte Filtrat stellt das Bakteriengift dar, von dem 0,1 ccm bei intravenöser Injektion für Kaninchen von $2^1/_2$—3 Kilo stets letal ward.

Zur selben Zeit beschrieben NEISSER und SHIGA[20]) ein anderes Verfahren. Sie schwemmten eine Agarkultur in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung auf, töteten die Emulsion bei 60° C durch eine Stunde ab, brachten sie für zwei Tage in den Thermostaten (37°) und filtrierten sodann durch Reichelkerzen. Kaninchen, die 0,5—0,2 dieser filtrierten Aufschwemmung intravenös erhalten hatten, starben innerhalb 48 Stunden. NEISSER und SHIGA machen mit Recht darauf aufmerksam, daß die höhere Wirksamkeit der CONRADIschen Autolysate nur eine scheinbare sei, da CONRADI seine endgültigen Filtrate im Vakuum noch beträchtlich (auf $^1/_{10}$—$^1/_{50}$) einengt.

Bei dem NEISSER-SHIGAschen Verfahren gelangen nur „abgetötete Bakterien unter Ausschluß der Autolyse“ zur Verwendung und denken sich die beiden Autoren die Lösung des Giftes in der Flüssigkeit so, das sie annehmen, daß die Bakterien unter dem Einflusse höherer Temperaturen toxische Zellrezeptoren abspalten. Wir werden später noch sehen, daß diese Vorstellung mit den von KRAUS und DOERR[12]) ermittelten Tatsachen nicht vereinbar ist.

Auch VAILLARD und DOPTER[24]) töten die Emulsionen ihrer Agarkulturen in Kochsalzlösung durch Erwärmen auf 58° ab, und bringen sie sodann in den Thermostaten, wo sie allerdings viel länger, 20—40 Tage verweilen. Sodann liefert die Emulsion, die sich durch langsame Sedimentierung allmählich klärt, durch einfaches Dekantieren eine klare Flüssigkeit, die steril ist (absolument privé de bacilles) und in Mengen

von 0,5—1,0 ccm bei intravenöser Applikation größere Kaninchen in 24—48 Stunden tötet.

Schon nach Jahresfrist (1904) erschienen jedoch drei ungefähr gleichzeitige und von einander unabhängige Arbeiten von Rosenthal[21]), Todd[23]) und Kraus[10]) die geeignet waren, in unseren Anschauungen über das Dysenterietoxin eine völlige Umwälzung herbeizuführen, und die komplizierten, bisher angegebenen Methoden der Toxindarstellung durch jene einfache Technik zu ersetzen, die beim Diphtherie- und Tetanustoxin bereits allgemein in Anwendung stand: die keimfreie Filtration von Bouillonkulturen.

Rosenthals Filtrate (Chamberlandkerzen) waren allerdings noch wenig wirksam. Die Dosis letalis betrug bei einer 11 tägigen Kultur 5 ccm und erst bei drei Wochen alten Bouillonkulturen sank sie auf 0,2—1,0 ccm herab. Ähnliches berichtet Todd, der aus 10 tägigen Kulturen nur schwache Giftlösungen (Dos. let. = 1,0 ccm) erhielt, und erst nach sechswöchentlichem Stehen bei 37° C auf eine relativ hohe Toxizität der Filtrate stieß (Dos. let. = 0,1 ccm). Auch Kraus und Doerr[12]) schreiben: „Der Einfluß des Alters der Bouillonkulturen auf den Toxingehalt der Filtrate trat immer wieder zutage, so daß wir jetzt jüngere als dreiwöchentliche Kulturen überhaupt nicht mehr zur Toxinerzeugung verwenden". Doch gelang es Kraus und Doerr bereits, die tödliche Dosis auf 0,05 ccm pro Kilo Kaninchen bei intravenöser Injektion herabzudrücken.

Rosenthal läßt die Frage offen, warum es anderen Forschern nicht geglückt ist, Dysenterietoxin durch Filtrierung von Bouillonkulturen zu erhalten. Er spricht nur die Vermutung aus, daß dieser Umstand entweder von einer besonderen Giftigkeit seiner Kulturen oder ven „irgendwelchen Sonderheiten des Nährbodens" abhängen müsse. Er selbst verwendete alkalische Martinsche Bouillon (hergestellt mit aus Schweinemagen gewonnenem Pepton).

Todd dagegen fand, daß die Ursache der früheren Mißerfolge in einer zu geringen Alkaleszenz des Kulturmediums liegen müsse und züchtete auf einer Bouillon, der nach Erreichung des Lackmusneutralpunktes noch 7 ccm Normallauge per Liter hinzugefügt wurden.

Eingehender hat sich Doerr[4, 6]) mit dem Studium dieser Verhältnisse befaßt und gefunden, daß lackmussaure oder neutrale Bouillonen keine oder eine sehr geringe Toxinausbeute liefern. Er stellte fest, daß man das Alkaleszenzoptimum erst erhält, wenn man lackmusneutraler Bouillon noch 0,3% kristallisierte Soda hinzufügt. Es wären dann noch 8—10 ccm Normalnatronlauge pro Liter erforderlich, um den Phenolphthaleïnneutralpunkt zu erreichen. Beim Sodazusatz und noch mehr beim nachfolgenden Sterilisieren bilden sich starke Niederschläge, die man aber durch neuerliches Filtrieren nicht entfernen soll*). Die Anwendung besonderer Peptonsorten ist überflüssig; Pepton Witte gibt vorzügliche Resultate. Die Kolben sollen nicht zu hoch aufgefüllt werden, damit der Luftsauerstoff freien Zutritt hat, da bei Anaërobiose, wie auch Rosenthal angibt, die Toxinproduktion erheblich vermindert erscheint. Für die Filtration sind Reichelkerzen am zweckmäßigsten. Da aber auch diese Filter noch immer viel vom Toxin zurückhalten, empfiehlt

*) Eine andere, vorzügliche Methode, die noch konstantere Resultate liefert, ist die Züchtung in schwach lackmusalkalischer Bouillon, der man etwas feinpulverisierte Kreide (20 g pro Liter) vor der letzten Sterilisation zusetzt. (Doerr.)

es sich für die Praxis so zu verfahren, wie beim Diphtherietoxin. Man setzt zur Kultur 0,5 % Karbolsäure zu und filtriert nach 24stündiger Einwirkung durch schwedische Papierfilter bis zur völligen Klärung.

Unter Beobachtung dieser Kautelen lieferten schon fünftägige Kulturen hochtoxische Filtrate (durch Reichelkerzen), deren letale Dosis bisweilen nur 0,01 ccm beträgt, jedenfalls also viel tiefer liegt, als bei den Autolysaten und Extrakten der früheren Autoren. Doch empfiehlt es sich immerhin, 2—3 Wochen zuzuwarten. Übrigens hat man einen vorzüglichen Indikator für die erfolgte Toxinbildung in dem Auftreten einer dicken, grauweißen, später in Bröckeln zu Boden sinkenden Kahmhaut. Kolben ohne Kahmhaut enthalten kein oder nur schwaches Toxin (Doerr)[6]).

Mit der Toxinproduktion Hand in Hand geht eine eigentümliche Reaktionsänderung der Kulturflüssigkeit in der Weise, daß mit dem Anwachsen der Toxizität auch ein rasches Steigen der Alkalinität korrespondiert. Starke Giftlösungen sind nur wenig vom Phenolphthaleïnneutralpunkt entfernt oder haben denselben bereits überschritten, färben sich also bei Zusatz von Phenolphthaleïn rot.

Nach den bekannten Untersuchungen Madsens[15]) bestehen ähnliche Gesetze für die Toxinbildung in Diphtheriebouillonen und eine Mitteilung von Doerr[5]) aus jüngster Zeit dürfte uns einen Aufschluß über den tieferen Grund dieses Abhängigkeitsverhältnisses des Toxingehaltes von der Alkaleszenz geben. Doerr fand, daß Säuren schon in schwachen Konzentrationen mit Dysenterie- und Diphterietoxin ungiftige, durch Überneutralisieren wieder restituierbare Modifikationen liefern und es liegt nahe anzunehmen, daß zwar auch in sauren oder neutralen Nährmedien Gifte gebildet, jedoch durch die Säurewirkung in atoxische Derivate übergeführt werden. Sichere Anhaltspunkte für diese Auffassung sollen Experimente bieten, die gegenwärtig noch nicht zum Abschlusse gelangt sind; immerhin verfüge ich bereits über einen Versuch, in dem ein atoxisches Filtrat einer 20tägigen, stark sauren Bouillonkultur nach dem Neutralisieren allerdings erst in größeren Gaben (1—2 ccm) letal war.

Ein zweiter Faktor, der für die Toxindarstellung von allerwesentlichster Bedeutung ist, ist die verschiedene Toxizität der einzelnen Stämme. Auf diesen Punkt haben zuerst Kraus und Doerr[12]) aufmerksam gemacht, und eine neuerliche Nachprüfung von Doerr[6]) ergab gleichfalls, daß verschiedene Stämme, besonders aber solche aus verschiedenen Epidemien, unter völlig gleichen Bedingungen Giftlösungen von außerordentlich differentem Titre liefern.

Neben dieser Methode der Toxinerzeugung durch Filtrieren von Bouillonkulturen existiert noch eine zweite, auf welche Kraus[10]) schon in seiner ersten Mitteilung hinwies und die sich gleichfalls durch große Einfachheit auszeichnet. Sie besteht im Aufschwemmen von Agarkulturen in Kochsalzlösung und keimfreier Filtration der Emulsion durch Reichelkerzen. Ein vorheriges Abtöten der Bakterien oder längeres Autolysieren ist völlig überflüssig; es genügt, wenn man die Bakterien mit der Kochsalzlösung durch eine Stunde bei Zimmertemperatur in Berührung läßt. Emulgiert man zwei gut gewachsene, 20stündige Kulturen auf dem gewöhnlicher Agar in den gebräuchlichen Petrischen Schalen in 50 ccm 0,85 % Kochsalzlösung und filtriert nach einer Stunde, so sind die leicht gelblichen, klaren Filtrate schon in Dosen von 0,3—0,5 letal. Da Flexner und Sweet[8]) diese Angaben bezweifelt haben, und negative Resultate erhielten, welche sie veranlaßten, auf das alte Verfahren der

Conradischen Autolyse zurückzugreifen, habe ich[6]) wiederholt die Methode von Kraus angewendet und bin nur in der Lage, ihre Brauchbarkeit in jeder Richtung zu bestätigen. Merkwürdigerweise sind auch diese Filtrate nur wenig vom Phenolphtaleïnneutralpunkt entfernt, reagieren also auf Lackmus stark alkalisch, auch dann, wenn man die Kulturen auf dem gewöhnlichen, neutralen oder schwachalkalischen Agar anlegt. Der Grund liegt darin, daß der gelöste Agar viel schwächer alkalisch reagiert als das Kondenswasser des erstarrten. Offenbar scheiden sich beim Erstarren des Agars Verbindungen aus, die im Kondenswasser gelöst werden und demselben seine starke Alkaleszenz verleihen, die nach den Erfahrungen bei Bouillonkulturen das rasche Entstehen leicht auslaugbarer Toxine begünstigt.

Wie man sieht, war also die Vorstellung, daß das Dysenterietoxin streng an die Bakterienzelle gebunden sei, völlig unrichtig. Wie bei den Diphterie- und Tetanusbazillen gelingt es auch hier bei Einhaltung der beschriebenen Vorschriften leicht, lösliche Toxine in den Kulturflüssigkeiten nach Abfiltrieren der Leiber nachzuweisen, und besitzen die auf diesem Wege hergestellten Giftlösungen vielfach eine höhere Wirksamkeit als die Extrakte und Autolysate von Conradi, Neisser-Shiga, sowie von Vaillard und Dopter*). Da ferner die Beziehungen des Dysenterietoxins zu seinem Antitoxin nach den eingehenden Versuchen von Kraus und Doerr die weitgehendsten Analogien zu den Gesetzen bieten, wie sie Behring und Ehrlich für das Diphteriegift und seinen Antikörper ermittelt, so müssen wir uns heute auf den Standpunkt stellen, daß das Gift der Kruse-Shigaschen Stäbchen zu den echten Toxinen im engsten Sinne gehört und mit den Endotoxinen im Sinne Pfeiffers nichts zu schaffen hat.

Bei Anaërobiose (ausgekochte, in der angegebenen Weise alkalisierte Bouillon unter Wasserstoffgas und Paraffinabschluß), erhält man ungiftige, oder wenigstens schwach wirksame Filtrate (Rosenthal[21]) Doerr[6]).

In eiweißfreien Nährlösungen z. B. in Uschinskyscher Flüssigkeit wachsen die Dysenteriebazillen sehr langsam. Sie bilden selbst nach mehreren Wochen kein gelöstes Toxin, auch bei Einhaltung der optimalen Alkaleszenz. Ja es sind auch die Bakterien selbst ungiftig, da man mehrere Kubikzentimeter der stark getrübten Kultur subkutan oder intravenös Kaninchen ohne jeden Erfolg injizieren kann, übrigens ein neuer Beweis für die Identität des in Lösung übergehenden mit dem in den Bakterienzellen selbst enthaltenen Giftes. Impft man aber eine alkalische Bouillon mit einer solchen Kultur auf Uschinskyscher Nährlösung, so sind die neue Kultur und ihr Filtrat nach wenigen Tagen wieder toxisch (Doerr)[6]). Darnach scheint also die Anwesenheit von Eiweiß für die Bildung des Toxins unbedingt erforderlich zu sein.

---

*) Es ist also auch nicht mehr berechtigt, auf diese alten Verfahren zurückzukommen oder sie in modifizierter Form zur Toxinerzeugung anzuwenden, wie dies neuerlich Lüdke[14]), Flexner und Sweet[8]) und Besredka[1]) getan haben. So lange man der Meinung war, das Bouillonkulturfiltrate kein Gift enthalten, waren diese Methoden sicher am Platz und haben die Autoren, welche mit ihnen gearbeitet, manche wertvolle Ergebnisse erzielt, wie insbesondere Vaillard und Dopter. Gegenwärtig aber sind sie sowohl vom theoretischen als praktisch-experimentellen Standpunkt zu verwerfen; vom theoretischen, weil sie sich auf der falschen Endotoxinhypothese aufbauen, vom praktischen, weil alle diese Extrakte neben dem spezifischen Dysenterietoxin nicht spezifische, aber giftige Substanzen der Bakterienleiber enthalten und so zu Irrtümern Veranlassung geben, wie dies am besten aus den Meerschweinchenexperimenten früherer und neuerer Arbeiten hervorgeht (s. weiter unten).

Trockentoxine lassen sich auf doppeltem Wege gewinnen und zwar

a) durch Aussalzen mit Ammonsulfat. Es scheiden sich beim Eintragen des Salzes in Giftlösungen bis zur Sättigung bräunliche Flocken ab, die nach oben steigen, leicht durch Papierfilter von der Lösung getrennt und auf Tonplatten von der überschüssigen Salzlösung befreit werden können. Man löst sie in destilliertem Wasser und dialysiert die Lösung durch einige Tage gegen Leitungswasser. Die resultierende, salzfreie Flüssigkeit wird bei 37° zur Trockene eingedampft, der Rückstand pulverisiert. Man erhält ein bräunliches, leichtes Pulver, von dem 1—2 mg die letale Dosis für ein Kilo Kaninchen darstellen. (Todd, Doerr).

b) durch Fällen mit der fünf- bis sechsfachen Menge absoluten Alkohols. Der schlammige Niederschlag wird abfiltriert, getrocknet und pulverisiert. Das Pulver ist heller, grauweiß und ähnlich wirksam, wie das durch Aussalzen gewonnene (Doerr, Rosenthal).

Die Resistenz

des Dysenterietoxins ist im Vergleich zu anderen Toxinen, besonders zum Tetanusgift recht bedeutend.

Man kann die keimfreien Giftlösungen (Bouillonkulturfiltrate oder Agarkochsalzextrakte) monatelang unter Toluol oder mit Zusatz von 0,5% Karbolsäure konservieren, ohne daß eine deutliche Abschwächung eintritt (Kraus, Doerr und Todd); erst nach $^3/_4$—1 Jahr sinkt die Toxizität etwa um die Hälfte. Auch das Licht schadet nicht merklich; durch eine ca. achtstündige Einwirkung direkten Sonnenlichtes wurde die Dosis let. eines bestimmten Filtrates nicht alteriert (Doerr).

Besonders bemerkenswert ist jedoch die Widerstandsfähigkeit des Dysenterietoxins gegen höhere Temperaturen. Nachdem schon die älteren Autoren gefunden hatten, daß einstündiges Erwärmen auf 58° C die Dysenteriebazillen zwar abtötet, ihre Giftigkeit aber nicht herabsetzt, benützten Neisser-Shiga, sowie Vaillard und Dopter diese Eigenschaft zur Herstellung ihrer keimfreien, giftigen Bakterienextrakte. Die letzteren geben für ihren Giftstoff an, daß er im geschlossenen Gefäß während einer Stunde auf 60°, 70 ja 75° C erhitzt werden kann, ohne an Aktivität einzubüßen; erst 75—80° schwächten ihn ab, indem sie das Inkubationsstadium verlängerten, 81° C endlich zerstörten ihn völlig.

Für die Bouillonkulturfiltrate rühren die genauesten Angaben von Doerr[6]) her. Rosenthal l. c. erwähnt nur summarisch, daß 70—100° das Dysenterietoxin abschwächen, aber nicht vernichten. Diese Angabe ist unrichtig; Todds Resultate, der fand, daß einstündiges Erwärmen auf 70° vertragen wird, daß dagegen die Einwirkung von 80° während derselben Zeit das Gift zerstört, entsprechen den Tatsachen.

Nach Doerr werden die Giftlösungen völlig zerstört, wenn 90 bis 100° C auch nur eine Minute einwirken. 80° C haben diesen Effekt erst nach 3 Minuten, nach 1 Minute erscheint die Inkubation des erwärmten Toxins verlängert. 70° C alterieren bei einer Einwirkungsdauer von einer Viertelstunde die Toxizität überhaupt nicht; nach einer halben Stunde ist auch bei der dreifach letalen Dosis die Inkubation verlängert, noch deutlicher nach einer vollen Stunde. Auch 60° C schwächen die Giftlösungen ab, allerdings erst nach 1—2 Stunden; auch hier erscheint selbst bei großen Dosen der Krankheitsverlauf erheblich pro-

trahiert, die Tiere gehen z. B. auf 1,5 ccm erst am 3.—4. Tage ein, während 1,0 ccm der genuinen Toxinlösung schon in acht Stunden den Exitus herbeiführt. Die Tiere, welche nach intravenöser Injektion der durch 60—70° C abgeschwächten Toxine eingehen, zeigen sehr regelmäßig die noch detaillierter zu beschreibende hämorrhagisch-nekrotisierende Typhlitis, während dieser Obduktionsbefund bei den mit natürlichen Giftlösungen gespritzten Kaninchen weit inkonstanter ist und etwa nur bei einem Drittel beobachtet wird. Diese Tatsache ist nicht ohne Bedeutung; sie erklärt, warum die Verwendung der durch Erhitzen abgetöteten Bakterien, sowie der Extrakte von Neisser-Shiga, und von Vaillard-Dopter im Tierexperiment geeignet ist, falsche Vorstellungen über die Konstanz der experimentellen Darmerkrankung beim Kaninchen zu erwecken. Nach den Angaben Doerrs sind also durch Erhitzen hergestellte Giftlösungen für das Studium des natürlichen Dysenterietoxins überhaupt nicht recht geeignet.

Auch gegen die tryptische Verdauung ist das Ruhrgift hochresistent (Flexner und Sweet, Doerr). Selbst die 7stündige Einwirkung eines sehr wirksamen Trypsinpräparates war nicht imstande, eine schwache Giftlösung zu inaktivieren (Doerr); erst nach Tagen macht der Abbau des Toxins nachweisbare Fortschritte (Flexner und Sweet). Ebensowenig wirkt die Enterokinase (Flexner und Sweet) oder die Galle. Frische Kaninchengalle zu gleichen Teilen Dysenterietoxinlösung zugesetzt, kann selbst nach 1—2stündigem Verweilen bei 37° C die Toxizität nicht reduzieren; es ist nicht einmal das Inkubationstadium verlängert (Doerr).

Besondere Besprechung verdient das Verhalten gegen Säuren.

Rosenthal meint, daß schwache Säuren (bis zu deutlich saurer Reaktion hinzugefügt) auf das Dysenterietoxin keine Wirkung haben, daß dagegen starke Lösungen (4%) von Salzsäure dasselbe zerstören.

Doerr[6]) fand aber, daß Mineralsäuren (1—2% Salzsäure, 1% Schwefelsäure, 1% Salpetersäure), nicht aber Essigsäure (4%) das Toxin überhaupt nicht zerstören, sondern in eine ungiftige Modifikation überführen, die durch Kettung der Säure an eine starke Base, wieder in das ursprüngliche Toxin rückverwandelt werden kann. Zum besseren Verständnis sei einer dieser Versuche hier zitiert:

Eine Giftlösung, von der 1,0 ccm in wenigen Stunden sicher tödlich war, wird mit 2% konzentrierter Salzsäure versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Am nächsten Tage erwies sich die stark saure Lösung für Kaninchen, auch in größeren Dosen, als ungiftig.

Kan. 361. 2,0 ccm intravenös am 31. X. Bleibt dauernd gesund.
Kan. 396. 4,0 ccm intravenös am 31. X. Bleibt dauernd gesund.

Die saure Flüssigkeit wurde sodann am 31. X. mit konzentrierter Sodalösung bis zum Phenolphthaleinneutralpunkt neutralisiert und bis zum 1. XI. stehen gelassen. Sie war nach dieser Zeit wieder hochwirksam.

Kan. 302. 2,0 ccm intravenös am 1. XI. † 2. früh.
Kan. 341. 4,0 ccm intravenös am 1. XI. † 2. früh (positiver Darmbefund!)

Nach diesem Paradigma gehen alle derartigen Experimente. Essigsäure hatte wenigstens in der angewendeten Menge (—4%) insofern keine Wirkung, als die Toxinlösungen trotz Säureeinwirkung unverändert giftig blieben. Abgetötete Bakterienemulsionen können in gleicher Weise wie Giftlösungen durch Säuren atoxisch gemacht und durch Überneutralisieren wieder reaktiviert werden. Zur Wiederherstellung der Ausgangstoxizität

ist nur erforderlich, daß man nicht einfach bis zur Lackmusneutralität neutralisiert, sondern die ursprüngliche Reaktion wieder herstellt, die sich beim Dysenteriegift, wie oben erwähnt, dem Phenolphthaleinneutralpunkt nähert. Auch braucht es eine gewisse Zeit, sicher mehrere Stunden, bis die völlige Regeneration des Giftes aus seiner ungiftigen Verbindung beendet ist.

Diese Tatsachen bieten weitgehende Analogien zu den Verhältnissen beim Kobragift, wie sie MORGENROTH[17, 18]) und PANE beschreiben. Nur sind beim Dysenterietoxin die sauren Lösungen völlig ungiftig, wenigstens in 4—6fach letaler Dosis. Auch besteht insofern eine Differenz, als die sauren Lösungen nicht wie beim Kobragift koktostabil sind. Schon kurze Einwirkung der Siedehitze zerstört das Toxin völlig, so daß es durch Neutralisieren nicht mehr regeneriert werden kann. Endlich erfolgt die Rückverwandlung der atoxischen Modifikation ins Toxin ungleich schneller, als dies nach MORGENROTHS Angaben beim Kobratoxin der Fall zu sein scheint.

Wirkungen des Dysenterietoxins.

Das empfänglichste Tier ist unstreitig das Kaninchen. Bei intravenöser Injektion hoher Dosen erfolgt schon in wenigen (6—7) Stunden der exitus. Injiziert man die einfach tödliche Menge, oder wenig mehr, so entwickelt sich nach einem 10—12stündigen Inkubationsstadium ein eigentümliches Krankheitsbild: es treten Paresen meist der hinteren, seltener der vorderen Extremitäten auf, die bald in Paralysen übergehen. Dabei besteht in etwa einem Drittel der Fälle einfache oder blutige Diarrhoe; unter zunehmender Paralyse (Harnträufeln, Sphinkterlähmung) und Hypothermie gehen die Tiere nach 24—28 Stunden, oft auch erst am 3.—4. Tage ein. Bei subkutaner oder intraperitonealer Injektion liegt die Dosis letalis höher, die Inkubation erscheint verlängert und beträgt gewöhnlich 2—3 Tage.

Vom Darmkanal aus sind die Gifte völlig unwirksam, ob man sie nun per os einführt (KRAUS und DOERR) oder direkt in das Darmlumen, nach vorausgegangener Laparatomie einspritzt (FLEXNER und SWEETS Versuche am Dünndarm, sowie DOERRS Experimente am Coecum).

Bei intravenöser Injektion und gleich schweren Kaninchen (am meisten empfehlen sich Tiere von einem Kilo Körpergewicht) lassen sich die Dysenteriegiftlösungen auch vorzüglich dosieren, und es bestehen ganz gesetzmäßige Beziehungen zwischen der Höhe der Dosis einerseits und der Länge des Inkubationsstadiums, der Krankheitsdauer usw. andererseits. Eine so völlige Unabhängigkeit der pathologischen Reaktion von der Menge des einverleibten Giftes, wie sie angeblich FLEXNER und SWEET bei ihren Autolysaten fanden, wäre geradezu rätselhaft; bei den Bouillonkulturfiltraten und Agarkochsalzextrakten besteht sie keinesfalls, vielmehr korrespondiert hier die Intensität der Vergiftung stets mit der Menge des injizierten Toxins.

Ziemlich stark reagieren auch Affen (Macacus rhesus) auf die intravenöse Toxininjektion. 1,0 ccm der gewöhnlichen Giftlösungen tötet stets nach 2—3 Tagen. Die Tiere leiden während dieser Zeit meist an blutiger Diarrhoe (DOERR[6]). Merkwürdigerweise wirkt das Gift viel schwächer von der Subkutis.

Auf Hunde und Katzen wirkt das Dysenteriegift gleichfalls, auf Hunde allerdings erst in großen Dosen (5—10 ccm intravenös). Auch

diese Tiere bekommen blutige oder schleimig-blutige Durchfälle, dagegen fehlen ebenso wie bei den Affen meist die paraplegischen, beim Kaninchen sehr konstanten Erscheinungen.

Es gibt aber auch eine ganze Reihe von Tieren, die gegen das Dysenterietoxin völlig refraktär sind, und zwar nach Kraus und Doerr[12]) Hühner, Tauben und insbesondere Meerschweinchen. Man kann, wie Kraus und Doerr durch zahlreiche Experimente wiederholt gezeigt haben, Meerschweinchen 100—200 letale Dosen für Kaninchen subkutan oder intraperitoneal injizieren, ohne daß die Tiere auch nur besondere Krankheitssymptome darbieten würden. Auch die intravenöse Injektion erheblicher Toxinmengen wird anstandslos vertragen.

Es ist demgegenüber schwer zu verstehen, daß die Mehrzahl aller Autoren, die über Dysenterie gearbeitet haben (z. B. Shiga, Conradi, Flexner und Sweet, u. v. a.), von einer Empfänglichkeit der Meerschweinchen für das Dysenteriegift sprechen und wohl nur so zu erklären, daß man zum Teil die Wirkung der lebenden Kultur falsch deutete, zum Teil mit Giften arbeitete, die außer dem spezifischen Dysenterietoxin noch andere nicht spezifische, aber allgemein giftige Körper, Bakterienproteine, Hemialbumosen u. dgl. enthielten, wie das bei den Extrakten von Conradi, Neisser-Shiga, Besredka u. a. notwendigerweise der Fall war. Injiziert man Meerschweinchen größere Mengen einer lebenden Shiga-Kruse-Kultur, so erkranken die Tiere und gehen auch meist zugrunde; sie sterben aber an einer serös-fibrinösen Peritonitis, die absolut nichts charakteristisches hat und durch Typhus- oder Colibazillen, ja durch die sicher atoxischen Flexnerstäbchen ganz ebenso provoziert werden kann. Ebenso gehen Meerschweinchen nach Injektion sehr großer Mengen abgetöteter Dysenteriebazillen oder ihrer Autolysate ein; auch hier bietet die Vergiftung weder klinisch noch anatomisch Besonderheiten, die in irgend welche Parallele zur menschlichen Ruhr zu setzen wären, und kann ebensogut mit anderen Bakterienleibern oder Bakterienextrakten erzeugt werden, z. B. mit Coliautolysaten, abgetöteten Typhusbazillen usw.

Bei Verwendung der Bouillonkulturfiltrate werden diese giftigen, nicht spezifischen Substanzen ausgeschaltet; man arbeitet mit relativ reinen Lösungen des eigentlichen Dysenterietoxins und da tritt die absolute Unempfänglichkeit der Meerschweinchen sofort hervor, wie auch außer Kraus und Doerr noch Todd und Rosenthal fanden, welch letzterer allerdings nicht die richtigen Schlüsse für die experimentelle Technik aus dieser Erkenntnis zog (s. Dysenterieantitoxin).

Anatomie und Histologie der experimentellen Kaninchendysenterie.

Die anatomischen Veränderungen, welche sich bei Kaninchen nach Injektion des Toxins im Zentralnervensystem und im Darme entwickeln, bieten ein ganz spezielles Interesse wegen ihrer außerordentlichen Ähnlichkeit mit den Befunden bei der menschlichen Dysenterie; diese Identität der Prozesse bildet gewissermassen den Schlußstein des vielgliedrigen für die Therapie so wichtigen Beweises, daß die Ruhr, soweit sie durch Shiga-Kruse-Bazillen entsteht, tatsächlich eine Toxikose darstellt.

Wie bereits hervorgehoben, ist die Darmerkrankung nicht konstant; sie kann bei Verwendung von reinen, nicht erhitzten Giften nur etwa in 30 % der Versuche beobachtet werden. Zum Teil hängen diese Diffe-

renzen von der Höhe der Dosis ab, insofern, als sehr große Mengen die Tiere oft in wenigen (4—5 Stunden) durch Läsion lebenswichtiger, nervöser Zentren töten, bevor sich noch anatomische Veränderungen der Darmwand ausbilden können; ich bin aber im Gegensatze zu FLEXNER und SWEET nicht geneigt, auf diesen Punkt zu viel Gewicht zu legen. Man beobachtet nämlich bisweilen Kaninchen, die die Injektion nur 6—7 Stunden überleben und doch ausgeprägte Darmläsionen aufweisen und findet andererseits recht oft Tiere, die erst nach 24—28 Stunden eingehen, ohne daß die Autopsie pathologische Prozesse im Intestinaltrakt nachzuweisen vermag. Es ist mir wahrscheinlicher, daß die Darmerkrankung, die ja nicht anders als durch Ausscheidung des Giftes in der Darmwand zustande kommen kann, variiert je nach der Schnelligkeit und Art der Elimination des Toxins aus dem Organismus.

Der Prozeß repräsentiert sich im allgemeinen als eine hämorrhagisch-nekrotisierende Enteritis. Schon von CONRADI[2]), v. DRIGALSKI[7]), VAILLARD und DOPTER[24]), FLEXNER und SWEET[8]) nach Injektion von Bakterienextrakten beobachtet, wurde sie erst in letzter Zeit von DOERR[4, 6]) durch reine Giftlösungen hervorgerufen und eingehender studiert. Vor allem konnte eine höchst seltsame, aber ganz regelmäßige Lokalisation festgestellt werden: Es war ausnahmslos der Blinddarm und nur in ganz seltenen Fällen der angrenzende Teil des Colon (etwa die ersten 10 cm) befallen; der Dünndarm, der übrige Teil des Dickdarmes und der Prozessus vermiformis blieben stets frei.

Es ließen sich mehrere Stadien der Typhlitis unterscheiden:

1, Zunächst entwickelt sich ein hochgradiges entzündliches Ödem der Subserosa und Submukosa des Coecums, sowie des zugehörigen Mesenterialabschnittes, in welchem die Lymphstränge oft deutlich hervortreten. Das sogenannte Pankreas aselli ist gleichfalls geschwollen und hochgradig ödematös.

2. Sodann kommt es zu einer enormen Diapedese von Erythrozyten, und zwar hauptsächlich im Bereiche der queren Schleimhautfalten, so daß diese als schwarzrote, dicke Wülste, von der ödematösen, grauweißen Umgebung deutlich abstechen.

3. Dann erfolgen Blutaustritte im Bereiche der gesamten Schleimhaut, die mächtig geschwollen ist und das Aussehen dunkelroten Sammtes hat. Häufig sieht man auch meist kleine, jedoch oft dichtgedrängte, hellrote, subseröse Hämorrhagien. In diesem Stadium zeigen sich u. zw. wieder zunächst auf den Faltenkämmen die ersten Nekrosen des Epithels in Form feiner, grauweißer oder bräunlicher, opaker, schleierartiger Überzüge.

4. Diese Nekrosen nehmen an Breite zu, befallen schließlich die zwischen den Falten liegenden Bezirke, wachsen auch in die Tiefe, so daß die Schleimhaut in ausgedehnten Partien von mißfarbigen, graugrünen festhaftenden Massen substituiert ist. Die Blutungen haben meist bereits aufgehört, das Blutpigment der Darmwand ist durch Einwirkung des Darminhaltes schiefergrau geworden.

5. Endlich kommt es zu adenomatöser Hypertrophie der normalen, von Nekrosen umgürteten Schleimhautinseln, zur Demarkation der Schorfe und zur Narbenbildung, so daß der Blinddarm schon von außen eine weiße, sehnig glänzende Beschaffenheit darbietet.

Die Intensität der Typhlitis hängt von der Krankheitsdauer ab. Meist bekommt man die drei ersten Stadien zu Gesicht, das vierte ist bereits seltener, das fünfte konnte bei einer sehr großen Zahl von Sek-

tionen (ca. 400) nur zweimal bei Tieren beobachtet werden, die eine sehr kleine Dosis erhalten hatten.

Dabei ist der Blinddarm, der selbst bei Hungerkaninchen immer breiige Faeces enthält, meist leer oder von reichlichem, dünnflüssigem, dunkelrotem, von Gasblasen durchsetztem Blut erfüllt, welches dann natürlich auch im abführenden Colon angetroffen wird, wo es aber schon mit Fäkalmassen vermengt erscheint. Der blutige Blinddarminhalt schimmert durch die ödematöse, wie gallertige Darmwand durch, so daß ein solches Coecum bei der Obduktion auch im uneröffneten Zustande sofort durch seine dunkelviolette Farbe in die Augen sticht.

Bei der histologischen Untersuchung findet man das Ödem des 1. Stadiums zunächst völlig zellfrei. Die Maschen der enorm verbreiterten Submukosa und Subserosa sind auseinandergedrängt. Die Lymphgefässe kolossal ektatisch.

Die Diapedese der Erythrozyten erfolgt zunächst im Bereiche der Schleimhaut selbst, also zwischen Epithel und Muskularis mukosae. Die Nekrosen betreffen das Oberflächenepithel und lassen im Beginne den Fundus der Lieberkühnschen Krypten intakt. Die im Nekrosenbereich liegenden subepithelialen Blutextravasate gehen Veränderungen ein, indem die Erythrozyten zerfallen, zu Schollen verbacken und später braungelbes Pigment liefern. Mit dem Fortschreiten der Nekrosen werden dann auch die tiefer liegenden Bindegewebsschichten der Schleimhaut, die dort verlaufenden Blutgefässe, endlich sogar die Muskularis mukosae in Mitleidenschaft gezogen, so daß auf große Strecken das normale Gewebe durch feinkörnige, von Blutfarbstoff durchtränkte Massen substituiert ist, in welchen nur mehr die elastischen Fasern der Gefäßquerschnitte bei entsprechender Färbung als einzige Gewebselemente erkennbar bleiben.

Ist der Prozeß soweit fortgeschritten, so kommt es zu Blutaustritten in der Submukosa, zu reichlicher Emigration von polymorphkernigen Leukozyten, die auch das Lumen der Gefäße obturieren und stellenweise so dicht liegen, daß sie Abszedierungen vortäuschen. Doch kommt es nie zur Kernfragmentierung und Bildung wirklicher Abszesse.

In die nekrotischen Schleimhautdistrikte dringen vom Darmlumen Bakterien ein, um sich daselbst saprophytisch anzusiedeln. Gegen die Tiefe zu nehmen sie an Zahl ab. Es entstehen auf diese Weise Bilder, welche Vaillard und Dopter[24]) zu einer unrichtigen Behauptung verleiteten. Sie nahmen an, daß es möglich sei, Kaninchen von der Subkutis oder vom Blute aus dysenterisch zu infizieren, weil sie nach Injektion lebender Bakterien Stäbchen in der nekrotischen Darmwand antrafen, die morphologisch den Dysenteriebazillen glichen. Kulturell kann man aber, wie Doerr ermittelt hat, nur Coli nachweisen; auch fehlen die Bakterien in den Schnitten durch die Darmwand, wenn sich noch keine Nekrosen, sondern erst Ödem und hämorrhagische Infiltration des Blinddarmes entwickelt haben. Es handelt sich also auch bei Verwendung lebender Kultur stets um eine Intoxikation, nie um eine Infektion und die in der nekrotischen Darmwand anzutreffenden Bakterienrasen stellen eine sekundäre Invasion von Saprophyten ins tote Gewebe dar.

Die histologische Untersuchung des Nervensystems ergiebt nach Dopter[25]) bei absoluter Integrität der Rückenmarkswurzeln und der peripheren Nerven Veränderungen im Rückenmarke selbst. Sie sind entweder mehr diffuser Natur und bestehen in Chromophilie und Chromatolyse der zelligen Elemente in den Vorderhörnern des ganzen Rückenmarks oder präsentieren sich als umschriebene Erweichungsherde im Be-

reiche der Vorderhörner der Lumbal- oder Zervikalanschwellung. In diesen Erweichungsherden sind alle zelligen Elemente völlig zerstört einschließlich der Neuroglia- und Lymphozytenkerne, die Gefässe sind enorm dilatiert, mit Blutkörperchen vollgepfropft, und bisweilen treten interstitielle Hämorrhagien auf, die sich bis ins gesunde Nachbargewebe erstrecken. Nach diesen histologischen Kriterien bezeichnet DOPTER den Prozeß beim Kaninchen als Poliomyelitis acuta anterior, zu der sich manchmal noch eine Polioencephalitis hinzugesellt. Bei Injektion reiner Giftlösungen werden ganz ähnliche Bilder beobachtet (DOERR.)

Das Dysenterietoxin erzeugt also beim Kaninchen dieselben Organerkrankungen wie beim Menschen. Die völlige Identität der Darmprozesse bedarf keiner weiteren Begründung; es werden aber auch und das ist vielleicht weniger bekannt, beim Menschen in schweren Fällen ähnliche nervöse Störungen beobachtet, wie wir sie beim Kaninchen regelmäßig sehen: Paraplegien der Beine, Lähmungen der oberen Extremitäten und des Gesichtes. In den veröffentlichten Obduktionsbefunden werden Erweichungsherde in den Vorderhörnern beschrieben, so daß also die gleichen Krankheitserscheinungen auch auf gleichen anatomischen Läsionen beruhen.

Bei Hunden erstreckt sich die gleichfalls hämorrhagisch-nekrotisierende Entzündung auf den ganzen Darm, ist aber im Duodenum am intensivsten und klingt nach abwärts zu allmählich ab. Der Darm ist oft vom Pylorus ab völlig mit Blut gefüllt. Die Veränderungen sind entweder mehr diffus, so daß die Schleimhaut das Aussehen dunkelroten Samtes gewinnt, oder mehr zirkumskript, auf den Faltenkämmen und in den PEYERschen Plaques lokalisiert, die dann durch die hämorrhagische Infiltration von der gelbweissen Umgebung grell abstechen. Sehr rasch kommt es auch zu Nekrosen und durch Abstoßung der Schorfe zur Geschwürsbildung.

Der Affendarm ist mehr im unteren Abschnitt affiziert, und zeigt eine hämorrhagische Colitis und Typhlitis mit kleinen. punktförmigen, von dunkelroten Höfen umschriebenen Geschwüren.

Schicksale des Toxins im Organismus.

Zunächst unterliegt es gar keinem Zweifel, daß die durch das Dysenterietoxin hervorgerufene experimentelle Enteritis auf der Ausscheidung des spezifischen Giftes durch die Schleimhaut beruht, also durch denselben Mechanismus erklärt werden kann, wie die Enteritiden nach Vergiftung mit metallischen Verbindungen (Sublimat, Arsen, Wismut u. dgl.).

Warum der Prozeß sich gerade auf die Blinddarmschleimhaut beschränkt, nur in seltenen Fällen das Colon ergreift, den Dünndarm aber stets freiläßt, ist schwer zu sagen und vielleicht auch gar nicht einheitlich zu begründen.

Wenn wir auf die Analogie mit den durch Metallgifte erzeugten Enteritiden zurückgreifen, so sehen wir, daß auch bei diesen die Erkrankung, logischerweise also auch die Giftausscheidung auf den Dickdarm begrenzt ist. Dafür haben nun die Versuche von H. MEYER und STEINFELD[16]) eine Erklärung geliefert. Wenn man Tiere durch subkutane oder intravenöse Einführung von Wismutsalzen vergiftet, so tritt der Exitus unter Krämpfen meist schon nach 24—48 Stunden ein und die Sektion zeigt intensive Schwärzung, Nekrosen und Geschwürs-

bildung im Dickdarme, während Magen und Dünndarm ein vollkommen normales Aussehen bieten. Die chemische Untersuchung ergibt, daß der bei weitem größte Teil des Wismuts im Dickdarm und zwar in Form der Schwefelverbindung ausgeschieden wird. Das brachte Meyer auf den Gedanken, daß die Anwesenheit von Schwefelwasserstoff für die Größe der Wismutausscheidung von Bedeutung sein müsse. Er führte also den vergifteten Tieren Schwefelpräparate per os ein, und fand jetzt auch den Magen geschwärzt, von Nekrosen und Substanzverlusten besetzt; chemisch war die im Magen und Dünndarm ausgeschiedene Wismutmenge gesteigert. Wurde aber durch gleichzeitige innerliche Darreichung von Bi-salzen der Schwefelwasserstoff des Darmkanals absorbiert und unschädlich gemacht, so blieben nach intravenöser Vergiftung Schwärzung und Nekrosen selbst im Dickdarme aus.

Darnach hat es also tatsächlich den Anschein, daß der H_2 S das im Blute kreisende Bismuth in den Darmkapillaren in unlöslicher Form niederschlägt, wo es dann als Fremdkörper ausgestoßen wird, während es sonst im Blute gelöst bleibt und durch die Nieren zur Elimination gelangt. Ähnlich liegen die Dinge nach H. Meyer bei der Hg-Dysenterie.

Es wäre nun immerhin zulässig, diesen Gedankengang bei der experimentellen Typhlitis der Kaninchen nach subkutaner oder intravenöser Injektion von Dysenterietoxin anzuwenden, da der Inhalt des Blinddarmes sich von dem der übrigen Darmabschnitte bei normalen Kaninchen wesentlich unterscheidet. Der Dünndarm besitzt nur gelblichweißen oder grünlichgelben Chymus, der Dickdarm die bekannten harten, runden Skybala; im Coecum dagegen finden wir breiige, wie schon erwähnt, lange stagnierende, braune oder braungrüne, stinkende Fäkalmassen. Es wäre möglich, daß die chemische Beschaffenheit derselben das Toxin gerade hier zur Abscheidung bringt. Dafür würde auch sprechen, das jener Teil des Colons, der unmittelbar ans Coecum grenzt. unter Umständen mitergriffen wird, weil hier der Blinddarminhalt seine Beschaffenheit noch wenig geändert hat, während die tieferen Dickdarmabschnitte mit den harten Skybalis verschont bleiben. Das experimentelle Studium dieser Frage habe ich wegen technischer Schwierigkeiten noch nicht zum Abschlusse gebracht.

Dagegen gibt es für das Freibleiben des Dünndarms von dysenterischen Prozessen beim Kaninchen und natürlich auch beim Menschen noch eine andere Erklärung. Doerr[4, 6]) fand, daß die zerkleinerte Dünndarmwand in geringen Mengen (1—3 g) große Mengen von Giftlösungen (10—20 ccm) in kurzer Zeit (1—2 Stunden) bei Körperwärme in völlig ungiftige Flüssigkeiten verwandelt, so daß das von den Organstückchen durch Papierfilter wieder befreite Toxin in 10—20fach letaler Dosis ohne Schaden intravenös injiziert werden kann.

So wirkte z. B. ein Dysenterietoxin wie folgt:

Kan. mit 0,5 ccm intravenös stirbt innerhalb 20 Stunden.
Kan. „ 0,3 ccm „ „ in 9 Stunden.
Kan. „ 0,2 ccm „ „ innerhalb 20 Stunden.
Kan. „ 0,1 ccm „ „ in 24 Stunden.

10 ccm dieses Toxins werden mit 1 g fein zerhackten, vom Inhalt durch Waschen sorgfältig befreiten Dünndarmes eines soeben durch Nackenschlag getöteten Kaninchens versetzt, und 1 Stunde bei 37° C

belassen. Hierauf wird durch Papier filtriert, das Filtrat toluolisiert und am nächsten Morgen injiziert.:

Kan. mit 0,5 ccm intravenös überlebt.
Kan. „ 1,0 ccm „ „
Kan. „ 2,0 ccm „ (20fach letale Dosis) überlebt.

Kein anderes Organ, und insbesondere kein anderer Darmabschnitt hat diese Wirkung. So nahe es liegt, hierbei an ein verdauendes Ferment zu denken, so sprechen doch viele der von Doerr ermittelten Tatsachen direkt dagegen. Um Trypsin oder Enterokinase könnte es sich im vornherein nicht handeln; wir haben gehört, daß das Dysenteriegift gegen diese Körper sehr resistent ist (Doerr, Flexner und Sweet). Immerhin könnte ja ein noch unbekanntes Ferment im Spiel sein; aber der Dünndarm der Meerschweinchen hat gar keine Wirkung, und andererseits ist der Kaninchendünndarm nicht imstande andere Gifte, Tetanus oder Diphtherietoxin unter analogen Bedingungen zu zerstören respektive zu entgiften.

Diese merkwürdige, antitoxinartige Wirkung des Dünndarmes der Kaninchen auf Dysenteriegiftlösungen könnte also beim Freibleiben dieses Darmteiles eine Rolle spielen.

Sehr unklar sind die Deduktionen von Flexner und Sweet[6]), welche das Zustandekommen ihrer experimentellen Colitis (diese Bezeichnung beruht offenbar auf einer Verwechslung des Blinddarmes der Kaninchen mit dem Colon) oder richtiger Typhlitis abhängig machen vom Zutritt der Galle in den Darm.

Sie fanden, daß bei Sublimatvergiftung die Enteritis ausbleibt oder weniger intensiv ist, wenn man die Galle durch eine Fistel nach außen leitet und wollen ähnliches auch beim Dysenterietoxin beobachtet haben. Abgesehen davon, daß die geringe Zahl der Versuche bei der Inkonstanz der experimentellen Kaninchentyphlitis nicht beweisend ist und daß die Experimente von Flexner und Sweet auch kein eindeutiges Ergebnis geliefert haben, bestehen noch andere Bedenken gegen die Richtigkeit dieser Hypothese.

Wie Doerr hervorhebt, liegen die Verhältnisse bei den metallischen Giften doch anders als bei der Dysenterie. Hg, Bi, As werden mit der Galle abgeschieden und können z. T. von der Darmschleimhaut aufs Neue resorbiert werden; leitet man aber die Galle durch eine Fistel nach außen, so verringert sich natürlich die Menge des im Organismus zirkulierenden und im Dickdarme zur Abscheidung kommenden Giftes.

Das Dysenterietoxin kann aber von der Schleimhaut, auch von der entzündeten (Doerr[6]) nicht in wirksamer Form aufgenommen werden und wird gar nicht mit der Galle ausgeschieden. Wenn man laparatomierten Tieren den ductus choledochus sondiert, sodann große Mengen (200—400 letale Dosen) Toxin intravenös injiziert, und die abtropfende, blutfreie (!) Galle sammelt, so erweist sich dieselbe in beträchtlichen Quantitäten als ungiftig. 10—20 ccm, entsprechend einem Drittel der bis zum Exitus ausgeschiedenen Gesamtgalle, subkutan und intravenös injiziert, enthalten nicht einmal eine tödliche Dosis (Doerr). Da weder Leberzellen noch die Galle selbst das Toxin schädigen (Doerr), so kann man diesen Versuchen die Beweiskraft nicht absprechen.

Aus dem Blute scheinen die Toxine ziemlich rasch zu verschwinden. Sie werden offenbar bald im Nervensystem und im Coecum fixiert, zum Teile vielleicht auch im Dünndarm zerstört.

Literatur.

1) Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1906.
2) Conradi, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 2.
3) Doerr, Centralblatt für Bakt. 1903, Nr. 5.
4) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 41.
5) Ders., ebenda 1907, Nr. 1.
6) Ders., Das Dysenterietoxin, Jena 1907.
7) Drigalski, v., Veröff. a. d. G. d. Militärsanitätswesens 1902, Heft 20.
8) Flexner und Sweet, Journ. of experim. med. 1906, Vol. VIII, Nr. 4.
9) Kolle und Hetsch, Experim. Bakteriologie, Berlin 1906.
10) Kraus, Monatsschrift für Gesundheitspflege 1904, Nr. 11.
11) Kraus und Doerr, Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 42.
12) Dies., Zeitschr. für Hygiene und Infektion. 1906, Bd. LV.
13) Kruse, Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 40 und 1901, Nr. 23.
14) Lüdke, Centralblatt für Bakt. 1905, Heft 3 ff.
15) Madsen, Zeitschr. für Hygiene 1894.
16) Meyer, H., Roßbachs pharmak. Unters. 1882.
17) Morgenroth, Festschr. z. Einw. d. path. Inst., Berlin 1906.
18) Morgenroth und Pane, Biochemische Zeitschr. 1906.
19) Müller, Centralblatt für Bakt. 1902, Nr. 12.
20) Neisser und Shiga, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 4.
21) Rosenthal, Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 7.
22) Todd, Brit. med Journal, Dezember 1903.
23) Ders., Journal of Hygiene 1904, Vol. IV.
24) Vaillard et Dopter, Ann. de l'Institut Pasteur 1903.
25) Dopter, ebenda 1905.

Erklärung der Abbildungen auf Tafel I.

Die Fig. 1—5 zeigen die aufeinanderfolgenden Stadien der experimentellen Kaninchentyphlitis, hervorgerufen durch die intravenöse Injektion von Dysenterietoxin. Die Objekte stammen von unmittelbar nach dem Tode sezierten Tieren und wurden sofort in Kayserlingscher Flüssigkeit konserviert. Die Reproduktionen sind nach kolorierten Photogrammen angefertigt.

Fig. 1. Coecum eines Kaninchens, das 1,0 Toxin intrav. erhalten hatte und nach 18 Stunden verendet war. Das Ödem ist zum Teil abgeronnen, so daß die starken blasenartigen Vorwölbungen nicht mehr so deutlich zum Ausdruck kommen. Die Faltenkämme sind geschwollen, hämorrhagisch infarziert.

Fig. 2. Coecum eines Kaninchen (0,5 Toxin intrav. † in 24 Stunden). Ödem weniger hochgradig, totale hämorrhagische Infarzierung der Schleimhaut, erster Beginn der Epithelnekrose in Form grauer Schleier auf den Faltenkämmen.

Fig. 3. Coecum eines Kaninchens (1,0 Toxin, verendet nach 24 Stunden). Lineare Nekrosen auf den Faltenkämmen.

Fig. 4. Kaninchencoecum (0,05 Toxin, Exitus nach 5 Tagen), starre, grüne Schorfe, oben normale Appendixschleimhaut, zwei violette submuköse Blutergüsse und polypös vorgewölbte normale, graugelbe Schleimhautinseln. Reichlich braunes Pigment von früheren Hämorrhagien stammend.

Fig. 5. Kaninchencoecum (0,01 Toxin, Exitus nach 7 Tagen). Faltenkämme weißlich (am Objekt sehnig glänzend), submuköse Hämatome (violett), polypöse Inseln normaler Schleimhaut.

Die Fig. 6—8 stellen mit Hämalaun-Eosin gefärbte Paraffinschnitte dar, gezeichnet bei schwacher Vergrößerung (Reichert, Obj. 2, Okular 4).

Fig. 6. Stadium der hämorrhagischen Infarzierung.

Fig. 7. Stadium des reinen Ödems.

Fig. 8. Demarkation der nekrotischen Faltenkämme und Hypertrophie der angrenzenden normalen Schleimhaut.

1.

5.

6.

8.

VII.

Das Rauschbrandgift.

Von

R. Graßberger und A. Schattenfroh

in Wien.

A. Einleitung.

Die Forschungen über die Rauschbrandkrankheit haben auch nach der gelungenen Rein-Isolierung des Rauschbrandbazillus viele Jahre lang in Hinsicht auf die Pathogenese des Krankheitsprozesses wenig Neues gebracht.

Die naheliegende Vermutung, daß den stürmisch auftretenden Krankheitssymptomen die Wirkung eines von den Rauschbrandbazillen im Tierkörper gebildeten Giftes zugrunde liegt, hat zwar einige Forscher zu Untersuchungen bezüglich des Nachweises von Giften in Kulturen angeregt, doch gelang es weder Dünschmann, noch Leclainche und Vallée, die sich am intensivsten mit der Frage der Giftbildung befaßten, einwandfreie Resultate zu erzielen. Sie kamen, von Vermutungen ausgehend, nicht viel über Vermutungen hinaus. Die Giftwirkung der von diesen Autoren dargestellten Kulturfiltrate war so schwach, daß ihnen durchwegs die Möglichkeit fehlte, das Spezifische des „Rauschbrandgiftes" von den Wirkungen der nichtspezifischen Bestandteile ihrer Lösungen scharf zu trennen.

Der seither vollzogene Fortschritt in der vorliegenden Frage hängt aufs engste mit der Gewinnung hochwirksamer Giftlösungen zusammen, die den Verfassern dieser Abhandlung im Jahre 1902 gelang.

Die Schwierigkeiten, die hierbei zu überwinden waren, stellen einen interessanten Einzelfall in der bakteriologischen Toxikologie vor, insofern sie sich nicht auf ein einziges Problem beschränken, sondern auf verschiedenen Gebieten liegen. Wir weisen an dieser Stelle vor allem auf die bei unseren Studien ermittelte Tatsache hin, daß die Giftbildung des Rauschbrandbazillus in Kulturen keineswegs bloß von der Zusammensetzung des Nährbodens und der Auswahl des Originalmaterials für die Isolierung des zur Giftproduktion bestimmten Rauschbrandbazillenstammes abhängt. Es zeigt sich vielmehr, daß es hierbei ganz wesentlich auf Eigenschaften der Reinkultur ankommt, die wir seinerzeit mit dem Terminus „Zustand" bezeichneten.

Zum näheren Verständnis dieser Bezeichnung erscheint es geboten, auf die Ergebnisse der langjährigen Untersuchungen kurz einzugehen,

die von uns hinsichtlich der Stellung des Rauschbrandbazillus im natürlichen Verwandtschaftssystem der Bakterien angestellt und zum größten Teil bereits in verschiedenen Arbeiten mitgeteilt worden sind.

Der „Rauschbrandbazillus“ gehört nach unseren Feststellungen der ungemein weitverbreiteten Gruppe jener anaeroben Bakterien an, denen gemeinsam die Fähigkeit zukommt, unter bestimmten Umständen Kohlehydrate (Stärke, Zucker) in eine mehr oder minder stürmisch ablaufende Gärung zu versetzen, wobei neben anderen Produkten in größerer Menge Buttersäure gebildet wird.

Eine strenge Abgrenzung dieser „Buttersäurebakterien“ läßt sich keineswegs stets mit Sicherheit durchführen, indem die Möglichkeit einer übersichtlichen Darstellung dieser Bakteriengruppe vor allem an dem Umstande scheitert, daß die zur Bezeichnung des gemeinsamen Charakters verwendete Eigenschaft der Buttersäuregärung bei den einzelnen Vertretern der Gruppe nicht unter allen Umständen in Erscheinung tritt. Wir wissen nämlich, daß einzelne Angehörige der Gruppe unter bestimmten Bedingungen trotz reichlicher Anwesenheit von Zucker, trotz intensiver Vermehrung und Gärung als Hauptprodukt der Gärungssäuren nicht Buttersäure, sondern Milchsäure bilden.

Weist schon diese Tatsache auf eine bei manchen Vertretern der Gruppe vorhandene ausgesprochene Variabilität hin, so tritt diese ebenso zutage, wenn wir die morphologischen Eigenschaften der Buttersäurebakterien in Betracht ziehen.

Wir unterscheiden unter den Buttersäurebakterien drei verschiedene Typen, deren Eigenheiten im folgenden kurz beschrieben werden sollen.

I.

Zu diesem Typus gehören Buttersäurebakterienarten, welche unter den verschiedensten Bedingungen einen bestimmten, wenig variablen Zustand zeigen, der durch viele Generationen unverändert bewahrt wird. Diese Bakterienarten zeigen eine ausgesprochene Tendenz, bei Anwesenheit von Zucker große Mengen von Buttersäure zu bilden, sie sind beweglich, sporulieren und verlieren auch bei lang fortgesetzter Züchtung auf zuckerhaltigen Nährböden diese Eigenheiten niemals dauernd.

Die Versporung geht bei Gegenwart von Zucker stets mit reichlicher Bildung von Granulose enthaltenden Klostridien und Zwischenformen vor sich.

Vertreter dieses Typus sind von Gruber als Amylobakter, von Beyerinck als Granulobakter saccharobutyric., von v. Klecki als Bazillus saccharobutyric., von uns als „beweglicher Buttersäurebazillus“ beschrieben worden.

Die hier eingereihten verschiedenen Bakterienarten sind exquisite Kohlehydratvergärer, sie sind an zuckereiche Nährböden verhältnismäßig gut angepaßt. Dies geht einmal aus dem oben mitgeteilten Umstand hervor, daß sie in zuckerhaltigen Nährböden ihre Beweglichkeit und Versporungsfähigkeit nicht einbüßen, sondern nur insoweit alteriert werden, als die Versporung häufig abnorm (Einlagerung von Granulose) verläuft, weiters aus der Tatsache, daß sie sämtlich nur schwache Eiweißzersetzer sind. Sie peptonisieren auch den Leim nicht.

II.

Stellen die unter I genannten Arten die eine Grenze der Reihe dar, so finden wir im anderen Extrem einen Bakterientypus, der am

besten durch den von Bienstock beschriebenen Bacillus putrificus repräsentiert wird.

Hier handelt es sich um Bakterienarten, die in erster Linie exquisite Eiweißzersetzer sind, die aber auch den Zucker, wenn er in den Nährböden vorhanden ist, intensiv vergären und hierbei unter Umständen beträchtliche Mengen von Buttersäure bilden. Es entsteht hierbei weiters stets Äthylalkohol. Charakteristisch für diese Bakterien ist es, daß Beweglichkeit und Sporulation auch durch wiederholte Züchtungsfolgen auf stark zuckerhaltigen Nährböden nicht in Verlust gehen. Dabei ist im Gegensatz zu den Vertretern des Typus I die Neigung zum Auftreten von Granulose eine sehr geringe. Die Spore tritt am Ende des Stäbchens auf und bleibt in dieser Lage bis zur Reife. Energische Fähigkeit der Eiweißzersetzung und ausgesprochene Unempfindlichkeit gegenüber dem Einfluß des Zuckers bezüglich Verringerung der Sporulierung oder abnormen Ablaufes derselben (siehe Typus I) charakterisieren demnach die Vertreter dieses Typus. (Von uns seinerzeit „fäulniserregender Buttersäurebazillus“ genannt*).

III.

Ein dritter Typus wird von Bakterienarten gebildet, die durch eine ausgesprochene Variabilität, durch das Bestehen verschiedener Zustände sowie durch eine unverkennbare Empfindlichkeit gegenüber dem Zucker ausgezeichnet sind.

Das wesentliche dieses Typus und seine Beziehungen zum Typus I und II werden am besten klar zu machen sein, wenn wir uns an den für die vorliegende Abhandlung wichtigsten Vertreter der Gruppe, den Rauschbrandbazillus halten. Wir haben hierbei den Vorteil, daß wir unter Einem auch die für die Frage der Giftbildung nötige Charakteristik des Rauschbrandbazillus erledigen.

Versuchen wir es, den originären Zustand, welchen der Rauschbrandbazillus im rauschbrandkranken Tier aufweist, zu definieren, so können wir diesen am besten als „labil“ bezeichnen, insofern, als die primären Kulturen, wie sie besonders bei unmittelbarer Aussaat auf zuckerhaltige Nährböden zur Entwicklung gelangen, in hohem Maße die Neigung zeigen, derart zu entarten, daß die Individuen bei Weiterübertragung auf verschiedene Nährböden Beweglichkeit und Sporulation einbüßen.

Diese „denaturierten“ Rauschbrandbazillen, die unter Umständen ihre neuen Eigentümlichkeiten bei weiterer Kulturfolge hartnäckig bewahren, stellen auffallend dicke, plumpe Stäbchen dar, welche sich in chemisch-biologischer, sowie morphologischer Hinsicht vielfach völlig wie der von Fraenkel beschriebene unbewegliche Gasphlegmonebazillus, bezw. der von uns seinerzeit beschriebene unbewegliche Buttersäurebazillus, der als „Zustand“ gleichfalls in der Gruppe III seinen Platz zu finden hat, verhalten.

Unsere seinerzeit aufgestellte Behauptung, daß es sich bei den letztgenannten Bakterienarten nur um „denaturierte“ Zustände von polymorphen beweglichen Buttersäurebazillen vom Rauschbrandtypus handle, ist inzwischen durch Arbeiten im Institute vollständig bestätigt worden.

*) Der Ödembazillus steht diesem Typus nahe, wird aber durch Zucker hinsichtlich des Ablaufes der Sporulierung in höherem Grade alteriert.

Es hat sich nämlich herausgestellt, daß bei jedem einzelnen Stamme dieser unbeweglichen Bakterien (einschl. der Fraenkelschen Bazillen) durch Passage über erhitztes Serum oder (im Druck) erhitzten Ei-Nährboden das Wiederauftreten von Sporen und eine ausgesprochene Beweglichkeit hervorgerufen werden können. Damit soll nun freilich nicht gesagt werden, daß Rauschbrandbazillen und Gasphlegmonebazillen miteinander identisch sind (hiergegen spricht ja die charakteristische Toxinbildung und anderes), aber alle die genannten Bakterienarten gehören in eine Gruppe von Buttersäurebazillen, deren Eigenart durch das Vorkommen von asporogenen, unbeweglichen Zuständen gekennzeichnet ist.

Ohne auf die weiteren Einzelheiten näher einzugehen, wollen wir hier nur hervorheben, daß die Vertreter dieses Typus auch in ihren beweglichen Zuständen eine ausgeprägte Polymorphie, bezw. einen ausgeprägten Polychemismus aufweisen, indem sie je nach Art der Züchtungsbedingungen und Züchtungsfolgen in einem Falle Kulturen liefern, die durch energische Eiweißzersetzung und vorwiegend endständiges Auftreten der Spore zum Typus II überleiten, im anderen Falle zu Generationen führen, die durch reichliche Buttersäurebildung und durch das Auftreten von typischen granulosereichen Klostridien ihre Verwandtschaft zum Typus I verraten*), wobei im Einzelfalle die Überführbarkeit der verschiedenen Zustände ineinander und die Tendenz, bei länger fortgesetzter gleichartiger Züchtung unter Verlust der Variationsbreite in einen bestimmten Zustand überzugehen, in hohem Grade wechseln. Genauere Angaben sind in unseren Arbeiten im Archiv für Hygiene enthalten.

Es handelt sich also, um die charakteristischen Eigenheiten des Typus III der Buttersäurebakterien zusammenzufassen, um folgendes:

Dem genannten Typus gehören eine Anzahl von anaeroben Bakterien an, die zwischen Buttersäuregärung und energischer Eiweißzersetzung schwanken. Im Zustand der Buttersäuregärung gleichen die Vertreter des Typus III in morphologischer und chemisch-biologischer Hinsicht dem Typus I. Sie bilden hierbei reichliche Mengen von Granulose, typische und atypische Klostridien.

In diesem Zustand zeigen die Angehörigen des Typus III im Gegensatz zu jenen des Typus I die ausgesprochene Neigung, unter verschiedenen Einflüssen, speziell solchen, die zu üppiger Vermehrung disponieren (Zuckerzusatz wirkt hier vor allem in diesem Sinne), Beweglichkeit und Sporulationsfähigkeit dauernd und erblich zu verlieren (Denaturierung).

Für die Frage der Giftbildung ist nun die Labilität des originären Zustandes der Rauschbrandbazillen insofern interessant, als nach unseren Beobachtungen gerade die „Übergangsformen“ sehr geeignet erscheinen, in entsprechenden Nährböden Gifte zu produzieren, während die originären Zustände selbst zwar hohe Virulenz aufweisen, aber sehr häufig kein Toxin bilden.

Es besteht demnach — wir werden später noch auf die Bedeutung dieses Umstandes zurückkommen — ein gewisser Gegensatz zwischen maximaler Virulenz und maximaler Toxinproduktion.

---

*) Diese Klostridiengenerationen gehen häufig unmittelbar in die unbeweglichen asporogenen Generationen über.

Die französischen Autoren ließen sich bei ihren Versuchen, die auf Giftgewinnung zielten, offenbar von der Vorstellung leiten, daß umso eher eine Giftproduktion zu erwarten sei, je virulenter die zur Aussaat verwendeten Rauschbrandbazillenkulturen seien.

Sie verwenden Nährböden, die den Rauschbrandbazillus erfahrungsgemäß zu energischer Eiweißzersetzung anregen und recht geeignet erscheinen, um eine gegebene Virulenz der Aussaatkeime unverändert fortbestehen zu lassen. Unsere Untersuchungen zeigen nun, daß unter diesen Umständen von einer nennenswerten Giftproduktion nicht die Rede ist.

Wir haben anläßlich zahlreicher Versuchsreihen Kulturen originärer Rauschbrandbazillen auf sterilem Fleisch, bezw. Bouillon mit sterilem Fleisch, ohne Zuckerzusatz angelegt und bezüglich der Giftproduktion keine befriedigenden Resultate erhalten.

Andererseits ist zu betonen, daß auch durch Überimpfung von Original-Rauschbrandsaft, der originäre Rauschbrandbazillen in reinem Zustande enthält, in Zuckerbouillon keineswegs sicher toxinbildende Generationen zur Entwicklung gebracht werden können, wenn dies auch gelegentlich der Fall ist.

B. Gewinnung giftiger Kulturen.

Der gangbarste Weg, um zu einem Kulturmaterial zu gelangen, das mit Sicherheit hochwirksame Filtrate zu liefern imstande ist, führt nach unseren Erfahrungen über eine Methode, bei welcher das anaerobe Plattenverfahren eine wesentliche Rolle spielt.

Das Verfahren ist folgendes:

Wir gießen unter Verwendung von getrocknetem Rauschbrandfleisch oder Lebendsaft von rauschbrandkranken Tieren Zuckeragarplatten, eventuell unter Zuhilfenahme von sterilem Rindermuskel, der sich, in kleinen Stückchen in die noch flüssige Zuckeragarplatte versenkt, als eminent wachstumbefördernde Hilfssubstanz bewährt hat.

Auf diesen streng anaerob gehaltenen Zuckeragarplatten zeigt sich nach 24 stündigem Aufenthalt bei Bruttemperatur ein sehr auffälliger Unterschied im Aussehen der Kolonien, auch wenn ein Material zur Verwendung gelangte, das ausschließlich Rauschbrandbazillen enthielt.

Binnenkolonien mit haarförmig verfilzter Grundmasse und Ausläufern, Oberflächenrasen, die zart sind und unregelmäßige, zum Teil fingerförmig gelappte Ränder haben, repräsentieren den nicht denaturierten Typus der Rauschbrandbazillen, wetzsteinförmige Binnenkolonien und kreisrunde, üppigere, perlmutterartig glänzende, konzentrisch gewellte Oberflächenkolonien stellen den denaturierten Typus der Rauschbrandbazillen dar. Während in den erstgenannten tiefen Kolonien das Auftreten beweglicher Stäbchen und spindelförmiger Exemplare mit Granuloseeinlagerung zur Regel gehört, zeigen die Kolonien der zweiten Art dicke, unbewegliche Bazillen, oft vom Typus der Gasphlegmonebazillen. Daß diese in den primären Zuckeragarplatten enthaltenen denaturierten Stäbchen meist nicht als völlig denaturiert anzusehen sind, erkennt man daran, daß Abimpfungen auf entsprechende Nährböden zum Wiedererscheinen sporulierender Formen führen. Wir erhalten so, wenn wir z. B. von den primären Kolonien auf sterilen Muskel impfen, der in Kreide-Zuckerbouillon versenkt ist, nach Einschließen der Eprouvette in das Buchnerohr, Sporen (2—3 Tage Aufenthalt im Brutschrank). In anderen Fällen gibt die Reihenfolge: primäre Kolonien, Agarstich, Zucker-

bouillonkolben mit Kreide zum Entstehen von sporulierenden Exemplaren im Stadium der Nachgärung (5—8—14 Tage) Veranlassung.

Charakteristisch für das auf die eine oder andere Weise erhaltene und durch scharfes Trocknen konservierte Sporenmaterial ist nun folgendes:

1. Die Sporen sind in ihrer Eigenart anscheinend viele Jahre lang haltbar. (Am besten geschieht die Konservierung in der Weise, daß der Kreideschlamm der Kulturen im Vakuum über Schwefelsäure scharf getrocknet wird.)

2. Übertragen von solchem Sporenmaterial in Bouillon mit Kreide und Zucker (eventuell Milchsäure s. sp.) führt bei anaerober Züchtung zur Entwicklung einer stürmisch gärenden Generation, mit Übergangsformen zwischen denaturiertem und nicht denaturiertem Typus. Granulose tritt entweder primär in großen Mengen, unter Bildung typischer oder atypischer Klostridien auf, oder im Verlaufe einer deutlich abgegrenzten langandauernden Nachgärung, wobei viel jodfleckig färbbare Ketten oder Scheinfäden entstehen.

Ausgangsmaterial, Auslese bei der Abnahme von Kolonien aus der Original-Zuckeragarplatte sind für die feineren Unterschiede bezüglich der Eigenheiten des Sporenmaterials entscheidend.

3. Die sub 2 geschilderten, mit dem Sporenmaterial geimpften Kulturen entwickeln reichlich Rauschbrandgift.

Es ist somit durch die Überführung eines Übergangszustandes in Sporulation gelungen, ein haltbares Material in die Hände zu bekommen, mit dessen Hilfe jederzeit beliebige Mengen von Giftlösungen erzengt werden können.

Daß es sich bei dieser ganzen Reihenfolge der Vorbereitung nicht um Zufälligkeiten, sondern um eine gesetzmäßig ablaufende biochemische Alteration der Bakterien handelt, die aber oft genug schon im rauschbrandkranken Tier eingeleitet ist (Vorkommen von Toxin im Lebendsaft!) dies geht ebensosehr aus der Tatsache, daß wir auf dem angegebenen Wege nicht nur bei einem Rauschbrandmaterial, sondern bei jedem eingehender untersuchten (hierunter ein Material aus Bayern, eines aus Niederösterreich, eines aus Amerika) zum Ziele gelangten, wie auch aus dem negativen Ausfall der Bemühungen hervor, ohne Zuhilfenahme einer Überleitung in den zuckervergärenden Zustand zur Gewinnung stark wirksamer Giftlösungen zu gelangen.

Zieht man das theoretisch wichtige der Situation in Betracht, so zeigt sich also, daß die Toxinbildung als vorübergehende Phase einer Stoffwechseländerung auftritt, welche vom originären vollvirulenten Zustand zur typischen Buttersäuregärung führt. Einige Worte mögen andeuten, wie sehr der vorliegende Fall geeignet sein dürfte, an verschiedenen Stellen Angriffspunkte für eine Verfolgung des chemisch-biologischen Charakters der Sekretion von Bakterientoxinen zu bieten. Wir möchten diesbezüglich zunächt auf folgende Beobachtung hinweisen. In manchen Fällen verläuft, wie oben angedeutet, die Gärung in solchen Giftkolben deutlich in zwei getrennten Phasen. Wir finden eine Hauptgärung, bei welcher aus dem vorhanden Zucker vor allem Milchsäure gebildet wird und eine Nachgärung, bei welcher die Milchsäure zu Buttersäure und Propionsäure vergoren wird. Beide Phasen zeigen häufig differente morphologische Bilder. Die Toxinbildung fällt mit der zweiten Phase zusammen.

Man hat den Eindruck, daß es sich bei der Toxinsekretion um die Ausscheidung einer (phylogenetisch betrachtet) früher endocellulär angehäuften Substanz handelt, die bei bestimmten Übergangszuständen zwar im Zusammenhang mit der nahen erblichen Abkunft von originären Zuständen noch andauernd erzeugt wird, aber andererseits infolge einer bereits eingeleiteten Änderung des Zellchemismus massenhaft als wertloses oder überflüssiges Material ausgeschieden wird.

Der Gedanke, daß Bildung und Ausscheidung dieser Substanz mit jenem Teil des Zell-Chemismus zusammenhängen, der in den Extremen mit den Schlagworten „Eiweißzersetzung im Sinne der Fäulnis“, „Kohlehydratvergärung im Sinne der Buttersäuregärung“ in Erinnerung gerufen wird, ist nicht von der Hand zu weisen. Man könnte daran denken, daß es sich bei der Toxinproduktion um die Ausscheidung irgend eines Körpers handelt, der zu den endozellulären Fermenten in Beziehung steht. Bei dem Umstand, daß wir über keine größere Untersuchungsreihe verfügen, welche diese Fragen speziell betrifft, begnügen wir uns mit dem kurzen Hinweis auf den beobachteten Parallelismus der Erscheinungen. Wir möchten aber bei dieser Gelegenheit nicht unterlassen, darauf aufmerksam zu machen, daß der von uns begangene und vorgeschlagene Weg, die Frage der Virulenz und der Toxinbildung nicht nur für sich, sondern im Zusammenhang mit dem übrigen Chemismus zu studieren, wohl etwas mehr Beachtung verdienen würde, als ihm bisher in der Regel zuteil geworden ist.

Wir wenden uns wieder der Technik der Giftgewinnung zu und wollen bei dem Umstand, als anderen Forschern trotz unserer ausführlichen Mitteilungen die Gewinnung hochwirksamer Rauschbrandgiftlösungen anscheinend bisher nicht gelungen ist, die Technik der Giftbereitung etwas eingehender schildern.

I. Ausgangsmaterial und Vorkulturen.

In dieser Beziehung ist zum Teil bereits oben das nötige mitgeteilt.

Von dem Sporenmaterial (getrockneter Kreideschlamm) wird ein Röhrchen, welches ein haselnußgroßes Stückchen sterilen Fleisches enthält, geimpft, das Röhrchen dann mit frisch ausgekochter heißer Zuckerbouillon übergossen, worauf es im Buchnerrohre verschlossen und durch 24 Stunden bei 37° C gehalten wird.

II. Nährboden für die Giftgewinnung.

A. 10 g Pepton,
5 g Kochsalz,
5 g Liebigscher Fleischextrakt,
in 1000 g Brunnenwasser gelöst, gekocht, neutralisiert (nicht filtriert), je 750 g von der Mischung in (1 Liter) Erlenmeyerkolben gefüllt. An vier aufeinanderfolgenden Tagen je $^3/_4$ Stunden im Dampftopf erhitzt.

B. 50 g Stärkezucker oder gereinigte Dextrose,
50 g Wasser
in einem Erlenmeyerkolben bei drei Atmosphären $^3/_4$ Stunden sterilisiert, dann aufbewahrt.

Zu einem Erlenmeyerkolben mit 750 ccm der in A) beschriebenen Flüssigkeit werden 50 ccm der Zuckerlösung gegeben, dann wird eine reichliche Menge dickflüssiger, im Drucktopf sterilisierter Schlemmkreide hinzugefügt. Nun wird eine Stunde im Dampftopf sterilisiert, hieraur

wird eine 3 cm hohe Schicht von bei 4 Atmosphären sterilisiertem Paraffinum liquidum einfließen gelassen, nochmals $^1/_2$ Stunde sterilisiert und rasch durch Einstellen in Wasser auf ca. 37° abgekühlt. Hierauf wird aus dem Röhrchen, das die lebhaft gärende 24stündige Vorkultur enthält, die gesamte Flüssigkeit übertragen.

III. Behandlung der geimpften Nährböden.

Die derart mit Massenkultur beschickten Kolben werden im Brutschrank verwahrt. Sie zeigen sehr häufig bereits nach 12 Stunden eine kräftig einsetzende Gärung. Im Laufe der folgenden Tage wird täglich zwei bis dreimal durch ruckweises Drehen der am Boden sitzende Kreideschlamm aufgewirbelt, wobei reichlich Schaum aufsteigt und Gasblasen entweichen.

Was den Zeitpunkt des Auftretens von reichlichen Mengen von Rauschbrandgift in den Gärkolben betrifft, so richtet sich dieser nach dem verwendeten Sporenmaterial. Man kann sich, wenn man das Material einmal kennt, recht sicher auf das prompte Eintreten der Giftbildung verlassen. Wir verfügen beispielsweise über ein Sporenmaterial, bei dessen Verwendung nach achttägigem Aufenthalt der Kolben im Brutschrank sich zuverlässig maximale Giftbildung erreichen läßt.

Es empfiehlt sich nicht, die Kolben länger als nötig im Brutschrank zu belassen, da unter diesen Umständen gelegentlich Gift zerstört wird. Einen gewissen Maßstab gibt der Ablauf der Gärung. Auch dort, wo die Trennung zwischen Haupt- und Nachgärung nicht scharf ausgesprochen ist, zeigt sich oft nach den ersten zwei bis drei Tagen eine auffällige Steigerung der Schaumbildung. Wird die Gasentwicklung in weiteren fünf bis sechs Tagen auffallend gering, so bricht man die Züchtung ab und hebt die Kolben bis zur Verwendung im Kühlschrank auf, nachdem man einige Kubikzentimeter Chloroform hinzuzugeben hat. Nach vielen Erfahrungen behalten die Kulturen unter diesen Umständen durch 8 bis 10 Wochen und länger ihre volle Giftigkeit.

C. Filtration der Kulturen.

Man kann sich, nachdem man einmal im Besitze von solchen ausgegorenen Reinkulturkolben ist, jederzeit rasch davon überzeugen, daß diese Kulturen sehr wirksame Giftstoffe enthalten.

Es genügt hierzu, eine geringe Menge der Flüssigkeit mit der Pipette herauszuheben, über mehrfach gefaltetes Filtrierpapier zu filtrieren oder scharf zu zentrifugieren und nunmehr von der klaren Flüssigkeit ein oder mehrere Hundertel ccm einem Kaninchen in die Ohrvene zu injizieren. Bei dem Umstand, als bei dieser Versuchsanordnung trotz der eventuell vorhandenen Sporen eine Infektion nicht in Betracht kommen kann, ist aus dem wenige Stunden später erfolgenden Tod des Tieres mit Sicherheit auf die Anwesenheit von gelösten Giften zu schließen.

Zu einer Verwendung der Giftlösungen für exakte Versuche, besonders für solche, die an Tieren (Rinder, Meerschweinchen usw.) die für die Rauschbrandinfektion hochempfänglich sind, angestellt werden sollen, eignen sich aber aus begreiflichen Gründen nur vollkommen keimfrei filtrierte Lösungen.

In einer großen Anzahl von Versuchen konnten wir nun feststellen, daß das Rauschbrandgift beim Filtrieren durch die gewöhnlichen festen

Bakterienfilter mehr oder minder stark in dem Filtermaterial zurückgehalten wird. Filtrieren durch Delphinfilter schwächt die Wirksamkeit der Giftlösungen um ein mehrfaches, durch Chamberland- und Berkefeldfilter um ein vielfaches ab. Wir waren deshalb gezwungen, für die Filtration unserer giftigen Kulturen ein besonderes Verfahren auszuarbeiten, das im nachfolgenden kurz beschrieben werden soll. Vielleicht findet der eine oder andere Forscher Gelegenheit, in besonderen Fällen bei der Filtration von Bakterienkulturen, deren wirksame Substanzen durch feste Filter zurückgehalten werden, das Verfahren zur Anwendung zu bringen.

In unserem speziellen Fall gestaltet sich das Verfahren folgendermaßen.

Die Giftkolben werden aus dem Eisschrank genommen, der flüssige Inhalt, der über dem kreidigen Bodensatz steht, in einen Scheidetrichter geleert, worauf nach kurzer Zeit durch Öffnen des Hahnes die wässerige Flüssigkeit abgelassen und vom Paraffin getrennt werden kann.

Die stark trübe Lösung wird nun mit reichlichen Mengen von sterilisierter, fein gepulverter Kreide versetzt, durch Schwenken des Kolbens gut vermischt und auf einen Trichter gebracht, der mit doppeltem Faltenfilter versehen ist.

Das rasch abfließende Filtrat wird nochmals mit trockener Kreide vermischt und wieder über Papier filtriert.

Die derart vorgenommene Vorfiltration dient dazu, den größten Teil der suspendierten Bestandteile zu entfernen, so daß eine zu starke Verlegung der Filterporen bei der nachfolgenden exakten Filtration (wodurch die Ergiebigkeit stark herabgedrückt würde) vermieden wird.

Das exakte Filter, das zur vollständigen Befreiung der Giftlösung von Sporen und vegetativen Stäbchen dient, wird in folgender Weise bereitet:

Ein Glastrichter von etwa 15 cm Durchmesser wird mit einem locker gedrehten, aber gut anliegendem Wattepfropf versehen, der von oben so weit eingeschoben wird, daß er etwa 2 cm in den weiten Teil, 2 cm in den Hals hineinragt.

Der Trichter wird von außen am Übergang zwischen Hals und weitem Teil mit mehreren Lagen von Watte umwickelt, und in den Hals eines großen Erlenmeyerkolben mit Hilfe dieser groben Wattedichtung eingeschoben; hierauf wird ein Blechdeckel aufgesetzt und die gesamte Vorrichtung bei 160° C sterilisiert.

Will man die Filtration vornehmen, so übergießt man in einem besonderen $^1/_4$ Liter-Kölbchen mit weitem Hals vorrätig gehaltene trockene sterilisierte Schlemmkreide (40—50 g) mit gut ausgekochtem, noch siedend heißem Wasser so lange, bis unter beständigem Umschwenken die Masse dickflüssig geworden ist und leert nun den Kreidebrei unter Führung eines Glasstabes in den mit Watte montierten Trichter. Der mit siedendem Wasser angefeuchtete Wattepfropf wirkt als Stützkörper für den Kreidebrei. Nach dem rasch erfolgenden Abfliessen des überschüssigen heißen Wassers bleibt in dem Trichter eine beim Hin- und Herneigen des Trichters nicht mehr bewegliche Kreidemasse mit glatter Oberfläche zurück. Man legt nun, um die Decke des halbfesten Filters gegen Stöße zu schützen, auf die Oberfläche ein kreisrundes Stück sterilisierten Filtrierpapiers, das sich sofort unter Benetzung gleichmäßig glatt ausbreitet. Das Filter ist nun gebrauchsfertig.

Man läßt aus einem Trichter mit engem Abfluß anfangs in Tropfen, dann in dünnem Strahl die vorfiltrierte Lösung auf das Filter fließen.

Nachdem einige 50 ccm Filtrat durch das Filter hindurchgegangen sind, wechselt man den Auffangkolben, um die Giftlösung nicht mit dem Wasser, das im Kreidefilter eingeschlossen ist und zunächst zum Abfluß kommt, zu verdünnen.

Nun überläßt man die Filtration sich selbst. Bei richtig durchgeführter Herstellung des Filters gewinnt man in 12—24 Stunden bis zu $^3/_4$ Liter Filtrat.

Da die Bereitung sehr einfach ist und das Verfahren, abgesehen von der Anschaffung der Glasgefässe, nur sehr geringe Kosten verursacht, empfiehlt es sich, für jeden Kolben ein besonderes Filter in Gebrauch zu nehmen.

Wir haben mit diesem Verfahren zunächst eine Anzahl von Vorversuchen angestellt, die zeigten, daß Prodigiosusbazillen, Heubazillensporen, Milzbrandsporen, Bact. coli, die man in Kochsalzlösung aufschwemmt und so aufs Filter bringt, vollständig zurückgehalten werden.

Weitere Versuche, die mit denselben Bakterien angestellt wurden, nachdem sie in Nährbouillon eingebracht waren, zeigten folgendes Verhalten:

Es gelingt mit unserem Verfahren nicht, frische Nährbouillon, die Mikroorganismen (Sporen oder vegetative Formen) enthält, keimfrei zu filtrieren, da besonders bei höherer Temperatur ein rasches Durchwachsen der Bakterien durchs Filter zu beobachten ist.

Ausnahmslos aber erzielt man vollständig keimfreie Filtration, wenn man ältere Bouillonkulturen filtriert, in denen die Vermehrungsfähigkeit stark vermindert bez. erloschen ist. Ebenso genügt schwaches Schütteln mit Chloroform vor der Filtration, um auch bei solchen Aufschwemmungen von Mikroorganismen, die hierdurch nicht sterilisiert werden, — Milzbrandsporen, Heubazillensporen u. a., die schädigende Wirkung des Durchwachsens vollkommen auszuschalten, wie Aussaaten von mehreren ccm des Filtrats in feste und flüssige Nährböden bezeugten. Es sei hier angeführt, daß die Aufschwemmungen in diesen Kontrollversuchen mit und ohne vorhergegangene Vorfiltration aufs Filter gebracht wurden.

Setzten wir demnach den ausgegohrenen chloroformierten Rauschbrandgiftlösungen nach der Vorfiltration Testsporen zu, so erwies sich das Filtrat als keimfrei. Wir weisen außerdem darauf hin, daß auch — mit negativem Ergebnisse — auf das Vorhandensein von Rauschbrandsporen im Filtrat geprüft wurde, indem mehrere ccm in Röhrchen mit Zuckerbouillon und sterilem Muskel gebracht und im Buchnerverschluß bebrütet wurden.

Bei der Frage, ob sich das Verfahren auch zur Filtration anderer Giftlösungen eignet, ist in Erwägung zu ziehen, daß unter Umständen durch den für die Filtration nötigen Kreidezusatz Fällungen schwer löslicher Kalksalze entstehen könnten, die vielleicht zu einem Mitausfallen von Giftstoffen führen, ein Umstand, der in unserem Falle, da ja den Gärkolben von vornherein ein großer Überschuß von Kreide zugesetzt wird, nicht in Betracht kommt.

Im übrigen haben wir in zahlreichen Versuchen feststellen können, daß von allen möglichen pulverförmigen Substanzen sich zur Herstellung des „halbfesten" Filters die Kreide weitaus am besten eignet (wenigstens besser als Schwerspat, Bimsstein und kohlensaure Magnesia).

D. Eigenschaften der keimfreien Giftlösungen.

Nach unseren Untersuchungen scheint das Rauschbrandgift für alle Warmblüter wirksam zu sein. Bei subkutaner Injektion der Giftlösung erweist sich die Empfindlichkeit, berechnet auf das Kilogramm Körpergewicht, annähernd gleich groß bei Rindern, Schafen, Meerschweinchen, Kaninchen, Affen, Hunden, Igeln, Mäusen, Hühnern, Tauben. Kaltblütern gegenüber ist das Gift unwirksam.

Wir beschreiben zunächst kurz die Erscheinungen, welche nach subkutaner Injektion der Giftlösung bei Meerschweinchen auftreten, da diese Tiere für die weiteren Studien bezüglich des Verhaltens von Gift und Gegengift in ausgedehntem Maße Verwendung fanden.

Bereits wenige Stunden nach der Injektion der einfach tödlichen Dosis entwickelt sich in der Umgebung der Injektionsstelle eine schmerzhafte teigige oder pralle Schwellung, die sich 8—10 Stunden später weit ausgebreitet hat. Hierbei kommt es frühzeitig zum Auftreten von Hämorrhagien in der Haut.

Freßlust und Munterkeit nehmen rasch ab. Anfangs besteht eine leichte Steigerung der Körpertemperatur, später sinkt die Temperatur unter das Normale. Die Tiere werden unruhig, ihre Reflexerregbarkeit ist gesteigert. Wenige Stunden vor dem Tode, der in zwei bis vier Tagen nach der Injektion erfolgt, zeigt sich ein blutiger Ausfluß aus Mund und Nase (Lungenödem!).

Bei der Sektion findet man im Unterhautzellgewebe blutiges Ödem, in den Körperhöhlen oft hämorrhagisch gefärbte seröse Flüssigkeit.

Die Lungen sind ödematös, das Herz ist meist dilatiert, die Herzmuskulatur schlaff.

Durch subkutane Injektion multipler tödlicher Dosen kann man die Krankheitsdauer auf sechs bis sieben Stunden abkürzen. Injektion untertödlicher Dosen führt zur Entstehung von Schwellungen, die oft nnter Nekrose und Narbenbildung ausheilen.

Die dosis letalis minima ist bei intraperitonealer Injektion nicht merklich verschoben, wenn auch die Allgemeinerscheinungen rascher eintreten.

Die von uns dargestellten Rauschbrandgiftlösungen stehen in ihrer Wirksamkeit den übrigen bisher bekannten Lösungen echter Bakterientoxine nicht nach. Wir sind jederzeit in der Lage Giftlösungen herzustellen, von welchen 0,002 ccm die für ein Meerschweinchen von 250 g tödliche Dosis darstellen. Bezeichnen wir eine Giftlösung mit der Dosis letalis minima von 0,01 ccm als Normalgiftlösung, so entspricht eine Giftlösung mit der eben genannten D. L. M. von 0,002 ccm einem fünffachen Normalgift. Eine Anzahl von Versuchen wurde auch mit viel stärkeren Giftlösungen, so einer mit einer 20fachen Normalgiftlösung angestellt. Von dieser Lösung waren demnach 0,0005 ccm für Meerschweinchen die D. L. M.

Kaninchen, deren Empfänglichkeit wie erwähnt, bei subkutaner Injektion der Giftlösung auf gleiches Körpergewicht bezogen annähernd ebensogroß ist wie die der Meerschweinchen, lassen bei intravenöser Injektion, bei einer Dosis, die binnen einer Stunde bis zwei bis drei Tagen den Tod der Tiere herbeiführt, bemerkenswerte Erscheinungen erkennen, insofern die D. L. M. bei dieser Art der Einverleibung viel kleiner, andererseits die Inkubationszeit verkürzt ist. Eine bis mehrere Stunden nach der Injektion von Multiplis der tödlichen Minimaldosis

werden die Tiere unruhig, sie verlassen den Käfig, kauern vor demselben, oder durchsetzen in Sprüngen den Raum, bis sie plötzlich von Lähmungen der hinteren Extremitäten befallen werden und unmittelbar daran anschließend unter Schreien und Krämpfen verenden. Auffallend ist die Regelmäßigkeit der Inkubationszeit, je nach der Höhe der injizierten Dosis. Freilich sinkt diese nicht unter eine Stunde, auch nicht bei der 1000fachen D. L. M.

Wenn demnach die französischen Autoren bei Kaninchen und Pferden nach Injektion von Rauschbrandgift die Tiere in wenigen Minuten sterben sahen, so spricht dies sehr für die Annahme, daß sie das echte Rauschbrandtoxin gar nicht in Händen hatten. Nachfolgend bringen wir eine Tabelle über die Ergebnisse der Versuche, bei welchen Kaninchen intravenös mit Giftlösungen behandelt wurden.

a) Verschiedene Dosen einer Normalgiftlösung werden einer Anzahl Kaninchen in die Ohrvene injiziert.

ccm N.-Giftlösung	Befund
7	Das Tier fängt nach 1 Stunde plötzlich an unruhig zu werden, es wirft den Kopf in den Nacken und verendet unter Krämpfen und Schreien. Ergüsse in den Pleuralraum, Herz dilatiert.
1	Dieselben Erscheinungen 1 Stunde nach der Injektion. Ähnlicher Sektionsbefund.
0,5	Ähnliche Erscheinungen. Das Tier verendet 1 Stunde 15 Minuten nach der Injektion.
0,2	Das Tier zeigt unmittelbar nach der Injektion große Unruhe. Tod nach 3 Stunden.
0,1	Tod nach 5 Stunden.
0,05	Bis zum Abend anscheinend völlig munter, wird am nächsten Morgen tot aufgefunden (Tod 5—15 Stunden nach der Injektion).

b) Von einer 10fachen Normalgiftlösung werden absteigende Dosen einer Reihe von Kaninchen in die Ohrvene injiziert.

ccm 10f. N.-Giftlösung	Befund
0,01	1500 g schweres Tier. Tod in 3 Stunden nach Eintritt von Krämpfen.
0,005	1750 g schweres Tier. Verendet nach $3^1/_4$ Stunden unter Krämpfen. Sektionsbefund: seröse Flüssigkeit und bernsteingelbe Gerinnsel in den Brusträumen.
0,002	1250 g schweres Tier. Tod über Nacht. Typischer Befund.
0,001	Das Tier ist am ersten Tag munter. Am zweiten Tage nach der Injektion verläßt es den Käfig und kauert vor demselben. Respiration und Puls beschleunigt. Tod nach 48 Stunden.
0,0005	Dieselben Erscheinungen. Tod nach 48 Stunden.
0,0002	Das Tier zeigt keine Krankheitssymptome.

Kälber und Rinder sind für das Rauschbrandgift sehr empfänglich, wobei zu betonen ist, daß das Alter der Tiere für die relative Empfänglichkeit (pro Kilo Körpergewicht) keinen Unterschied macht.

Die Erscheinungen, welche nach subkutaner Injektion von Giftlösungen auftreten, bestehen in Schwellungen, die bei untertödlichen Dosen

im Verlaufe von Tagen oft eine ungemein große Ausdehnung gewinnen, nach kürzerer oder längerer Zeit aber, ohne bleibende Spuren zu hinterlassen, schwinden. Nur in vereinzelten Fällen kommt es nach Injektion von Dosen, die knapp unter der tödlichen Minimaldosis liegen, zu Nekrosen.

In einem Falle konnten wir feststellen, daß 20 ccm zweifacher Normalgiftlösung, subkutan injiziert, ein Jungrind in 30 Stunden töteten.

Erfahrungen, die wir hinsichtlich der Giftwirkung an einer größeren Anzahl von Jungrindern bei einem mißlungenen Immunisierungsversuch anstellen konnten, sollen später bei der Beschreibung der Rauschbrand-Schutzimpfung kurz erwähnt werden.

Was die histologischen Veränderungen betrifft, die nach Injektionen von Rauschbrandgiftlösungen auftreten, so hat Dömeny in der Zeitschrift für Heilkunde, Jahrgang 1904 seinerzeit ausführlich hierüber berichtet.

Wir verweisen diesbezüglich besonders auf die Beobachtung, daß sich in Rückenmark, Medulla oblongata und Gehirn der vergifteten Tiere Zellveränderungen schweren Grades nachweisen lassen. Im übrigen finden sich im Zentralnervensystem ebenso wie in den übrigen Organen, vor allem aber in der Umgebung der Impfstelle, zellarmes Ödem und Hämorrhagien.

Experimentell-pathologische Studien über die Giftwirkung an Hunden sind seinerzeit im v. Baschschen Laboratorium begonnen worden. Die Untersuchungen sind aber nicht zum Abschlusse gekommen.

E. Verhalten der Giftlösungen gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Giftlösung läßt das Gift völlig intakt. Das Gift ist nicht dialysierbar (Pergamentschläuche!). Versuche, durch Eindampfen im Vakuumsiedeapparat (bei 30° C), die Giftlösung zu konzentrieren, schlugen fehl. Auch wenn während des Siedens ein Kohlensäurestrom durch die Flüssigkeit geleitet wurde, nahm der Wirkungswert der Lösungen stark ab.

Im Gegensatz hierzu konnte durch Einengen der vorher in Eis gekühlten Giftlösung im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure die Giftwirkung ungeschmälert erhalten werden, derart, daß der trockene Rückstand, in der entsprechenden Menge sterilen Wassers gelöst und auf das ursprüngliche Volum gebracht, eine giftige Flüssigkeit lieferte, deren Titer dem ursprünglichen gleich kam.

Im Gegensatz zu den Angaben von Leclainche und Vallée über die große Hitzebeständigkeit des Rauschbrandgiftes, sei hervorgehoben, daß das Rauschbrandgift gegen höhere Temperaturen überaus empfindlich ist. Einstündiges Erwärmen auf 50° macht die wirksamsten Lösungen ungiftig.

Die filtrierten Rauschbrandgiftlösungen sind keineswegs unbegrenzt haltbar. Gelegentlich schon nach Tagen, meist nach Wochen, nimmt die Wirksamkeit der Lösungen ab, selbst bei Aufbewahrung der luftdicht verschlossenen Proben in der Kälte.

In gleicher Weise wie beim Lagern, tritt auch eine Abnahme der Wirksamkeit ein, wenn die Giftlösungen mit Luft geschüttelt werden.

Was die Einwirkung verschiedener chemischer Substanzen auf die Rauschbrandgiftlösungen betrifft, so sei erwähnt, daß diese gegen Kaliumpermanganat und andere Oxydationsmittel sehr empfindlich sind.

Auffallend ist die große Empfindlichkeit des Giftes gegenüber Karbolsäure. Lösungen, die mit 1 % Karbolsäure versetzt wurden, sind in 24 Std. unwirksam. Hingegen bewirkt 1 ‰ Formalinzusatz in 24 Std. nur eine Abnahme des Titers. Chloroform erwies sich als ganz unschädlich, so daß wir uns seiner für die Konservierung der Giftlösungen vielfach bedienten.

Versuche, das Gift durch Ausfällen der Lösungen mit schwefelsaurem Ammon, Alkohol oder Alkoholäther zu konzentrieren, schlugen fehl. Das Gift wird hierbei zum größten Teil zerstört.

Schlußbemerkungen.

Überblickt man die im vorstehenden dargestellten Eigenschaften der Rauschbrandgiftlösungen, so läßt sich unschwer erkennen, daß das Rauschbrandgift in einer Reihe von Eigenschaften zu den bisher beschriebenen echten Bakteriengiften ausgesprochene Verwandtschaft zeigt, Die Art der Wirkung, das Bestehen einer Inkubationszeit, die auch durch Anwendung der 1000fach tödlichen Dosis nicht weiter abgekürzt werden kann, die Empfindlichkeit gegenüber der Einwirkung höherer Temperaturen usw. reihen das Rauschbrandgift dem Diphtheriegift und dem Tetanusgift an.

Andererseits liegt in der überaus intensiven Einwirkung auf die Blutgefäße eine besondere Eigenheit vor, welche durch das hiermit verbundene stürmische Auftreten von ödematösen Schwellungen, wie sie sonst wohl nur gewissen Schlangengiften zukommen, dem Experimentator eine willkommene Handhabe für die Beobachtung des Ablaufes des Intoxikationsprozesses bietet.

Da die Wirksamkeit unserer Lösungen, wie bereits erwähnt, diejenige der stärksten Diphtheriegiftlösungen erreicht bezw. übertrifft, schien die Darstellung des Toxins nicht nur geeignet zu sein für die Pathogenese des Rauschbrandprozesses wertvolle Aufschlüsse zu liefern, sondern es lag auch die Hoffnung nahe, durch Erzeugung des entsprechenden Antitoxins ein spezifisches Heil- und Schutzserum gegen den Rauschbrand zu gewinnen.

Wir werden im Abschnitte „Rauschbrandantitoxin" in diesem Handbuche zeigen, daß die Voraussetzung hierfür, die Gewinnung hochwirksamer Sera, sich erfüllte. Leider war damit die Frage nicht gelöst, da sich, wie in einer weiteren Abhandlung auseinander gesetzt werden wird, herausstellte, daß der tödliche Verlauf der Rauschbrandinfektion nicht auf der Wirkung des sezernierten Toxins beruht.

Literatur.

1) Arrhenius und Madsen, Anwendung der physikalischen Chemie auf das Studium der Toxine und Antitoxine. Zeitschr. für physik. Chemie 1903.
2) Behring, v., Beiträge zur experimentellen Therapie 1904, Nr. 7.
3) Bordet, Referat erstattet auf dem hygienischen Kongreß in Brüssel.
4) Dungern, v., Beiträge zur Kenntnis der Bindungsverhältnisse bei der Vereinigung von Diphtheriegift und Antiserum. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Heft 8 und 9.
5) Dünschmann, H., Étude experimentale sur le Charbon Symptomatique et ses relations avec l'oedème malin. Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome VIII, pag. 403.
6) Eisenberg, Über die Bindungsverhältnisse von Toxin und Antitoxin. Centralbl. für Bakt. 1903.

7) Grassberger und Schattenfroh, Über Buttersäuregärung. I. Arch. für Hyg. 1900, Bd. XXXVII. II. Arch. für Hyg. 1902, Bd. XXXXII. III. Arch. für Hyg. 1904, Bd. XLVIII. IV. Arch. f. Hyg. 1906, Bd. LX.
8) Dies., Über das Rauschbrandgift und ein antitoxisches Serum. Monographie (F. Deuticke, Leipzig und Wien) 1904.
9) Dies., Über die Beziehungen von Toxin und Antitoxin. Monographie (F. Deuticke, Leipzig und Wien) 1904.
10) Dies., Antitoxische und antiinfektiöse Immunität. Aus den Sitzungsberichten der Kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien, Bd. CXIV, Abt. III.
11) Dies., Toxin und Antitoxin, Kritische Bemerkungen. Wiener klinische Wochenschrift 1905, Nr. 15.
12) Gruber, M. und Pirquet, v., Wiener klin. Wochenschrift 1903.
13) Henry et Mayer, Irréversibilité de la protection des colloides instabiles par des colloides stabiles. Soc. Biolog. Vol. LVI, pag. 864.
14) Kitt, Th., Immunität und Schutzimpfungen beim Rauschbrand des Rindes. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, herausgeg. von Wassermann und Kolle.
15) Leclainche et Vallée, Étude comparée du vibrion septique et de la bactérie du charbon sympt. Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, Tome XIV, pag. 590.
16) Dies., Recherches expérimentales sur le charbon symptom, l. c., pag. 202, 513.
17) Michaelis, L., Die Bindungsgesetze von Toxin und Antitoxin. Berlin, Bornträger 1905.
18) Neisser und Sachs, Berliner klin. Wochenschr. 1904, Heft 16.

VIII.

Toxine des Choleravibrio und anderer Vibrionen.

Von

R. Kraus

in Wien.

Geschichtliches.

Im Jahre 1884 hat KOCH in der ersten Cholerakonferenz die Cholera asiatica als Toxikose charakterisiert, die durch ein vom Choleravibrio produziertes, spezifisches Gift hervorgerufen werden dürfte.

In den darauffolgenden Jahren versuchten eine Reihe von Forschern (PETRI, GAMALEIA, WESBROOK, BRIEGER und FRAENKEL*) dieses von KOCH postulierte Gift nachzuweisen. Den Beweis für das Vorhandensein eines spezifischen Giftes in Kulturen des Choleravibrio vermochte aber keine dieser Arbeiten zu erbringen.

Bei kritischer Beleuchtung muß zunächst diesen Arbeiten gegenüber ein Haupteinwand erhoben werden. Es erscheint heute fraglich, ob die zu den Versuchen verwendeten Vibrionen wohl als Choleravibrionen hinzunehmen sein dürften. Wissen wir ja Dank den Arbeiten PFEIFFERS wie viele Vibrionen in Laboratorien als Choleravibrionen auf Grund der kulturellen Merkmale angesehen wurden, deren Unechtheit erst später durch die biologischen Reaktionen festgestellt werden konnte.

Dazu kommt noch als ein ebenso wichtiges Argument, daß es nicht gelungen ist, die nachgewiesenen giftigen Stoffwechselprodukte als spezifische Toxine zu charakterisieren, da der Nachweis des Antitoxins nicht erbracht wurde.

Die Möglichkeit, in der gegebenen Richtung fruchtbringend und einwandfrei zu arbeiten, ist eigentlich erst durch die Arbeiten R. PFEIFFERS geschaffen worden. Nachdem PFEIFFER durch die biologische Reaktion die Grundlage einer exakten Choleradiagnostik ausgearbeitet hatte, war die Identifizierung des Choleravibrio und dessen Differenzierung von artverwandten ermöglicht worden. In der Zukunft müssen demnach alle Arbeiten, die sich mit der Toxinbildung des Choleravibrio beschäftigen, in erster Linie zum Ausgangspunkt ihrer

---

*) Die Arbeiten von HUEPPE und SCHOLL können nicht hieher gezählt werden, da ja die Untersuchungen von GRUBER und WIENER, WESBROOK und DÖNITZ nachweisen konnten, daß die Giftigkeit der Eierkulturen nicht durch Gifte des Choleravibrio, sondern durch Gifte von Fäulnisbakterien zu erklären sei.

Untersuchungen Vibrionen benützen, welche allen Anforderungen der derzeitigen Choleradiagnostik entsprechen. Die Vibrionen müssen nicht nur kulturell, sondern auch biologisch mittels des PFEIFFERschen Versuches und mittels eines ausgewerteten agglutinierenden Choleraserums die Reaktionen des Choleravibrio aufweisen. Wenn diese Bedingung erfüllt ist und es dann gelungen ist, mit einwandfreiem Kulturmaterial giftige bakterienfreie Stoffwechselprodukte zu gewinnen, mit welchem man Tiere aktiv immunisieren kann, deren Serum dann diese Gifte spezifisch zu neutralisieren imstande ist — dann erst kann man mit Recht von einem Choleratoxin sprechen.

PFEIFFERS Arbeiten*) erfüllen wohl die Grundbedingung indem die Versuche mit sichergestellten Choleravibrionen durchgeführt wurden, sie sind aber außerstande, für die giftigen Stoffwechselprodukte der Bouillonkulturen oder die Gifte der Bakterienleiber (endogene Gifte) die Toxinnatur zu beweisen. PFEIFFER konnte mit den im Bakterienleib nachgewiesenen giftigen Körpern weder Tiere aktiv immunisieren, noch ist es ihm gelungen im Serum derart behandelter Tiere Antitoxine nachzuweisen. Wenn auch PFEIFFER selbst von sogenannten Endotoxinen spricht, so ist er sich wohlbewußt, daß diese Gifte streng zu sondern sind, von den bakteriellen Toxinen als deren wichtigstes Charakteristikum die antigene Eigenschaft bis heute noch Geltung hat. Um Begriffsverwirrungen zu vermeiden, sollten in Zukunft diese Gifte PFEIFFERS nicht ohne weiteres als Endotoxin bezeichnet werden, zumal ja HAHN, BESREDKA, MACFADYEN bereits giftige Leibessubstanzen mancher Bakterien (Cholera, Typhus Pest), mit antigenen Eigenschaften ausgestattet beschrieben haben.

RANSOM hat unter v. BEHRINGS Leitung im Jahre 1895 Gifte eines Vibrio beschrieben, die wir ohne weiteres als Toxine anerkennen müssen, da es ihm gelungen ist, mit diesen Giften auch Antitoxine zu gewinnen. Ob aber der von RANSOM benützte Vibrio ein Choleravibrio war, läßt sich aus der kurzen Mitteilung nicht erweisen. RANSOM selbst macht keine näheren Angaben über diesen Vibrio.

Denselben berechtigten Einwand kann man bei objektiver Beurteilung auch der ausführlichen Arbeit von METSCHNIKOFF, ROUX und SALIMBENI machen. Diesen Autoren ist es ebenso wie RANSOM im Jahre 1896 gelungen, durch besondere Züchtungsverfahren Gifte in Kulturen zweier Vibronen festzustellen, welche allen Anforderungen entsprechen um als Toxine anerkannt zu werden. Leider fehlen auch hier nähere Angaben über die Charakterisierung dieser Stämme mittels biologischer Reaktionen**). Wenn auch nachträglich durch Vergleich der Eigenschaften dieser Gifte mit den von BRAU und DENIER von sicheren Choleravibrionen gewonnenen, die Wahrscheinlichkeit zugestanden werden kann, daß ROUX, METSCHNIKOFF und SALIMBENI, sowie auch RANSOM möglicherweise Choleravibrionen in Händen hatten, kann man

*) Die ersten Versuche PFEIFFERS (Zeitschr. f. Hyg., Bd. XI), mit dem Vibrio Massauha angestellt, beweisen für die in Frage stehende Toxinbildung des Choleravibrio nichts, da ja PFEIFFER selbst den Vibrio Massauha später vom Choleravibrio zu differenzieren vermochte.

**) Der eine Stamm stammt von PFEIFFER (Herbstepidemie 1894); nähere Angaben, ob PFEIFFER später diesen Stamm als Choleravibrio auch durch die peritonealen Versuche verifiziert hat, fehlen. Den zweiten Stamm hat NICOLLE in Konstantinopel gezüchtet und auch dieser Stamm ist nicht näher biologisch charakterisiert.

doch nicht ohne weiteres behaupten, daß diesen Autoren das Verdienst zuzuschreiben sei, zuerst in einwandsfreier Weise Toxine der Choleravibrio nachgewiesen zu haben. Diese strenge Kritik mit welcher wir an die jahrelang diskutierte Frage herantreten, ist um so mehr angezeigt, als man im Laufe der nächsten Jahre bei Vibrionen die sich biologisch vom Choleravibrio differenzieren ließen giftige Stoffwechselprodukte fand, welchen die Eigenschaften bakterieller Toxine ebenfalls zukamen.

Im Jahre 1903 konnte ich zunächst in Filtraten aus Bouillonkulturen des Vibrio Nasik Gifte nachweisen, welche für Kaninchen, Meerschweinchen, Vögel sich giftig erwiesen und gegen welche Antitoxine erzeugt werden konnten.

Zwei Jahre später konnte ich dann im Verlaufe systematischer Untersuchungen über Vibrionengifte bei einer ganzen Reihe anderer Vibrionen, welche ebenfalls wie der Vibrio Nasik aus Fällen die unter Darmerscheinungen (Cholera, Dysenterie) gestorben sind, gezüchtet wurden, Toxine feststellen. Durch diese Arbeiten, die ich zum Teil mit Pribram und Prantschoff ausgeführt habe, ist sichergestellt worden, daß verschiedenartige Vibrionen giftige Stoffwechselprodukte produzieren, die wir als bakterielle Toxine anzusehen haben.

War es nach diesen Arbeiten sehr wahrscheinlich, daß auch die Choleravibrionen ebenso wie viele andere Vibrionen lösliche Toxine produzieren, so mußte doch noch der direkte Beweis erbracht werden.

Im März 1906 haben Brau und Denier in einer kurzen Mitteilung an die Medic. Akademie zu Paris berichtet, daß sie bei Vibronen, welche kulturell und biologisch als Choleravibrionen bestimmt werden konnten, in besonderen Nährmedien giftige Stoffwechselprodukte nachweisen konnten, mit welchen es gelungen ist, Antitoxine zu erzeugen. Wie aus der ausführlichen Mitteilung die im selben Jahre in den Annalen Pasteurs erschienen ist, hervorgeht, besteht kein Zweifel darüber, daß Choleravibrionen ein Gift produzieren, welches ebenso wie das Diphtherie, Tetanus, Dysenterietoxin ein spezifisches Produkt das Toxin des Choleravibrio darstellt. Auf der ersten Tagung der freien deutschen Vereinigung für Mikrobiologie in Berlin 1906 konnte ich die Versuche, von Brau und Denier, welche mit den mir überlassenen Stämmen nachgeprüft wurden, bestätigen.

Die geschichtliche Darstellung dieses endlich nach jahrelangen Bemühungen zum Abschluß gebrachten Problems wäre nicht vollständig, wenn nicht im besonderen der in El Tor von E. Gottschlich aus Stühlen dysenteriekranker Menschen gezüchteten Vibrionen Erwähnung geschehen würde. Diese sechs Vibrionen, welche Gottschlich durch kulturelle und biologische Methoden bestimmt, als Choleravibrionen beschrieben hat, produzieren, wie durch die in Gemeinschaft mit E. Pribram ausgeführten Untersuchungen ermittelt werden konnte, lösliche Toxine. Diese Toxine sind, wie aus dem folgenden hervorgehen wird, insofern von den Choleratoxinen der Saigonstämme unterschieden als sie sowie die bereits angeführten Vibrionentoxine nach intravenöser Injektion Kaninchen innerhalb weniger Minuten (5—15) töten, was bei den Toxinen der Saigonstämme nicht zutrifft. Außerdem aber ist in den Filtraten der El Torvibrionenkultur ein Hämotoxin neben dem akut wirkenden Toxin vorhanden, welches ebenfalls bei den toxinproduzierenden Saigonvibrionen bisher nicht nachgewiesen ist. Ob diese Vibrionen als toxinproduzierende Choleravibrionen aufzufassen seien oder wie ich anzunehmen geneigt bin, als nahe verwandte Spezies, die in einem ähnlichen Verhältnis auch bezüglich ihrer Pathogenität zum Choleravibrio

stehen wie beispielsweise Paratyphusbazillen zum Typhusbazillus, muß vorderhand unentschieden bleiben.

Nach diesen geschichtlichen Bemerkungen gelangen wir zu dem Schlusse, **daß Vibrionen und auch der Choleravibrio Gifte toxinartiger Natur produzieren.**

Es erübrigt noch mit einigen Worten auf die bereits flüchtig gestreiften Endotoxine zurückzukommen. Wir haben uns dagegen ausgesprochen, daß die von Pfeiffer, Wassermann nachgewiesenen endogenen Gifte der Bakterienleiber*) als Endotoxine bezeichnet werden. Es muß Pfeiffer ohne weiteres zugestanden werden, daß die Leibessubstanzen des Choleravibrio giftig für Meerschweinchen sind. Die durch Chloroform oder Wärme abgetöteten Choleravibrionen töten Meerschweinchen unter gleichen Erscheinungen (Temperaturabfall, Lähmungen der Extremitäten) wie lebende Vibrionen. Mit diesen Giften gelang es aber weder Pfeiffer noch Anderen, Antitoxine zu gewinnen. Diese Gifte können demnach nicht den Anspruch erheben, als Toxine bezeichnet zu werden.

Demgegenüber zeigen Arbeiten von Besredka bei Typhus-, Dysenterie-, Pestbazillen und die von Macfadyen bei Typhusbazillen und beim Choleravibrio, daß im Bakterienleib Gifte enthalten sind, mit welchen wohl Antitoxine erzeugt werden können. Hier interessiert uns speziell die Arbeit Macfadyens, welchem es gelungen, mit endogenen Giften eines Vibrio**) neutralisierende Gegenkörper hervorzurufen. Daß toxinproduzierende Bakterien in ihrem Körper auch noch endogenes Toxin enthalten können, wissen wir ja bereits seit Wassermanns Arbeit über den Bacillus pyocyaneus. Ich und Doerr konnten zeigen, daß der Bacillus dysenteriae Shiga-Kruse auch noch in seinem Leib Toxin enthält, welches man durch Extraktion mit Wasser oder Autolyse nach Conradi und nachträgliche Filtration gewinnen kann. Dieses Dysenterietoxin ist identisch mit dem secernierten oder in Bouillonfiltraten nachweisbaren Toxin, insofern als das Antitoxin beiderlei Gifte zu neutralisieren imstande ist. Es gibt Bakterien, wie beispielsweise Tetanus und Diphtheriebazillen, deren Gifte in das flüssige Nährmedium vollständig abgegeben werden, der Leib enthält fast kein spezifisches Toxin. Dann gibt es aber Bakterien, wie der Pyocyaneusbazillus, Dysenteriebazillus, welche Gift abgeben und welches in Lösung nachweisbar ist, andererseits aber auch in ihrem Leib noch Gift zurückhalten (Endotoxine). Ob nicht bei den toxinproduzierenden Vibrionen und Choleravibrionen ähnliche Verhältnisse anzutreffen sein dürften, darüber fehlen vorderhand nähere Untersuchungen***). Es wird zu entscheiden sein: 1. ob die nicht toxinproduzierenden Choleravibrionen, deren Toxine in Kulturfiltraten nicht nachweisbar sind, ein spezifisches Endotoxin analog den Endoenzymen bilden, verschieden von den Toxinen der toxinproduzierenden Vibrionen, 2. ob die toxinproduzierenden Vibrionen und Choleravibrionen endogene Toxine bilden und ob diese identisch sind mit den löslichen, in Filtraten nachweisbaren.

*) Giftigkeit der Bakterienleiber des Choleravibrio hat vor Pfeiffer bereits Cantani, Klemperer nachweisen können. Es ist fraglich, ob diese Autoren mit sicheren Choleravibrionen gearbeitet haben.

**) Macfadyen bezeichnet seinen Vibrio als Choleravibrio, ohne nähere Angaben zu machen, woher dieser Vibrio stammt und wie er identifiziert wurde. Wir müssen daher dieselben Einwände gegenüber Macfadyen erheben, die einleitend anderen Autoren gemacht wurden.

***) In neueren Versuchen ist es mir in Gemeinschaft mit Russ aus dem Bakterienleib der El Torstämme mittels destillierten Wassers gelungen akut wirkende Toxine zu extrahieren.

Erst wenn diese Fragen entschieden sein werden, läßt sich endgültiges darüber sagen, ob es spezifische Endotoxine im Sinne Besredkas, Macfadyens gibt, die wir als besondere Toxine von den in Filtraten nachweisbaren zu unterscheiden haben werden oder ob derzeit identische Körper bloß verschieden benannt werden.

In welcher Beziehung diese bereits nachgewiesenen Toxine des Choleravibrio zur Krankheit stehen, ob wir sie als pathogenetisches Agens anzusehen haben, ist durch diese experimentellen Untersuchungen bisher allerdings nicht erwiesen*). Der Beweis wird erst erbracht sein, wenn die mit diesen Toxinen gewonnenen Antitoxine auch bei der Cholera asiatica des Menschen spezifische Wirkungen zu äußern vermögen.

Das Toxin des Choleravibrio.

Der historische Rückblick zeigt, daß der Beweis für die Produktion eines löslichen Toxins des Choleravibrio erst durch Brau und Denier erbracht worden ist. Trotzdem, wie aus der objektiven Kritik der Arbeiten von Ransom, Metschnikoff, Roux und Salimbeni hervorgeht, die von diesen Autoren gefundenen Toxine nicht mit absoluter Sicherheit als Toxine des Choleravibrio anerkannt werden können, wollen wir die darüber vorliegenden Erfahrungen doch hier erörtern.

Das Gift von Ransom ist in Mengen von 0,5 für Meerschweinchen vom Gewichte von 250 g in 24 Stunden tödlich, in großen Dosen tötet es bereits in 3—4 Stunden. Dasselbe Gift ist für Kaninchen erst in Dosen von 4 ccm wirksam, für Tauben, weiße Mäuse überhaupt nicht wirksam. Das gefällte Toxin wirkt in Mengen von 0,1 subkutan für Meerschweinchen von 250 g in 15 Minuten; in Mengen von 0,085 in 30—60 Minuten, in Mengen von 0,07 in 12—14 Stunden tödlich.

Viel eingehendere Angaben über das Toxin von Metschnikoff, Roux und Salimbeni finden sich in der Arbeit dieser Autoren, in den Annalen des Pasteurschen Institutes.

Die zu diesen Versuchen verwendeten Vibrionen stammen von Peiffer aus der Epidemie von 1894 in Ostpreußen und von Nicolle aus Konstantinopel. Eine biologische Bestimmung der Vibrionen fehlt.

Die Giftbildung dieser Vibrionen wurde zunächst mittels der Züchtung in Collodiumsäckchen nachgewiesen. Die nach Angaben von Roux und Nocard hergestellten Collodiumsäckchen (3—4 ccm Inhalt) werden mit 2 % Peptonwasser gefüllt, geimpft und ins Peritoneum des Meerschweinchens eingebracht. In 2—3 Tagen gehen die Tiere unter Hypothermie zugrunde. Die kulturelle Untersuchung des Peritoneums ist negativ. Aus diesen Versuchen schließen die französischen Forscher, daß der Choleravibrio ein lösliches Toxin produziert. Diese Toxine können auch in vitro gewonnen werden. Im Nährboden (2 % Peptonwasser + 2 % Gelatine + 1 % Kochsalzlösung), der in Petrischalen verteilt wird, konnten nach 24 Stunden bis drei Tagen (bei 37°) giftige Körper in Filtraten nachgewiesen werden. Diese Gifte töten subkutan in Mengen von 0,25 ccm Meerschweinchen (300 g) in 18 Stunden, größere Dosen töten schon in einigen Minuten. Die Tiere gehen unter Hypothermie unter gleichen Erscheinungen wie bei der Infektion zugrunde. Im Peritoneum

*) Würde das durch diese Toxine hervorgerufene Krankheitsbild bei Tieren ein für die Cholera charakteristisches sein, sowie etwa dasjenige durch Tetanus, Dysenterietoxin bei Tieren, wäre der Zusammenhang zur menschlichen Erkrankung sehr wahrscheinlich gemacht.

der Tiere ist klare Flüssigkeit, die Darmschlingen sind gerötet, ebenso die Nebenieren. Das für Meerschweinchen wirksame Gift erweist sich für Kaninchen, Mäuse, Tauben, Hühner weniger wirksam.

Das Toxin ist sehr labil, wird durch Licht, Luft geschädigt. Ebenso wie Ransom konnten auch Metschnikoff, Roux und Salimbeni durch Alkohohl, Ammonsulfat das Gift konzentrieren.

Brau und Denier haben die löslichen Gifte mit biologisch bestimmten Choleravibrionen gewonnen, die aus Stühlen cholerakranker Menschen in Saigon gezüchtet wurden.

In alkalischer Martinscher Bouillon waren die Toxine schwächer als wenn sie in einem eigens angegebenen Nährmedium gewonnen werden.

Der von Brau und Denier angegebene Nährboden hat folgende Zusammensetzung:

90 ccm normales (älteres) Pferdeserum
10 ccm defibriniertes (älteres) Blut } 3 Stunden bei 60° erwärmt.

Dieser Nährboden wird mit viel Kultur geimpft und öfters geschüttelt. Nach 7 Tagen (bei 39°) wird die Kultur entweder durch Papier, Chamberland-F, Berkefeldfilter filtriert. Das Filtrat tötet von 0,5—0,1 Meerschweinchen (250 g) bei subkutaner und peritonealer Injektion. Kaninchen gehen bei subkutaner Injektion von 15—20 ccm unregelmäßig erst in 3—4 Tagen zugrunde. Eine bessere Wirkung hat die intravenöse Injektion, bei welcher 0,5—1,5 ccm in einigen Stunden Kaninchen tötet. Hund und Pferd sind ebenfalls empfindlich. Dagegen ist die Maus unempfindlich.

Betreffs weiterer Eigenschaften geben Brau und Denier die hohe Resistenz gegen höhere Temperaturen, erst bei 120° nach 20′ fanden sie das Gift unwirksam. Ein erwärmtes Gift erwies sich für Meerschweinchen wirksam, dagegen hat es seine Giftigkeit für Kaninchen verloren. Die Autoren nehmen deshalb an, daß es sich hier um ein thermolabiles und ein thermostabiles Gift handeln dürfte.

Eigene Untersuchungen. Die Versuche wurden zunächst mit dem von Brau und Denier gezüchteten Choleravibrionen aus Saigon, die mir von H. Dr. Salimbeni freundlichst überlassen wurden, durchgeführt.

Bestimmung der Vibrionen: Die vier Stämme I, J, K und G wurden vorher morphologisch, kulturell und biologisch untersucht, wobei die Angaben von Brau und Denier bestätigt werden konnten. Die biologische Bestimmung ergab, daß alle Stämme mit einem agglutinierenden Serum (gewonnen mit einem Choleravibrio Pfeiffer) ebenso agglutiniert wurden in Serumverdünnungen 1:4000 wie der Choleravibrio Pfeiffer.

Auch die Reaktion auf Hämotoxine*) fiel ebenso negativ aus wie bei den untersuchten als sicher anerkannten Choleravibrionen.

Die Pathogenität der Stämme G und K für Meerschweinchen bei peritonealer Injektion war $^1/_{10}$ Öse = 0,0002 g Kultur. Die Meerschweinchen gehen innerhalb 24 Stunden unter gleichen Erscheinungen zugrunde wie nach Infektion mit dem Choleravibrio Pfeiffer.

Danach ist es wohl sichergestellt, daß die Vibrionen von Brau und Denier als Choleravibrionen anzusehen sind, da sie allen Bedingungen der modernen Choleradiagnostik entsprechen.

---

*) Näheres darüber s. Hämotoxine Pribram und Russ dieses Handbuch.

Darstellung der Gifte und Eigenschaften derselben.

Zur Gewinnung von löslichen Giften dieser Vibrionen wurden zunächst die Nährmedien benutzt, in welchen wir erfahrungsgemäß mit anderen toxigenen Vibrionen Toxine und Hämotoxine nachweisen konnten. (Die zu diesen Versuchen verwendete Bouillon ist eine Fleischbouillon von fettfreiem Rindfleisch gewonnen, mit einem Zusatz von $1\frac{1}{2}$ % Wittepepton und $\frac{1}{2}$ % Kochsalz. Die Alkaleszenz der Bouillon wurde variiert. Die Impfung erfolgt mit einer 24 Stunden-Agarkultur. Die Vibrionen werden auf schiefem Agar bis 37° gezüchtet und wöchentlich überimpft.)

In Filtraten, gewonnen durch Filtration verschiedenaltriger Bouillonkulturen durch ungebrauchte Reichelfilter, lassen sich Gifte nachweisen, die Meerschweinchen im Gewicht von 180—200 g bei peritonealer Applikation innerhalb weniger Stunden schon schwer schädigen und töten. Bei größeren Dosen (2—3 ccm) gehen die Meerschweinchen schon nach 5 Stunden zugrunde, bei kleineren Mengen (1—0,5) erst innerhalb von 24 Stunden. Auch bei intravenöser Injektion tritt der Tod der Tiere nicht früher auf als bei peritonealer Applikation. Subkutan wirkt das Gift viel schwächer.

Die peritoneal und intravenös injizierten Tiere gehen unter gleichen Erscheinungen zugrunde wie bei der Infektion mit Choleravibrionen unter Lähmungserscheinungen, Temperaturabfall. Bleiben die Tiere länger als 24 Stunden am Leben, so beobachtet man häufig Rektalprolapse, was auch schon Ransom beschreibt. Bei der Obduktion der akut zugrunde gegangenen Tiere findet man im Peritoneum klare Flüssigkeit, die Darmschlingen sind gerötet, ebenso Nebennieren. Die Tiere mit Prolaps gehen häufig an Verblutung zugrunde (die Tiere beißen den prolabierten Darm ab).

Viel weniger wirksam als für Meerschweinchen ist dieses Gift für Kaninchen und selbst die intravenöse Injektion wirkt unsicher. Auch Mäuse verhalten sich diesem Gifte gegenüber weniger empfindlich als Meerschweinchen, ebenso Tauben, Hühner, die bei intravenöser Injektion am Leben bleiben.

Dieses verschiedene Verhalten der Kaninchen, Tauben und Hühner diesem Gifte gegenüber unterscheidet dieses Gift, wie sich zeigen wird, von den Giften der anderen Vibrionen (El Tor), die sowohl für Meerschweinchen als auch für Kaninchen und Vögel giftig sind. (Diese Feststellung führt uns eben zur Vermutung, daß die Gifte von Ranson, Metschnikoff, Roux und Salimbeni, — die für Kaninchen weniger wirksam waren als für Meerschweinchen, von Choleravibrionen herrühren dürften. Wie gesagt, läßt sich aber auf Grund dieser Vermutung allein eine Entscheidung nicht erbringen.) Außerdem ergibt sich gegenüber den Giften anderer Vibrionen (El Tor) der prinzipielle Unterschied, daß diese Choleragifte bei intravenöser Applikation erst nach einigen Stunden die Tiere töten, wogegen die anderen Vibrionengifte schon akut in einigen Minuten bei dieser Art der Applikation wirken.

Die Gifte sind, wie die Tabellen (s. Tabelle pag. 184) lehren, nicht so wirksam wie das Diphtherie- oder Tetanusgift, es sind viel größere Mengen notwendig, um empfindliche Tiere zu töten. Es ist aber möglich, daß man später, bis mehr Erfahrungen über diese Gifte gewonnen werden, wirksamere Gifte bekommt. Ich erinnere hier an die ersten Diphtheriegifte von Roux und Yersin. Im übrigen finden wir, daß auch trotz vieler Bemühungen das Dysenterietoxin bisher gewöhnlich nicht stärker wirksam ist als in Mengen von 0,5 ccm, seltener 0,1 ccm*). Man könnte

*) S. Doerr: Das Dysenterietoxin.

daran denken, daß das Diphtherietoxin, Tetanustoxin, Botulismustoxin wirkliche Sekretionsprodukte der Bazillen sind, dagegen die Dysenterietoxine, Choleragifte, Typhusgifte bloß durch Zerfall, Autolyse der Bakterienleiber frei werden und dadurch erst in Lösung übergehen. Ein sicherer Beweis dafür ob die löslichen Dysenterietoxie, Choleratoxine sezerniert sein dürften oder durch Zerfall der Bakterienleiber frei in Lösung übergehen, liegt bisher nicht vor. Unserer Meinung nach ist aber diese Frage sekundärer Natur. Prinzipiell wichtig erscheint uns vielmehr, ob diese löslichen Gifte als Toxine aufgefaßt werden dürfen. Durch die Versuche von Brau und Denier, sowie durch eigene, die im Kapitel über Antitoxine wiedergegeben werden, ist die antigene Eigenschaft sichergestellt. Diese löslichen Gifte wirken immunisierend und erzeugen Antitoxine.

Über das Zeitoptimum der Bildung der Gifte ist bisher wenig sicheres festgestellt. Man findet wirksame Gifte in fünftägigen Kulturen, die aber nicht wirksamer sind als solche aus 2—3 Wochen alten Kulturen.

Auch die Gifte von Brau und Denier, die in Serumblutnährmedien gewonnen waren, sind nicht besonders stark. Möglicherweise liegt es an den von ihnen benützten Filtern (Chamberland-F, Berkefeld), daß die Toxine von Brau und Denier stärker sind als unsere Gifte. Daß die Reichelfilter viel Gift zurückhalten, werden wir auch aus der Besprechung der El Tortoxine ersehen und auch die Versuche, diese Gifte durch Papierfiltration zu gewinnen sprechen im selben Sinne. (Die mit 0,5 % Carbolsäure versetzte Kultur wird, so wie es bei der Gewinnung der Diphtherie-, Dysenterietoxine üblich ist, durch Papier einigemal filtriert bis die Flüssigkeit vollkommen klar ist.) Die Gifte, durch Papierfiltration gewonnen, erwiesen sich viel wirksamer als die Filtrate durch Reichelkerzen. Die Tiere sind bereits nach 2 Stunden schwer krank und gingen noch auf 0,5 ccm innerhalb 24 Stunden zugrunde. Jedenfalls empfiehlt sich diese Filtration zur Gewinnung der Gifte mehr als die durch Bakterienfilter.

Ebenso wie schon Ransom, Metschnikoff, Roux und Salimbeni konnten auch wir die Labilität dieser Toxine wahrnehmen. Wie aus folgender Tabelle hervorgeht, ändert sich die Toxicität dieser Gifte sehr rasch, so daß das Arbeiten äußerst erschwert wird. Es erinnert die Flüchtigkeit dieser Gifte an die der flüssigen Tetanus-

Abnahme der Giftigkeit flüssiger Toxine.

Wert der Giftlösung	Geprüft	in Mengen	Resultat
1,0 Toxin R	nach 4 Tagen:	1 3	lebt †
	nach 30 Tagen:	3	lebt
	nach 33 Tagen:	3	lebt
1,0 Toxin L	nach 3 Tagen:	1,0 2	lebt †
1,0 Toxin L	nach 2 Tagen:	1,0 2,0	lebt †
1,0 Toxin L	nach 4 Tsgen:	3,0	lebt

Züchtung in Bouillon

a) vom Phenolphthaleïnp. zugesetzt 2,4 ccm 5% NaOH auf 1 Liter.

Stamm	Alter der Kultur bei 37°	Filtriert durch	Art der Injektion	Menge	Tier	Resultat
L	8 Tage	Reichelk.	periton.	3	M.	† [1]
				1	„	lebt
				5	Kan.	lebt
				1	„	lebt
	11 Tage	Reichelk.	periton.	3	M.	lebt
	19 Tage	Reichelk.	periton.	3—1	M.	†
	18 Tage 2 Tg. spät. das Toxin geprüft	Reichelk.	periton.	3—2	M.	†
			„	3	„	†
				2	„	lebt
			subkutan	4	„	†
				3	„	lebt
			intravenös	2	„	†
	10 Tage	Reichelk.	periton.	3—1	M.	†
	12 „		„	2,0	„	†
				1	„	lebt
	19 „		„	2	„	†
St. K	5 „		„	5	„	† in 5 Stunden
				2	„	† „ 18 „
(Derselbe Kolben)				3	„	† nach 12 Tagen
			intravenös	5—2	Kan.	lebt
St. K.	8 Tage	Reichelk.	periton.	3	M.	lebt
	11 „		„	3	„	†
				1	„	lebt
(Derselbe Kolben)	19 „			3—2	„	† in 24 Stunden
				1	„	lebt
G	5 Tage	Reichelk.	periton.	2	M.	nach 24 Std. krank } lebt
				1	„	
	10 „		„	2	„	†
				1	„	†
	15 „		„	3	„	†

b) vom Phenolphthaleïnpunkt 3 ccm NaOH 5% auf 1 Liter

Stamm	Alter der Kultur bei 37°	Filtriert durch	Art der Injektion	Menge	Tier	Resultat
St. G	17 Tage	Reichelk.	periton.	3—2—1	M.	†
			subkutan	3	„	lebt
St. K	17 Tage	Reichelk.	subkutan	3—2—1	M.	†
				3	„	lebt
			periton.	5—1	Kan.	lebt

c) Lackmusneutral

Stamm	Alter der Kultur bei 37°	Filtriert durch	Art der Injektion	Menge	Tier	Resultat
G	5 Tage	Reichelk.	periton.	2,1	M.	lebt
	10 „			2,1	„	†
	15 „			2,1	„	†

d) vom Lackmusneutralpunkt 10 ccm normale Sodalösung auf 1 Liter

Stamm	Alter der Kultur bei 37°	Filtriert durch	Art der Injektion	Menge	Tier	Resultat
St. K	10 Tage	Reichelk.	periton.	5,2	M.	lebt
L	10 „		„	3—1	„	†
G	10 „		„	2—1	„	†
K	10 „		„	2—1	„	†

1) Innerhalb 24 Stunden.

toxine (Spasmin, Hämotoxin) und auch an die Typhusgifte, welche ich gemeinschaftlich mit v. Stenitzer seit längerer Zeit bereits studierte*) Ob man durch bestimmte Zusätze oder durch Fällungen die Gifte besser konservieren kann, darüber fehlen bisher Erfahrungen. Ransom, Metschnikoff, Roux und Salimbeni konnten durch Alkohol, Ammonsulfat ihre Gifte fällen und auf diese Weise viel wirksamere Gifte gewinnen. (Ransoms Gifte wirkten noch in Mengen von 0,07 ccm tödlich).

Es ist wahrscheinlich, daß ebenso wie bei den Diphtherie- und Dysenteriebazillen große Unterschiede in den toxigenen Eigenschaften bestehen, auch für die Choleravibrionen es zutreffen dürfte. Es wird eben Vibrionen geben, die einmal in der Kultur mehr, ein andermal weniger lösliches Toxin bilden dürften. Darüber müssen weitere Untersuchungen Aufschluß bringen, unsere Kenntnisse, über die Choleratoxine sind ja jüngsten Datums und deswegen noch unvollständig. In neueren Untersuchungen über toxigene Eigenschaften von Choleravibrionen, die ich gemeinschaftlich mit Dr. Russ durchführe, ist es uns gelungen, von Choleravibrionen aus Rußland, welche ich Herrn Dr. Wladimiroff verdanke und aus Cholerastämmen, welche ich von H. Prof. Dunbar erhielt, ebenso wie aus den Saigonstämmen Toxine zu gewinnen.

Neben diesen löslichen Giften der Choleravibrionen die durch Antitoxine neutralisierbar sind, hat in letzter Zeit Macfadyen auch im Bakterienleib giftige Substanzen nachgewiesen, **sogenannte Endotoxine**, die er ebenfalls mit einem Antitoxin gewonnen mit diesen Giften neutralisieren konnte. Der Nachweis, daß die Bakterienleiber giftig sind, hat ja bereits Wassermann und Pfeiffer dadurch erbracht, daß die mit Chloroform oder Wärme abgetöteten Kulturen, Tod der Meerschweinchen herbeiführten. Es gelang aber diesen Forschern nicht, mit den abgetöteten Choleravibrionen Meerschweinchen antitoxisch zu immunisieren und auch nicht ein Antitoxin zu gewinnen.

Macfadyen benützte zur Gewinnung der endogenen Toxine die Gefriermethode**). Die wässerige Emulsion (18stündige Agarkulturen) wurde zentrifugiert und gewaschen. Die Bakterien werden dann bei Temperatur der flüssigen Luft zerkleinert und das Produkt in einer Kalilauge 1:1000 aufgenommen. Beim Zentrifugieren bekommt man eine obere Schicht aus 10% Extrakt der Bazillen bestehend. Diese wurde abgehoben und rasch mit Chloroform behandelt. Die Zellsäfte waren steril und akut toxisch. Durchschnittlich war $^1/_{10}$—$^1/_{20}$ ccm toxisch wenn die Kultur virulent war. Waren die Kulturen weniger virulent, so war die Toxicität 0,3—0,5. Diese Gifte wirken bei Meerschweinchen (300 g) peritoneal und auch subkutan. Für Kaninchen sind sie bei intravenöser Injektion (0,3—0,5 ccm) akut giftig. Die aufbewahrten Säfte verlieren rasch an Toxicität, auch werden sie durch höhere Temperaturen 55—60° geschädigt.

Daß diese Gifte als Toxine anzusehen sind, ist durch die Neutralisationsversuche mit Antitoxin bewiesen. Leider gibt Macfadyen nicht näher an, wie der Vibrio, der zu diesen Versuchen benützt wurde, sich gegenüber einem agglutinierenden Choleraserum oder im Pfeifferschen Peritonealversuch verhält.

Ganz analoge Versuche, wie sie Macfadyen angestellt hatte, wurden bereits früher schon von M. Hahn durchgeführt. Allerdings kommt

---

*) S. dieses Handbuch: v. Stenitzer, Über Toxine des Typhusbazillus.
**) S. dieses Handbuch: E. P. Pick.

M. Hahn auf Grund seiner Versuche zu dem Schluß, daß der Nachweis spezifischer Toxine nicht gelungen ist. Demgegenüber müssen wir auf Grund Hahns eigener Versuche die Ansicht vertreten, daß die von ihm aus Choleravibrionen durch Autolyse gewonnenen endogenen Gifte die Charaktere aufweisen, die wir von Toxinen verlangen.

Hahn konnte nämlich mittels Autolyse durch 48 Stunden aus Choleravibrionen Gifte gewinnen, welche in Mengen von 0,5—1,5 für Meerschweinchen bei subkutaner Injektion tödlich wirkten. Die Giftwerte waren inkonstant gewöhnlich 0,3 ccm, ein andermal erst in Mengen von 2—3 ccm wirksam. Auch für Pferd und Ziege erwiesen sich die Autolysate giftig. Ein Gift, das für Meerschweinchen in Mengen von 1 ccm tödlich war, tötete ein Pferd nach subkutaner Injektion von 10 ccm.

Diese Gifte hatten antigene Eigenschaften. Das Serum einer vorbehandelten Ziege und eines Pferdes hatte neutralisierende Eigenschaften. Daß Hahn mit dem Toxin kleine Tiere nicht immunisieren konnte beweist nichts, da ja gerade diese Tiere, die er benützt hatte, keine nennenswerten Antitoxinproduzenten sein müssen. Immerhin gelang es Hahn eine Ziege und ein Pferd aktiv zu immunisieren, so daß trotz der Giftempfindlichkeit dieser Tiere große Dosen der endogenen Gifte vertragen wurden. Das Serum dieser Tiere vermochte auch die Gifte zu neutralisieren.

Wir glauben, daß die Versuche Hahns sich mit den von Macfadyen decken und ebenso beweisen, daß der Choleravibrio im Leib endogenes Gift enthält, welches als Toxin charakterisiert zu werden verdient.

Das Toxin der 6 El Torvibrionen (F. Gottschlich).

Trotzdem die 6 El Torvibrionen kulturell und biologisch sich als identisch mit dem Choleravibrio Kochs erwiesen haben (E. und F. Gottschlich, Kolle, Gaffky), erscheint es doch berechtigt zu sein, diesen Vibrionen eine gesonderte Stellung einräumen zu sollen. Wie in meinen Arbeiten über diese Vibrionen ausführlich gezeigt wird, lassen sich zunächst diese Vibrionen vom Choleravibrio durch die hämotoxischen Eigenschaften differenzieren. Die an sehr zahlreichen Choleravibrionen (aus klinisch nachgewiesenen Cholerafällen in Epidemien gezüchtet) ausgeführten Untersuchungen lehren, daß dem Choleravibrio die Eigenschaft, Hämotoxine zu produzieren, nicht zukommt. Es gelang uns weder in verschiedenaltrigen Bouillonkulturen von Choleravibrionen, noch in der Ziegenblutagarplatte und auch nicht in peritonealen Exudaten infizierter Meerschweinchen Hämotoxine nachzuweisen. Selbst die toxinproduzierenden Stämme aus Saigon und die aus Rußland und Deutschland stammenden verhalten sich so wie alle anderen Choleravibrionen, auch sie bilden kein Hämotoxin. Wenn nun die kulturell und biologisch identischen 6 El Torvibrionen hämotoxische Eigenschaft besitzen, diese Eigenschaft konstant durch Jahre behalten und sich diesbezüglich genau so verhalten, wie eine Reihe anderer biologisch differenter Vibrionen, soll man die Hämotoxine als einen zufälligen Befund ansehen, wie es E. Gottschlich zu glauben scheint. Dazu kommt noch, daß die Toxine dieser Vibrionen sich von den Toxinen des Choleravibrio Saigon prinzipiell unterscheiden. Die Toxine der Saigonvibrionen, der russischen Choleravibrionen und der aus Deutschland stammenden wirken niemals bei intravenöser Injektion akut tödlich, sowie die El Tortoxine. Schon diese Gründe allein wären zwingend, die El Torvibrionen vom Choleravibrio Koch abzutrennen.

Darstellung der Toxine und deren Eigenschaften.

Die Gifte lassen sich aus Fleischbouillon*) gewinnen. Es konnten die Gifte in Lakmusneutraler, in einer Bouillon die vom Lakmusneutralpunkt 2,4 NaOH 5% pro Liter Zusatz hatte und in einer die vom Lakmusneutralpunkt mit 10 ccm Normalsodalösung pro Liter alkalisiert war nachgewiesen worden. In diesen verschieden alkalisierten Nährmedien (2 Liter Kolben), ließen sich die Gifte konstant nachweisen. Bereits in drei Tagen alten Kulturen die bei 37° gehalten werden, waren Gifte vorhanden. Die Stärke der Gifte ist variierend Bei vergleichenden Untersuchungen der Gifte aus Lackmusneutraler und einer die mit 2,4 ccm 5% NaOH alkalisiert war, ließen sich gleich starke Gifte nachweisen. Die Giftigkeit beträgt gewöhnlich 0,5 ccm, seltener 0,1 ccm. Diese Menge tötet in 5—20 Minuten Kaninchen vom Gewichte 600—800 g bei intravenöser Injektion. Die Wirkung niederer Dosen 0,1—0,25 äußert sich in einem später auftretenden Tod (nach einigen Stunden). Die Wirksamkeit des Giftes beurteilen wir darnach, ob es noch imstande ist, Kaninchen innerhalb einer Stunde zu töten.

Die Prüfung der Gifte erfolgt zunächst so, daß die Kulturflüssigkeit ohne Filtration intravenös Kaninchen injiziert wird, dann erst, wenn wir uns von der Giftigkeit überzeugt haben, versuchen wir die Filtration. Diese Vorprüfung nehmen wir deswegen vor, weil der Zeitpunkt, in welchem Gifte vorhanden sein sollen, nicht sicher festzustellen ist. Die Gifte lassen sich bereits nach drei Tagen nachweisen, können aber auch erst später auftreten. Impft man beispielsweise drei Bouillonkölbchen (200 g) mit demselben Stamme, so kann man nach gleicher Zeit in den einzelnen Kolben verschiedenwertige Gifte nachweisen. Der eine Kolben enthält ein Gift, welches akut wirkt, die anderen zwei Kolben ein Gift, welches in denselben Mengen erst in 24 Stunden tödlich wirksam ist. Diese Vorprüfung eignet sich überhaupt dazu, über die Giftbildung näheres zu erfahren, da durch die Filtration einmal mehr, einmal weniger Verlust zu verzeichnen ist. Für den Ausfall des Versuches spielen die Bakterien bei der raschen Wirkung des Toxins keine Rolle. Bei derartigen systematischen Prüfungen ließ sich nachweisen, daß die Stärke des Giftes in derselben Kultur gleich ist, ob nach 3, nach 7, nach 15 Tagen die Kultur geprüft wird (0,5 ccm). Erst nach 37 Tagen hat der Giftwert abgenommen, so daß nicht einmal 1,0 ccm wirksam war. Jedenfalls haben diese Untersuchungen gezeigt, daß bereits in 3—4 Tagen alten Kulturen wirksame Gifte nachzuweisen sind.

Erst wenn die Vorprüfung ein wirksames Gift ergeben hat, wird die Kultur filtriert. Zur Filtration haben wir anfangs frische ungebrauchte Reichelkerzen benützt. Die filtrierten Gifte erweisen

---

*) Die Bouillon ist aus fettfreiem Rindfleisch gewonnen, enthält $1\frac{1}{2}$% Pepton Witte und $\frac{1}{2}$% Kochsalz. Das Fleisch bleibt 24 Stunden bei Zimmertemperatur mit Wasser versetzt stehen. Darnach wird es kurz über der Flamme gekocht, fettfrei filtriert und mit Pepton und Kochsalz versetzt. Nach abermaligem Kochen im Dampftopf (2—3 Stunden) wird die Brühe neutralisiert (20% Natronlauge) und alkalisiert mit Normalsodalösung. Zur Impfung wird gewöhnlich nur frische 24stündige Agarkultur benutzt und 1 Öse davon genommen. Die Kulturen werden bei 37° auf schiefem alkal. Agar gehalten und jede Woche überimpft. Die toxigene Eigenschaft dieser Kulturen ändert sich seit 2 Jahren nicht. Auch die Stämme, die mir heuer aus dem Berliner Institut für Infektionskrankheiten freundlichst überlassen wurden, sind toxigen.

sich vielfach schwächer als die Rohgifte, was durch die Eigenschaft der Filtermasse, Gift zurückzuhalten, zu erklären ist. Die Reichkelkerzen sind diesbezüglich nicht gleich, insofern als eine Kerze viel Gift zurückhält, eine andere weniger oder fast gar keines. Beispielsweise war das Rohgift vor der Filtration in Mengen von 1 ccm in 5 Minuten wirksam, nach der Filtration wirkten 2 ccm erst in einer Stunde. Ein andermal war das Filtrat ungeschwächt, so daß noch 5 ccm in 10 Minuten und 0,25 ccm in einer Stunde wirksam waren. Interessant ist, daß verschiedenartige Toxine derselben Kultur, das Hämotoxin und das tödliche Toxin verschieden sich verhalten, indem das Toxin durch ein Filter zurückgehalten, dagegen das Hämotoxin nicht.

Um diesem Nachteile abzuhelfen, durch Filtration abgeschwächte Gifte zu erhalten, filtrieren wir jetzt die mit 0,5 % Karbolsäure versetzte Kultur durch Papierfilter solange, bis die Flüssigkeit klar ist. Die derart gewonnenen Gifte lassen sich zu den Versuchen ebenso gut benützen, da die Menge Karbolsäure, wie wir durch eigene Versuche feststellen konnten, keine nachteiligen Wirkungen hat und in Mengen, in welchen sich die Giftwerte bewegen, vertragen wird.

Die Wirkung dieser Gifte auf den Tierkörper äußert sich darin, daß nach intravenöser Injektion wirksamer Mengen der Tod der Tiere in ganz kurzer Zeit erfolgt. Oft ist das Tier sofort nach der Injektion schon krank und geht in 3—5 Minuten zugrunde. In der Regel tritt der Tod innerhalb von 10—30 Minuten ein, wenn das Gift wirksam ist, auf geringere Mengen des akut wirkenden Giftes gehen die Tiere innerhalb einiger Stunden oder auch gar nicht zugrunde. Die Krankheitserscheinungen äußern sich darin, daß die Atemfrequenz der Tiere zunimmt, die Tiere können sich bald danach nicht mehr aufrecht erhalten und gehen nach einigen terminalen Konvulsionen zugrunde. Bei der sofort vorgenommenen Obduktion findet man das Herz erweitert, gebläht, in den Ventrikeln flüssiges Blut. An den Organen sind mikroskopisch keine Veränderungen wahrzunehmen. Mit dem Hämotoxin den Tod in Zusammenhang zu bringen, geht nicht an, weil an dem sofort nach dem Tod untersuchten Blut keinerlei Zeichen von Auflösung zu sehen sind. Außerdem läßt sich ja direkt nachweisen, daß neben dem Hämotoxin noch ein Toxin vorhanden ist. Es gelingt manchmal mittels Filtration durch Reichelkerzen das Hämotoxin vom Toxin zu trennen. Dann ließ sich auch zeigen, daß in alten Bouillonkulturen das früher vorhandene akut wirkende Toxin nicht mehr nachweisbar ist, dagegen wohl das Hämotoxin. Auch durch Versuche mit normalem Pferdeserum (s. Vibrio Nasik) läßt sich die Verschiedenheit der Hämotoxine und Toxine demonstrieren. Es besteht demnach kein Zweifel, daß wir die Wirkung im Tierkörper auf ein bestimmtes Gift zurückzuführen haben, welches ein spezifisches Produkt der El Torvibrionen ist und welches wir, wie später gezeigt wird, als ein Toxin charakterisieren müssen. Dieses Gift wirkt in der beschriebenen Weise akut tödlich nur bei intravenöser Injektion und zwar auf Kaninchen, Meerschweinchen, Tauben, Hühner in gleicher Weise. Bei intraperitonealer Injektion wirkt das Gift ebenfalls aber viel langsamer.

Ein Gift, das Meerschweinchen intravenös in Mengen von 0,5 innerhalb 15 Minuten tötete, hat intraperitoneal erst nach 8—16 Stunden in Mengen von 5,0 gewirkt, 1 ccm tötete erst nach 24 Stunden. Dasselbe läßt sich auch an Kaninchen zeigen. Noch weniger wirksam wird das Gift bei subkutaner Einverleibung. Kaninchen und

Meerschweinchen bekommen auf Mengen von 5 ccm Infiltrate, gehen aber nicht zugrunde, erst wenn man noch größere Giftmengen anwendet. Auf welches lebenswichtige Organ dieses Gift einwirkt, ist bisher nicht ganz sicher festgestellt. Nach den Untersuchungen ROTHBERGERS liegt eine Giftwirkung auf das Herz vor. Das Gift wirkt im LANGENDORFFschen Versuch, wobei statt Blut RINGERsche Lösung verwendet wird, ebenso wie im Organismus.

Das Gift läßt sich durch ein von mit diesem Gift immunisierten Ziegen, Pferden gewonnenen Antitoxin in vitro und auch bei getrennter Injektion neutralisieren, womit wohl die Toxinnatur des giftigen Körpers erwiesen ist.

Was die Widerstandsfähigkeit des Giftes äußeren Einflüssen gegenüber (Licht, Luft, höhere Temperaturen usw.) betrifft, so sind unserer Erfahrung nach diese Gifte viel haltbarer als die der Saigonvibrionen. Eine derartige rasche Abnahme des Giftwertes, wie sie so häufig bei flüssigem Saigontoxin beobachtet wird, findet bei dem El Tortoxin nicht statt. Das Toxin behält monatelang im Dunkeln bei Zimmertemperatur gehalten seinen Giftwert. Ebenso verhält sich das Hämotoxin, welches monatelang ohne abgeschwächt zu werden sich flüssig konservieren läßt. Bei höheren Temperaturen (70° durch $^1/_2$ Stunde) wird das Toxin geschädigt, ebenso das Hämotoxin. Die Versuche, diese Gifte mit Ammonsulfat zu konzentrieren fielen nicht günstig aus, es läßt sich nicht vollständig quantitativ ausfällen, wie beispielsweise folgender Versuch illustriert: 10 ccm Rohgift werden mit Ammonsulfat bis zur Sättigung versetzt. Der Niederschlag in 10 ccm Kochsalzlösung gelöst, davon wirken 0,5 ccm erst in 6 – 7 Stunden, wogegen 0,5 der ursprünglichen Lösung in 5 Minuten wirksam sind.

v. EISLER hat im Institute weitere Versuche angestellt, um das Gift zu konzentrieren. Weder mit Alkohol, noch mit phosporsaurem Natron, noch mit Magnesiumsulfat gelang es die Gifte in konzentrierter Form zu gewinnen. Weitere Versuche v. EISLERS zeigten, daß das Gift durch Trypsin zerstört wird. Durch H_2O_2 wird es stark abgeschwächt. Die Versuche DOERRS*) über die ungiftigen Modifikationen der Toxine durch Säuren lehren, daß die Säuregrade, welche Dysenterietoxin, Diphtherie- und Staphylotoxin in restituierbare ungiftige Modifikationen umwandeln, das Gift der El Torvibrionen zerstören.

Das Toxin des Vibrio Nasik.

Im Jahre 1903 gelang es mir, in Bouillonkulturen des Vibrio Nasik giftige Substanzen nachzuweisen, welche bei intravenöser Injektion Tiere akut innerhalb weniger Minuten töteten. Für diese Gifte ließ sich der Nachweis erbringen, daß ihnen der Charakter der bakteriellen Toxine zukommt. Somit war festgestellt, daß das Inkubationsstadium, das bis dahin eine kardinale Eigenschaft bakterieller Toxine war, nicht mehr als das angesehen werden kann, da es bakterielle Toxine gibt, die sofort ohne Inkubation zu wirken imstande sind.

Der toxinproduzierende Vibrio stammt aus Indien, wurde von SIMOND aus den Fäces eines an choleraähnlichen Symptomen verstorbenen Menschen gezüchtet**) und als Choleravibrio angesehen. Diesen Vibrio, den wir durch die Freundlichkeit des Institut Pasteur erhielten, habe

*) S. dieses Handbuch: DOERR, Das Dysenterietoxin.
**) Nach BRAU und DENIERS Arbeit „isolé d'un cas de choléra typique".

ich näher untersucht und konnte mittelst biologischer Reaktionen feststellen, daß er sicher nicht als Choleravibrio anzusehen sei. Dieser Vibrio wurde von einem Choleraserum, welches den Choleravibrio noch in 20000facher Verdünnung agglutiniert, bloß in Verdünnungen 1:400 agglutiniert. Auch mittelst Präzipitation ließ sich die Differenzierung gegenüber dem Choleravibrio durchführen. Weiter war für die Verschiedenheit auch noch die hämotoxische Eigenschaft bestimmend, die nach unseren damaligen Untersuchungen bereits bei Choleravibrionen nicht vorhanden war. Ob dieser Vibrio mit dem Krankheitsfall in Beziehung zu bringen sein dürfte ist bis heute nicht entschieden. Jedenfalls steht er heute nicht mehr isoliert da, nachdem unsere weiteren Untersuchungen eine Reihe von Vibrionen aufgedeckt haben, die ebenfalls aus menschlichen Krankheitsfällen stammen, ebenso wie die Vibrio Nasik vom Choleravibrio biologisch abzutrennen sind und auch akut wirkendes Toxin produzieren. Es sind dies zunächst 32 Vibrionen aus El Tor, die E. Gottschlich aus Fäces von Menschen gezüchtet hat, die ebenso an Colitis, Dysenterie starben wie die Menschen, bei welchen die 6 El Torvibrionen gefunden wurden. Außerdem konnten wir zeigen, daß F. Gottschlich ähnliche Vibrionen in Ägypten aus Menschen gezüchtet hat (Vibrio 35). Der Vibrio Massauah und noch andere sind hierher zu zählen. Danach ist es nicht unwahrscheinlich, daß es neben dem Vibrio cholerae und den noch verwandten 6 El Torvibrionen eine Reihe von Vibrionen gibt, die bei Menschen cholera-dysenterieähnliche Erkrankungen hervorrufen. Allen diesen Vibrionen kommt neben dem Hämotoxin ein akut wirkendes Toxin zu. Alle diese Toxine hier näher zu beschreiben erscheint überflüssig. Soweit unsere bisherigen Kenntnisse reichen, stehen alle in der Wirkung und Eigenschaften einander sehr nahe. Über das beststudierte Toxin sei deshalb hier ausführlicher berichtet.

Gewinnung des Toxins und dessen Eigenschaften.

Dieses Gift ist aus Bouillonkulturen denen die Alkaleszenz der für die El Tortoxine gebräuchlichen zukommt, zu gewinnen. Nach 4 Tagen läßt sich bereits die Giftigkeit der Bouillonkultur nachweisen, auch 1—2 Monate alte Kulturen enthielten noch akut wirkendes Gift. Man kann das Gift bakterienfrei mittelst Filtration durch Reichel-, Pukal-, Chamberlandkerzen gewinnen. Allerdings verliert man bei der Filtration oft das 5—10fache an Giftwert.

Was die Eigenschaft des Giftes betrifft, so kann man zeigen, daß es bei intravenöser Injektion akut tödlich wirkt. Kaninchen, Meerschweinchen, Hunde, Tauben sind für dieses Gift empfindlich. Mengen von 1,0—0,5 intravenös injiziert rufen sofort nach der Injektion beschleunigte Respiration hervor, und unter Lähmungserscheinungen gehen die Tiere innerhalb von 5—30 Minuten zu Grunde. Rothberger hat dieses Gift einer experimentellen Analyse unterzogen. Rothberger schildert die Folgen der Giftinjektion bei Kaninchen folgendermaßen: Nach 5—10 Minuten zeigen sich Zeichen einer allgemeinen Hinfälligkeit, das Tier stützt den Kopf auf die Unterlage, streckt die Extremitäten von sich und bald sinkt der Kopf zur Seite, das Tier liegt wie gelähmt da. Nach einer vorübergehenden Erholung stellt sich die frühere Prostration ein. Die Atmung ist jetzt verlangsamt stoßweise, die Dyspnoe nimmt immer mehr zu und der Tod erfolgt häufig unter Krämpfen. Bei Eröffnung des Thorax findet man das Herz maximal dilatiert, mit flüssigem Blut gefüllt.

Bei Anwendung geringerer Giftdosen, welche erst nach 1—2 Stunden töten, beobachtet man im wesentlichen dieselben Erscheinungen. Die geringere Giftmenge bewirkt eine Verlängerung des Inkubationsstadiums. Eine Wirkung, welche bei akuter Wirkung nicht vorhanden ist, hier aber deutlich zu Tage tritt, ist die auf den Darm. Das Tier entleert anfangs feuchte Skybala, dann dünnbreiige, flüssige Fäkalmassen (diese Darmwirkung konnte ich auch bei anderen Vibrionen, die nicht tödlich wirken, konstatieren).

Die weitere Analyse der Erscheinungen die am Kymographion von Rothberger vorgenommen wurde, hat folgendes ergeben: Was zunächst die Atmung anbelangt, so zeigt dieselbe manchmal nach der Einverleibung der Kultur nur mäßige Beschleunigung, welche aber bald vorübergeht. Dann setzt Dyspnoe ein, indem zuerst eine starke rasch fortschreitende Abnahme der Frequenz, dann auch der Tiefe der Atemzüge auftritt, während welche das Tier typische Erstickungskrämpfe aufweist. Der Blutdruck zeigt meist bis zum Eintritt der Dyspnoe keine nennenswerte Veränderung. Mit dem Eintritt der Dyspnoe zeigt der Blutdruck starke Schwankungen, eine typische, dyspnoische Steigerung des Blutdrucks tritt aber nicht ein, vielmehr beginnt derselbe stetig zu sinken. Über die Lokalisation der Giftwirkung haben dann weitere Versuche Aufschluß gegeben. Die Einleitung der künstlichen Atmung im Stadium des fortschreitenden Blutdruckabfalles vermochte nicht den Tod hinauszuschieben. Ferner zeigte es sich, daß der Tod beim kuraresierten, von vornherein künstlich geatmeten Tier nicht später eintrat als sonst, so daß auch daraus nicht an eine zentrale Wirkung des Giftes auf das Atemzentrum zu denken war. Die Wirkung des Giftes auf die Kreislauforgane ließ sich am kuraresierten Tier prägnanter nachweisen. Die dem stetigen Druckabfall vorangehende Steigerung gehört zu den typischen Erscheinungen. Bei beginnendem Druckabfall kann man am bloßgelegten Herzen eine Blähung wahrnehmen. Mittels der Registrierung der vier Herzabteilungen nach Knoll konnte die Wirkung des Giftes, die nach alledem eine Herzwirkung zu sein scheint, genau präzisiert werden. Diese Registrierung zeigt nicht nur die Frequenz der Herzschläge an, sondern auch die Größe der Exkursion jedes Schlages. Vor dem Abfall des Blutdruckes konstatiert man eine Verkleinerung der Ausschläge am rechten Herzen, während das linke Herz noch ungeschwächt arbeitet. Bei zunehmender Blähung des rechten Ventrikels werden auch die Ausschläge des linken Herzens schwächer und nun beginnt der Druck zu sinken. Durch eigens angestellte Versuche konnte Rothberger mittels Isolierung des Herz-Lungenkreislaufs nach Hering den Zusammenhang der Blähung und das Undeutlichwerden des Pulses vor dem Abfall des Blutdrucks direkt beweisen und die Unabhängigkeit dieser Befunde vom Vasomoterenapparate ermitteln. Auch die Kompression der Aorta, welcher Eingriff bei intaktem Herzen eine Steigerung des Blutdrucks zur Folge hat und auch die Injektion von Adrenalin waren hier fast wirkungslos.

Rothbergers weitere Versuche gingen darauf hinaus, den Mechanismus der Wirkung des Giftes aufs Herz direkt zu ermitteln. Zunächst wurden Versuche am überlebenden Katzenherzen gemacht, welches mit Lockescher Lösung (0,03 % Na_2CO_3, 0,042 % KCl, 0,024 % $CaCl_2$, 0,9 % NaCl. 1 % Dextrose) gespeist. Nachdem das Herz längere Zeit funktioniert, wird der Lösung das Gift zugesetzt (4—8 ccm). Auch hier trat die Wirkung des Giftes prompt ein. Schon nach $^1/_2$—1 Minute wurden die

Kontraktionen des Herzens kleiner und sistierten bald ganz. meist bevor die ganze Giftmenge das Herz passiert hatte.

Wenn auch nach diesem Ergebnisse die Wirkung des Giftes auf das Herz zu beziehen ist, läßt Rothberger nur noch die Möglichkeit offen, daß infolge der Alteration des Blutes (Beschleunigung der Gerinnung, hyalin aussehende Schollen im nativen Blut der vergifteten Tiere, streifenförmige Blutmengen an Herzmuskel, hämorrhagische Infarkte der Lunge) kapilläre Embolien den Tod beschleunigen könnten.

Literatur.

Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, 1906.
Brau und Denier, Comptes rend. de l'Acad. des sc. 1906, No. 12. Ann. de l'Inst. Pasteur 1896, No. 7.
Cantani, Deutsche med. Wochenschr. 1886.
Gamaleia, Arch. de méd. expér. 1892.
Gruber und Wiener, Wiener klin. Wochenschr. 1892; Arch. für Hygiene 1892.
Hahn, Münchener med. Wochenschr. 1906, No. 23.
Hueppe und Scholl, Deutsche med. Wochenschr. 1891; Arch. für Hygiene 1892.
Koch, Berliner klin. Wochenschr. 1884, S. 498.
Klemperer, Berliner klin. Wochenschr. 1892.
Kraus, Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXIV; Centralbl. für Bakt. 1906; Wiener klin. Wochenschr. 1906, No. 22.
Kraus und Pribram, Wiener klin. Wochenschr. 1905, No. 39; Centralbl. f. Bakt. 1906.
Kraus und Prantschoff, Wiener klin. Wochenschr. 1906, No. 11; Centralbl. für Bakt. 1906.
Kraus und Doerr, Zeitschr. f. Hygiene 1906.
Macfadyen, Centralbl. für Bakt. 1907.
Metschnikoff, Roux und Salimbeni, Ann. de l'Inst. Pasteur 1896, No. 5.
Nicati und Rietsch, Compt. rend. de l'Acad. des sc. 1884.
Petri, Arbeit aus dem K. Gesundheitsamte 1890, Vol. VI.
Pfeiffer, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XI, XV, XVIII, XX.
Pfeiffer und Wassermann, Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIV.
Ransom, Deutsche med. Wochenschr. 1895, No. 29.
Rothberger, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII.
Wassermann, Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIV.
Wesbrook, Ann. de l'Institut Pasteur 1894.

IX.

Über die Toxine (Endotoxine) der Typhusbazillen.

Von

Dr. R. von Stenitzer*)

in Wien.

Einleitung.

Das Problem, giftige Substanzen aus Typhuskulturen darzustellen, hat zuerst Brieger in Angriff genommen. Die Substanz, die er durch Fällung der Kulturen mit Quecksilberchlorid darstellte, und welche sich als giftig für Mäuse, Meerschweinchen erwies nannte er Typhotoxin. Ein echtes Bakterientoxin scheint Brieger nicht in Händen gehabt zu haben, da die Substanz nach Schütze keine antigenen Eigenschaften zeigte.

Die Annahme, daß es sich bei der Typhusinfektion um eine Vergiftung (Intoxikation) handle, wurde durch Tierversuche von Sirotinin, Beumer und Peiper, Fraenkel und Simonds experimentell zu stützen versucht.

Es zeigte sich, daß der Tod der Versuchstiere nicht durch eine Infektion, sondern durch Vergiftung erfolge, indem auch im strömenden Wasserdampf von 100° durch 5—10 Minuten sterilisierte oder keimfrei filtrierte Kulturaufschwemmungen, ebenso wie lebende Kulturen deletär wirken (Sirotinin). Auch bei Infektionen konnte niemals eine Vermehrung der eingeführten Bazillen im Tierkörper beobachtet werden (Sirotinin, Beumer und Peiper).

Die Frage nach der Natur dieser Gifte blieb zunächst unentschieden. Wohl versuchte Bitter den Beweis nach der Toxinnatur zu erbringen, indem er mit Giften, die er aus Typhusbouillonkulturen durch Filtration gewann, Kaninchen immunisierte. Das Kaninchenimmuniserum zeigte aber, wie schon R. Pfeiffer bemerkte, einen nicht über das Normalserum hinausgehenden Neutralisationswert.

Einen neuen und besonderen Standpunkt vertrat nun R. Pfeiffer, den er dahingehend präzisierte, daß die Intoxikation von Giftstoffen hervorgerufen werde, die aus den zugrunde gehenden Bakterien stammen, das heißt von Giftstoffen, die erst bei der Auflösung des Bakterienleibes frei werden und zur Wirksamkeit im Organismus gelangen. Diesen *endogenen Giften* (Endotoxine Pfeiffers) *mangelt zum Unterschied*

*) Diese Zusammenfassung basiert auf gemeinschaftlichen Versuchen, welche ich mit Kraus (s. Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 12) ausgeführt habe.

von den gewöhnlichen Bakterientoxinen die antigene Natur, sie sind nicht imstande, neutralisierende Gegengifte zu erzeugen. Das Serum der mit ihnen immunisierten Tiere zeigt keine antitoxischen sondern lediglich bakteriolytische Eigenschaften. Nach der auf diesen Befund basierten Theorie (Endotoxintheorie) ist eine heilende Wirkung der mit diesen Giften gewonnenen Immunsera nicht zu erwarten, ja im Gegenteil unter Umständen eine Zunahme der Vergiftung zu befürchten, indem durch die bakterienauflösende Eigenschaft des Serums die plötzlich in größerer Menge freiwerdenden nicht neutralisierbaren Gifte desto vehementer ihre deletäre Wirkung entfalten können. Daß auch echte neutralisierbare Toxine von Typhusbakterien gebildet werden, dafür würden die Arbeiten von Beumer und Peiper, Chantemesse und namentlich neuere Arbeiten von Besredka, Macfadyen, Rodet und Lagriffoul sprechen.

Beumer und Peiper fanden im Serum von Hammeln, die mit abgetöteten Typhusbouillonkulturen immunisiert waren und Chantemesse im Serum eines mit Kulturfiltraten immunisierten Pferdes deutliche antitoxische Wirkung.

Ganz besonders aber sprechen für die Toxinnatur der mittelst besonderer Methoden aus den Bazillen dargestellten endogenen Gifte die Arbeiten von Besredka und Macfadyen, welche zeigen konnten, daß ihre Gifte mittelst Immunsera in ziemlich erheblichem Maße neutralisierbar seien. Wenn der Neutralisationswert dieser antitoxischen Sera sich auch im Vergleich zu anderen (Diphtherie und Tetanus) in verhältnismäßig niederen Grenzen hielt, so erscheint doch die prinzipielle Frage nach der Toxinnatur dieser Gifte in positivem Sinne entschieden. Diese Frage hat in letzter Zeit auch deshalb besonders an Interesse gewonnen, weil, wie die Erfahrungen mit dem Dysenterieantitoxin gezeigt haben, auch verhältnismäßig niederwertige antitoxische Immunsera imstande sind, einen zweifellos günstigen Einfluß auf den natürlichen Krankheitsprozeß auszuüben. Erinnern möchte ich an dieser Stelle auch noch an die ursprünglichen niederen in ihrer heilenden Wirkung aber nicht bestrittenen Werte des Diphtherieserums.

Ich glaube darauf besonderes Gewicht legen zu müssen, da Hahn, gestützt auf eigene Versuche mit Cholera- und Typhusgift, namentlich in Anbetracht der erzielten niederen antitoxischen Werte seiner Immunsera sich bewogen fühlt, diesen Giften eine Sonderstellung im Sinne Pfeiffers einzuräumen.

Nach den bisherigen Resultaten, auch gestützt auf eigene Versuche, erscheint es doch gerechtfertigt, von echten Typhustoxinen zu sprechen. Es soll dabei die Frage, ob dieselben nur endozellulär vorhanden sind, oder auch sekretorisch gebildet werden, unberührt bleiben, da daraufhin gerichtete Untersuchungen, die zu einer befriedigenden Beantwortung dieser Frage genügten, nicht entscheidend sind. In der angeführten Arbeit von Kraus und von mir (Wiener klin. Wochenschr. 1907) konnten wir zeigen, daß das mit Endotoxin gewonnene Serum von Besredka imstande war, unser lösliches Typhustoxin (Filtrate aus Bouillonkulturen) zu neutralisieren. Daraus läßt sich wohl mit großer Wahrscheinlichkeit schließen, daß die endocellulären Toxine Besredkas mit den in Filtraten nachweisbaren identisch sein dürften. (Vergleiche Kapitel Choleratoxine.)

Nach den Experimenten von Lange, welche durch Bail (Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 11) eine Bestätigung fanden, läßt sich auch eine Giftsekretion im Tierkörper nachweisen; Lange konnte nämlich zeigen,

daß bei peritonealer Infektion bei Meerschweinchen, im Momente des Auftretens von Intoxikationszeichen (Absinken der Temperatur, allgemeine Schwäche usw.) keine immobilisierte noch destruierte (Körnchen) Bazillen sich vorfinden. Wohl aber fand er das in diesem Moment entnommene, mit phys. NaCl verdünnte und filtrierte (Berkefeld oder Chamberland) Peritonealexsudat auf Meerschweinchen toxisch.

Toxine (Endotoxine).

Darstellungsmethoden: Als eine wirksame Methode zur Darstellung giftiger Substanzen aus Typhusbazillen erwies sich bis dato jene, welche bezweckt, die in der Leibessubstanz der Bakterien befindlichen endogenen Gifte mit möglichster Vermeidung irgend einer Zustandsänderung und mithin ihrer physiologischen Wirkung zu gewinnen. Die Methodik beruht im allgemeinen auf dem Prinzip der Buchner-Hahnschen Plasmingewinnung.

Die Methode besteht in einer mechanischen Destruktion der Bakterienleiber und in einer Abpressung des durch die Zertrümmerung der Leiber resp. ihrer Hüllen freigewordenen Plasmas. Die Bakterienmasse (Agarkultur) wird mit Quarzsand und Kieselgur zerrieben, die entstandene knollige Masse mit Wasser oder 20% Glyzerinlösung oder physiologischer Kochsalzlösung so lange versetzt, bis die Masse eine Teigkonsistenz annimmt, dieser Teig in ein derbes Preßtuch eingeschlossen und in der Buchnerschen hydraulischen Presse unter allmählich zunehmendem Druck von 4—500 Atmosphären abgepreßt. Der Preßsaft kann durch dichte Filter geklärt und durch Chloroformzusatz konserviert werden. (Genaueres siehe Pick: Dieses Handbuch.) Die von Hahn so aus Typhusbakterien gewonnene Substanz wurde Typhoplasmin genannt. Dieselbe bewirkte bei Meerschweinchen nach intraperitonealer Injektion lediglich nur Temperatursteigerung. Zu positiven Resultaten gelangte nun unter Nutzanwendung des Buchner-Hahnschen Prinzipes Macfadyen. Er bediente sich an Stelle der hydraulischen Presse eines eigens konstruierten Apparates, der es ermöglichte, bei der Temperatur der flüssigen Luft, also im festgefrorenen Zustande die Bazillen zu zerreiben. (Beschreibung des Apparates siehe: Pick l. c.) Er verfuhr dabei folgendermaßen: Direkt aus der Bauchhöhle von Meerschweinchen isolierte Typhusbazillen wurden in Rouxflaschen 18 Stunden bei Bruttemperatur gezüchtet, die Kultur mit Wasser abgewaschen, $^1/_2$ Stunde zentrifugiert und das erhaltene Sediment im Apparat zerkleinert ($^1/_2$ Stunde pro Gramm Bazillen). Das Produkt wurde in 1‰ Kalilauge aufgenommen und 2 Stunden zentrifugiert. Er erhielt dadurch einen 10%igen Extrakt von Typhuszellsaft und als Beimengung die nicht zentrifugablen Bazillen. Diese darnach noch durch $^1/_2$ Stunde mit Chloroformdampf behandelten Zellsäfte waren steril und zeigten bei intravenöser Einverleibung akut toxische Eigenschaften auf Ziegen und Kaninchen. So starb z. B. eine Ziege nach einer intravenösen Injektion von $^1/_{20}$ ccm binnen 13 Stunden unter Ohnmacht und heftigen Diarrhoen. Ebenso heftig toxisch war die Wirkung auf Kaninchen. Das Gift zeigte auch, wie im Kapitel Antitoxin noch ausgeführt werden soll, antigene spezifische Eigenschaften. Diese endogenen Zellgifte erwiesen sich als sehr labil, Macfadyen war daher gezwungen, nur frische Präparate zu verwenden. Bassenge und Mayer wiederholten die Versuche Macfadyens allerdings unvollständig, indem

sie die durch flüssige Luft hart gefrorenen Bazillen nach Zusatz von Quarzsand nur manuell im Mörser zerrieben. Sie waren auch noch gezwungen, die so gewonnene Masse, da sie noch immer lebende Bazillen (eventuell auch bakterielle Verunreinigungen) enthält, in Bouillon oder physiologischer Kochsalzlösung aufzuschwemmen und durch Pukallfilter zu filtrieren. Ihre so gewonnene Flüssigkeit erwies sich als ungiftig.

Besredka verfuhr bei der Darstellung seiner endogenen Gifte folgendermaßen: Die 16- bis 18stündige Agarkultur wird in 0,75 % NaCl-Lösung aufgeschwemmt und 1 Stunde bei 60° erhitzt und dann im Vakuum getrocknet (Endotoxin solid). Die Trockensubstanz wird mit NaCl in Substanz (auf 1 g Trockensubstanz 0,3—0,45 g NaCl) im Achatmörser durch 1 Stunde hindurch fein zerrieben. Dazu fügt er nun allmählich 1—2 ccm destilliertes Wasser, gießt in eine Eprouvette über, in der er noch weiter mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Aufschwemmung läßt er nun 2 Stunden im Wasserbad von 60°—62° und weitere 10—12 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Die Mikroben senken sich zu Boden, die darüberstehende transparente und opaleszierende Flüssigkeit, die keine Mikroben mehr in Suspension enthält, stellt nun eine Lösung des Endotoxines dar. Die Lösung trübt sich sowohl bei Aufenthalt am Eis als auch bei Laboratoriumstemperatur. Bei höherer Temperatur (besonders im Antoklvaen bei 127°) wird die trübe Lösung wieder transparent.

Um das Endotoxin in vitro in Freiheit zu setzten verfuhr er mit Erfolg auch auf solche Weise: Die im Vakuum getrockneten Bazillen werden mit physiologischer NaCl-Lösung und Normalpferdeserum in folgendem Verhältnis gemischt: 0,15 g Bazillen, 2 ccm physioliogisches NaCl. 8 ccm Pferdeserum. Die Bazillen agglutinieren; sie werden nach $1^1/_2$—2 Stunden abzentrifugiert; die überstehende Flüssigkeit hatte einen großen, allerdings variablen Toxingehalt (Endotoxin liquid.).

Besredkas Endotoxin zeigte sich für Pferd, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte, Maus intravenös resp. intraperitoneal einverleibt toxisch. So hatte 1 g Trockensubstanz + 0,3 g Kochsalz + 30 ccm H_2O ungefähr folgende Wirkung. 1 ccm der Flüssigkeit tötete peritoneal 250 g Meerschweinchen, 1,0—1,5 ccm tötete peritoneal oder intravenös ein Kaninchen von 1800 g usw.

Besredka konnte auch — worauf ich noch im Kapitel Antitoxin zurückkomme — sein Endotoxin durch Pferdeimmunserum, gewonnen durch allmählich steigende intravenöse Injektionen von erhitzten und später lebenden Bazillen neutralisieren.

Auf dem Wege der Autolyse versuchten Conradi, Brieger und Mayer, Wassermann, Shiga und Neisser, Shiga und Lipstein, Hahn Giftstoffe aus Typhusbazillen darzustellen. Die Methode geht von der Voraussetzung aus, daß bei der Autolyse id est bei der Auflösung der Bakterienleiber, giftige Leibessubstanzen in Lösung gehen.

Conradi (und bestätigend Brieger und Mayer) dem es gelungen ist auf autolytischem Wege Giftsubstanzen darzustellen, verwendete 20-stündige Agarkulturen (3 % Fleischwasseragar mit Zusatz von 1 % Tropon) die er behutsam abkratzte und mit 0,85 % steriler Kochsalzlösung versetzte. Die Aufschwemmung wurde dann 24—48 Stunden bei 37,5° gehalten. Die sich bildende obere Schicht wurde abpipettiert, mit der 5-fachen Menge 0,85 % NaCl-Lösung verdünnt und durch Berkefeldfilter geschickt. Das Filtrat auf $^1/_{10}$—$^1/_{50}$ seines Volumens bei 35° eingedampft. 0,2 ccm dieses eingeengten Filtrates reichten aus, um intraperitoneal

300 g Meerschweinchen binnen 24 Stunden zu töten. Leider hat CONRADI es unterlassen mit seinem Gift zu immunisieren, so daß wir über die Natur des Giftes im Unklaren gelassen werden. Die von WASSERMANN, NEISSER und SHIGA, auf autolytischem Wege dargestellten Lösungen waren bis auf geringe örtliche Reizungen ungiftig. Sie benutzten Aufschwemmungen von 24stündigen Agarkulturen, die bei 60° abgetötet wurden und 2 Tage (NEISSER und SHIGA) bis 5 Tage (WASSERMANN) der Autolyse bis 37° überlassen wurden. HAHN dagegen gelang es aus Typhusbazillen durch Autolyse Gifte zu gewinnen. Er benutzte als geeignetes Medium für die Autolyse Preßsäfte von möglichst frischen und makroskopisch normalen menschlichen Dünndarmstücken. Dieselben wurden zunächst im laufenden Wasser gut gereinigt und in einer Fleischhackmaschine abgepreßt, dann mit Sand und Kieselgur nach der BUCHNER-HAHNschen Methode verrieben und unter der hydraulischen Presse wiederum ausgepreßt. Die beiden Preßsäfte wurden vereinigt mit etwas Chloroform geschüttelt, um das Fett zu entfernen, und nach Absitzen im Eisschrank durch Berkefeldfilter filtriert. Manchmal mußten die Preßsäfte, um die Filtration zu ermöglichen noch mit Peptonwasser verdünnt werden. Durch längeres Evakuieren während der Filtration gelang es, das Chloroform zu entfernen. Mit diesem Darmpreßsaft wurden nun auf Kolleschalen angelegte 24stündige Kulturen abgespült. Der so gewonnene dickflüssige Preßsaft wurde in enghaltigen Röhren übergeführt und bei 36—37° in wechselnden Zeiträumen digeriert. Nach beendeter Digestion wurde die überstehende Flüssigkeit abgehebert und durch Berkefeldfilter steril filtriert. Die Wirkung der einzelnen Präparate war eine schwankende, immerhin gewann er Filtrate, die in einer Menge von 0,6 ccm Meerschweinchen von 200 g innerhalb 12—20 Stunden töteten. Ebensolche Gifte erhält er, wenn er die Bakterien mit Hilfe von Kochsalzlösung der Autolyse unterwarf. HAHN selbst glaubt jedoch nicht an eine spezifische Toxinnatur seiner dargestellten Gifte.

Die Angaben über die Giftigkeit von Filtraten von Kulturflüssigkeiten sind widersprechend. Während BÄUMER und PEIPER, PFEIFFER und KOLLE in Kulturfiltraten nur Andeutungen von Giftwirkung konstatieren konnten, gelang es CHANTEMESSE von Bouillonkulturen bei Zusatz eines Macerates von frischer Leber, Knochenmark und geringer Menge defibrinierten Menschenblutes nach 5—6tägiger Kultivierung giftige Filtrate zu gewinnen; später bediente er sich zur Kultivierung erfolgreich einer Lösung von Pepton, welches er durch Pepsinverdauung aus Milz darstellte. Das Gift, für welches sich Frosch, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Ziege, Hund, Pferd empfänglich, Huhn und Taube aber gegen dasselbe sehr resistent erwiesen, zeigte auch deutliche antigene Eigenschaften.

Wirksame Gifte fand auch MORESCHI in 5—6tägigen Kulturfiltraten seiner eigens zusammengesetzten Bouillon (1 kg Pferdefleisch, 1 kg Ochsenmilz, 1000 g Wasser, 24 Stunden bei Zimmertemperatur, dann gekocht und filtriert. Zusatz von Pepton Witte 2%, Plasmon 1%, NaCl 0,5%, Ochsenblut 8%, im Autoklaven 20 Minuten gekocht, dann mit NaOH im Verhältnis von 0,15% alkalisiert, dann nach abermaligem Kochen im Autoklaven filtriert. Immunisierungsversuche wurden von MORESCHI nicht angestellt, es läßt sich daher über die Natur seines Giftes nichts aussagen.

LEVY und BLUMENTHAL benutzten die bakterizide Wirkung der Galaktose zur Abtötung von Typhusbazillen. Die auf diese Weise aus den Bazillen gewonnene Substanz zeigte keinerlei Giftwirkung auf Tiere.

Tabelle 1.

Alter der Kultur nach Tagen	Diphtherie-bouillon	Dysenterie-bouillon	Bouillon 2,4	Bouillon 5	Bouillon Lackm. neutr.	Bouillon vom Lackmuspkt. 12 ccm 1 % NaOH	Bouillon vom Lackmuspkt. 15 ccm 1 % NaOH	Bouill. 2,4 + Ascites āā	Dysenterie-bouillon + Asites āā
9	$VI_{3,0}$ $XII_{1,0}$		$XIII_{0,5}$ $XI_{0,5}$						
11	$VI_{1,0}$ $Sprung_{2,0}$		$II_{3,0}$ $VI_{3,0}$						
12	$VI_{1,5}$				$II_{3,0}$	$XIII_{1,0}$	$XIII_{3,0}$		
13	$VI_{3,0}$	$VI_{3,0}$							
14	$VI_{1,0}$ $XIII_{1,0}$	Galle $_{1,5}$						Galle $_{3,0}$ $XIII_{2,0}$	$VI_{3,0}$
16			$XIII_{2,0}$ $XI_{3,0}$	$VI_{3,0}$ $V_{3,0}$ $XX_{3,0}$					
18	$XIII_{2,0}$	$XIII_{2,0}$ $XI_{1,0}$	$XVII_{3,0}$ $XX_{3,0}$ $VI_{3,0}$ $III_{3,0}$						
23	$VI_{3,0}$		$XIII_{2,0}$ $XI_{3,0}$ $VI_{3,0}$						
24		$XIII_{1,0}$							
25			$V_{3,0}$						
40		$XIII_{3,0}$							

Anmerkung: Diphtheriebouillon: Vom Lackmusneutralpunkt 10 ccm Normal-Sodalösung auf 1 Liter.
Dysenteriebouillon: Vom Lackmusneutralpunkt 3 g kryst. Soda auf 1 Liter.
Bouillon 2:4: Vom Phenolphthaleinpunkt 2,4 ccm 5 % NaOH auf 1 Liter.
Bouillon 5: Vom Phenolphthaleinpunkt 5 ccm 5 % NaOH auf 1 Liter.

$VI_{1,5}$ usw. bedeutet: Tystamm VI tötet intravenös in einer Dosis von 1,5 ccm ein Kaninchen von 8—900 g binnen 4—24 Stunden.

Ebenso waren die Bakterien-Kochsalzextrakte aus getrockneten und mit Salzsäure, welche mit flüssiger Luft kondensiert war, behandelten Typhusbakterien ungiftig (Bergell und Meyer).

Unsere eigenen Versuche (Kraus und ich), die allerdings noch nicht abgeschlossen sind, gingen darauf aus von Bouillonkulturen mit sonderer Berücksichtigung des Alkaleszenzgrades und des Alters toxinhaltige Filtrate zu gewinnen. Wir benützen eine Rindfleischbouillon, welche verschieden alkalisiert war. (Bereitung der Bouillon s. Kraus, Choleratoxine.)

Dieselbe wurde mit auf Agar bei 37° fortgezüchteten Typhuskulturen beschickt und nach verschiedenen Zeiträumen filtriert. Als Filter dienten anfangs Reicheltfilter. Später als wir uns überzeugten, daß die Reichelfilter viel Gift zurückhalten, haben wir die karbolisierten (5%) Bouillonkulturen durch Papier (bis zur vollkommenen Klarheit) filtriert.

Es hat sich erwiesen, daß nicht alle geprüften Stämme gleichmäßig toxigen sind, eine Tatsache, der wir ja auch bekanntlich bei Diphtheriebazillen, Dysenteriebazillen, Choleravibrionen begegnen. Es ist daher notwendig, eine große Reihe von Stämmen zur Untersuchung heranzuziehen. Von den verschiedenen geprüften Tystämmen erwies (s. Tabelle I pag. 198) sich Stamm XIII, wie aus der Tabelle ersichtlich, als der beste Toxinbildner, ihm folgen Stamm XI, Stamm VI und Stamm Sprung (Friedberger). Das Zeitoptimum liegt, soweit unsere bisherigen Versuche einen Schluß zulassen, um den 9. Tag herum. Ob der Alkaleszenzgrad der Bouillon für die Toxinbildung von wesentlicher Bedeutung ist, läßt sich bisher nicht definitiv entscheiden. Uns schien Diphtheriebouillon und Bouillon 2,4 am geeignetsten zu sein, da die Filtrate dieser Nährbouillon nach neuntägiger Kultivierung bis dato die wirksamsten waren. 0,5 ccm Filtrat genügte, um ein Kaninchen von 800 g intravenös injiziert binnen 24 Stunden zu töten. Die tödliche Dosis pro 100 g Kaninchen betrug also 0,06 ccm. Für gewöhnlich erhielten wir Gifte, welche in Mengen von 1—3 ccm toxisch waren. Auf Meerschweinchen, Mäuse erwiesen sich unsere Filtrate als wenig wirksam. Jedenfalls war die Ausbeute an Gift keine erheblich geringere als sie bei Cholera und Dysenterie unter denselben Verhältnissen zu erzielen ist. Unsere Gifte erwiesen sich auch als echte spezifische Toxine, da sie, wie noch später gezeigt werden soll, imstande waren, ein spezifisches Antitoxin zu erzeugen (s. Antitoxin). Hervorgehoben sei noch, daß wir auf Grund vielfacher Versuche nur die intravenöse Applikationsmethode des Toxins empfehlen können. Bei peritonealer Einverleibung des Giftes, hatten wir entweder Mißerfolge oder sehr schwankende Resultate zu verzeichnen.

Charakteristische pathogene Eigenschaften zeigen die Toxine nicht. Die intravenös injizierten Kaninchen gehen gewöhnlich in 3 bis 4 Stunden zugrunde. Jedoch kann auch der Tod nach 24 Stunden und später noch erfolgen. Am konstantesten beobachtet man zwei Symptome, die auch, soweit in der Literatur darüber Angaben sich vorfinden, gewöhnlich besonders hervorgehoben sind. 1. Das Auftreten von reichlichen breiigen oder flüssigen Diarrhoen, die ihren anatomischen Ausdruck in einer mehr oder weniger starken, auch bis zu Hämorrhagien führenden Hyperämie der Dünn- und Dickdarmschleimhaut finden kann (Brieger, Chantemesse, Sirotinin, Moreschi). 2. Ein ante finem auftretender Lähmungszustand der hinteren Extremitäten. Wir hatten bei Kaninchen ebenfalls

Gelegenheit, regelmäßig diese Erscheinungen nach intravenöser Injektion zu beobachten, betonen aber nochmals, daß wir darin gewiß nichts charakteristisches erblicken, möchten aber immerhin darauf aufmerksam machen, daß schon unsere kleinsten Dosen imstande waren, derartige Vergiftungssymptome hervorzurufen. Besondere anatomische Veränderungen am Darm konnten wir speziell nicht konstatieren. Anfangs glaubten wir etwas Charakteristisches in der oft zu beobachteten Schwellung der Payerschen Plaques gefunden zu haben. Wir konnten uns jedoch überzeugen, daß derartige Schwellungen im Kaninchendarm auch normalerweise nicht gerade seltene seien. Ebensowenig charakteristisch ist die parenchymatöse Degeneration der Nieren, Kongestion der Leber usw., die öfters hervorgehoben wird (Chantemesse).

Besonders toxikologische Untersuchungen mit seinem Gift hat Chantemesse angestellt, und fand das Toxin blutdruckherabsetzend, Zirkulation und Respiration beschleunigend beim Hund. Die muskellähmende Wirkung führt er auf Grund von Versuchen am Frosch auf eine Alteration der nervösen Zentren zurück.

Die Empfänglichkeit der Tiere ist eine sehr verschiedene. Übereinstimmend wird als besonders empfindlich das Pferd angegeben (Chantemesse, Besredka). Sehr empfindlich sind auch Ziegen (Macfadyen), Kaninchen. Empfänglich zeigten sich noch Hund, Meerschweinchen, Maus und Frosch. Huhn und Taube sind nach Chantemesse sehr resistent. Wir experimentierten mit Pferd, Ziege, Kaninchen, Meerschweinchen und Maus. Während wir die starke Reaktion bei Pferd, Ziege und Kaninchen konstatieren konnten, war unser Gift auf Meerschweinchen und Mäuse geradezu ungiftig.

Gegen Temperatureinflüsse scheint das Toxin (Endotoxin) recht resistent zu sein, so gibt Chantemesse an, daß 58 ^{0} sein Gift nicht beeinflußte und erst Erhitzen auf 100 ^{0} dasselbe zerstörte. Besredka hält sein Endotoxin für thermostabil, erst durch 15stündiges Erhitzen auf 57 ^{0} C wird das Gift zerstört, auch verträgt es eine Temperatur von 127 ^{0} im Autoklaven durch $^1/_2$ Stunde hindurch. Chantemesse konnte sein Toxin durch Ansäuerung mit Acid. tartaric. unwirksam machen, durch nachträgliche Neutralisation mit Soda ließ es sich wieder reaktivieren. Gleiches hat in jüngster Zeit Doerr (siehe Dysenterietoxin) für andere Toxine feststellen können. Im Übrigen sind die Toxine, wie schon Chantemesse, Macfadyen besonders erfahren haben, sehr labil. Der Giftwert kann, wie wir uns sehr oft überzeugen konnten, im Verlauf von wenigen Tagen erheblich zurückgehen. Ein längeres (monatelanges) Aufbewahren vertrugen unsere Giftlösungen absolut nicht, gleichgültig, ob wir die Lösungen im Dunkeln, im diffusen Licht, im Eisschrank oder bei Zimmertemperatur aufbewahrten. In jüngster Zeit hat Aronson (Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 18), sowie Bergell und Mayer (Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 18) unsere früher mitgeteilten Resultate über Typhustoxin und -antitoxin im Prinzip bestätigt. Aronson ist es gelungen, mit Ammonsulfat die Gifte zu fällen und so ein festes Gift darzustellen. Brieger und Mayer gelang es nicht aus Typhusbakterien, die mit Ammonsulfat versetzt waren und mehrere Tage der Autolyse überlassen wurden, irgendwelche toxische Substanzen zu gewinnen. Nach unseren eigenen Versuchen wird das Gift durch Alkohol und auch durch Ammonsulfat nicht quantitativ wiedergewonnen.

Unsere Kenntnisse über Typhustoxine sind, wie gesagt, noch unvollständig, da ja die Frage erst seit kurzem einer systematischen Behand-

lung unterzogen wurde. Die Darstellung konnte also noch nicht die erwünschte Ausführlichkeit und Gründlichkeit erfahren. In jüngster Zeit gelang es uns, aus Paratyphus-, Mäusetyphusbouillonkulturen Gifte in Filtraten nachzuweisen, welche ebenso wie Typhustoxine für Kaninchen tödlich sind. Die Gifte ließen sich durch ein Typhusantitoxin neutralisieren. Diese Verhältnisse erinnern an die Beziehungen der Toxine nahverwandter Bakterien zueinander (Partialtoxine), wie sie KRAUS bei den Vibrionen aufgedeckt hat.

Literatur.

1) BASSENGE und MAYER, Centralbl. für Bakt. 1904, Nr. 3.
2) BERGELL und MAYER, Med. Klinik 1906.
3) BESREDKA, Ann. de l'Inst. Pasteur, July 1905.
4) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur, Fevr. 1906.
5) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur, Avril 1906.
6) BEUMER und PEIPER, Zeitschr. für Hygiene 1887, Bd. II.
7) Dies., Zeitschr. für klin. Med. 1895.
8) BITTER, Zeitschr. für Hygiene 1892.
9) BRIEGER, Weitere Beobachtungen über Ptomaine, Berlin 1885.
10) Ders., Untersuchungen über Ptomaine, Berlin 1886.
11) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 27.
11a) BRIEGER und MAYER, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 18.
12) Dies., Deutsche med. Wochenschr. 1904.
13) BRIEGER und WASSERMANN, Charité Ann. 1892.
14) CHANTEMESSE, Société de Biolog. 1897, pag. 96.
15) Ders., IX. Congress internationale de Hyg. y Demografía, Avril 1898.
16) FRAENKEL und SIMONDS, Zeitschr. für Hygiene 1897.
17) HAHN, Münchner med. Wochenschr. 1897.
18) Ders., Münchner med. Wochenschr. 1906, Nr. 23.
19) LANGE, M. F., Compt. rend. de la Société de Biolog. 1905, 6. Mai.
20) LEVY und BLUMENTHAI, Med. Klinik, April 1906.
21) MACFADYEN, ALLAN and SYDNEY ROWLAND, Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXX, Nr. 20.
22) MACFADYEN, ALLAN, Centralbl. für Bakt. 1906.
23) MORESCHI, Archiv per le Science Mediche 1905, Vol. XXIX.
24) NEISSER und SHIGA, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 4.
25) PFEIFFER, R., Deutsche med. Wochenschr. 1894, Nr. 48.
26) PFEIFFER und KOLLE, Zeitschr. für Hygiene 1896, Bd. XXI.
27) RODET und LAGRIEFOUL, Centralbl. für Bakt. 1906, Heft 4.
28) SCHÜTZE, ALBERT, Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 27.
29) SIROTININ, Zeitschr. für Hygiene 1886.

X.

Die Bakterienhämotoxine.

Von

Dr. E. Pribram und Dr. V. K. Russ

in Wien.

Einleitung.

Das methodische Arbeiten mit Blutkörperchen lösenden Bakterienfiltraten begann etwa vor einem Dezennium, als EHRLICH in den Bouillonkulturen von Tetanusbazillen ein derartiges Blutgift fand, mit welchem er dann gemeinschaftlich mit MADSEN durch Einverleibung in den Tierkörper ein Gegengift zu erzeugen, imstande war. Damit hatte er eine Substanz entdeckt, welche alle Eigenschaften der damals bereits bekannten Toxine besaß, das „Hämolysin" oder „Hämotoxin" (Paltauf), welch letzterer Name die Toxinnatur dieser Bakterienprodukte im Gegensatz zur Hämolyse durch Bakterienwirkung im allgemeinen hervorheben soll. (Vgl. E. PRIBRAM Handbuch von KOLLE-WASSERMANN Ergänzungsband S. 291). EHRLICH erkannte sogleich die Bedeutung, welche seine Entdeckung für die wissenschaftliche Beantwortung der Frage über die Neutralisationsbedingungen des Toxins durch Antitoxin hatte und arbeitete mit MADSEN die Untersuchungstechnik derart aus. daß sie für alle späteren Untersuchungen maßgebend wurde. Eine mehr praktische Bedeutung erhielt EHRLICHS Entdeckung, als KRAUS und CLAIRMONT fanden, daß noch viele andere Mikroorganismen (Staphylokokken, Vibrionen, Proteus, Fäulnisbakterien usw.) Bouillonkulturen, in denen sie gewachsen waren, die erwähnte toxische Eigenschaft verliehen. Daß es sich auch hier um echte Toxine, Hämotoxine handelte, bewiesen die Untersuchungen von KRAUS und CLAIRMONT, NEISSER und WECHSBERG.

Eine zweite Methode, die blutkörperchenlösende Eigenschaft von Bakterien zu prüfen, war eigentlich schon vor der Entdeckung EHRLICHS in die bakteriologische Forschung durch KOCH eingeführt, welcher Cholerabazillen in einer blutkörperchenhaltigen Nährgelatine züchtete und dabei die Auflösung der Erythrozyten beobachtete. EIJKMANN benützte zu diesem Zwecke einen blutkörperchenhaltigen Agarnährboden, den schließlich KRAUS, SCHOTTMÜLLER zur Differentialdiagnose verwendeten. — Mit diesen einleitenden, kurzen Literaturangaben*) mögen die zwei wichtigsten Methoden erwähnt sein, von welchen nur die erstere zum

*) Ausführliche Literatur bei E. PRIBRAM, lc.

Nachweis der Hämotoxine und jener Hämolysine, deren Hämotoxinnatur noch nicht sicher festgestellt ist, die zweite zum Nachweis der Hämolysine im weiteren Sinne des Wortes dient.

Verhalten der einzelnen Mikroorganismen bei der Hämotoxinproduktion.

Die Eigenschaft, die roten Blutkörperchen aufzulösen, kann auch auf andere Ursachen zurückzuführen sein als auf die Produktion eines echten Hämotoxins; deshalb beschränken wir den Namen der echten Hämotoxinbildner auf jene Gruppen von Mikroorganismen, deren Kulturfiltrate die Eigenschaft besitzen, rote Blutkörperchen zu zerstören, diese Eigenschaft wenigstens teilweise einbüßen, wenn man sie auf 65° C eine halbe Stunde erhitzt und welche einem Versuchstiere injiziert, spezifische Antitoxine erzeugen.

Zu einer zweiten Gruppe zählen wir jene Mikroorganismen, welche sich von den echten Hämotoxinbildnern dadurch unterscheiden, daß die in ihren Kulturfiltraten nachweisbaren Hämolysine hitzebeständig sind, ohne daß es noch entschieden wäre, ob es sich um echte Hämotoxine handelt.

1. Gruppe:

Staphylokokken: Nur den pathogenen Staphylokokken ist die Bildung löslicher Hämotoxine eigentümlich, bei saprophytischen fehlt sie stets. Allerdings müssen die aus pathologischen Gewebsveränderungen isolierten Stämme nicht unbedingt Hämotoxin produzieren. Wir konnten bei einer Anzahl von sicher pathogenen, aus Osteomyelitis, Phlegmonen usw. stammenden Staphylokokken die Produktion einer erythrozytenlösenden Substanz nicht konstatieren.

Vibrionen: Die meisten, man darf wohl sagen nahezu alle Vibrionen (Finkler, Prior, Danubicus, Elvers, Deneke, Massauah usw.) mit nur ganz wenig Ausnahmen eignen sich zum Studium der Hämotoxinproduktion ganz vorzüglich (Kraus, Meinicke). Besonders starke Hämotoxinproduktion zeigt Vibrio Nasik (Kraus). Von den Choleravibrionen*) hingegen gibt es nur eine einzige Gruppe, die El Torstämme und ihnen verwandte, welche ähnlich dem Vibrio Nasik eine außerordentlich starke Hämotoxinproduktion entwickeln (Kraus und Pribram, Kraus und Prantschoff).

Tetanus: Es eignen sich wohl alle Tetanuskulturen in gleicher Weise, doch wird man zuweilen auf Stämme stoßen, welchen keine oder nur eine sehr geringfügige hämotoxische Eigenschaft zukommt. Wie außerordentlich wirksam die blutkörperchenlösende Kraft eines Filtrates von Tetanuskultur sein kann, möge folgende Tabelle Madsens illustrieren:

(s. Tabelle 1 pag. 204.)

Das verwendete Gift tötete in Mengen von 0,0000001 g Trockensubstanz eine Maus von 15 g Körpergewicht.

Megatherium. Auch hier eignen sich die meisten Stämme und es ist die Hämotoxinproduktion mehr vom Medium als von der Kultur abhängig (vgl. unten). Ebenso bei Milzbrand und Subtilis.

Proteus. Fast alle Stämme produzieren in gleicher Weise sehr reichlich Hämotoxin. — Auch die Nährbouillon des Bazillus Cholerae gallinarum enthält nach Calamida Hämotoxin.

---

*) Die Zugehörigkeit zur Cholera geht aus den Resultaten der Agglutination mit Choleraserum hervor.

Tabelle 1.

Wirksamkeit eines Tetanushämotoxins.

Nummer des Glases	Zugesetzte Giftlösungen		Auflösung der Blutkörperchen nach 24 Stunden
	Konzentration	Menge in ccm	
1	1 Prozent	1,2	Vollständige Auflösung der Blutkörperchen, die Flüssigkeit ist vollkommen lackfarben, von gleichmäßig dunkelroter Farbe.
2		1,0	
3		0,8	
4		0,7	
5		0,6	In der unteren Schicht der Flüssigkeit eine schwache Trübung von ungelösten Blutkörperchen.
6		0,5	
7		0,4	
8		0,35	
9		0,3	
10		0,25	Die Menge der ungelösten roten Blutkörchen nimmt zu; nach und nach erscheint ein deutlicher Bodensatz. Die obenstehende Flüssigkeitssäule ist stets von derselben gleichmäßig dunkelroten Farbe.
11		0,2	
12		0,17	
13		0,13	
14	$^1/_{10}$ Prozent	1,0	
15		0,8	
16		0,7	
17		0,6	
18		0,5	Die oberste Schicht der Flüssigkeit ist in der Ausdehnung von 1 ccm heller gefärbt, als die übrige Flüssigkeit.
19		0,4	
20		0,35	Diese obere Zone wird heller und gewinnt an Ausdehnung.
21		0,3	
22		0,25	Farbennuance $^1/_{60}$*)
23		0,2	Die unterste Schicht der Flüssigkeit wird heller.
24		0,17	
25		0,13	Farbennuance $^1/_{120}$.
26	$^1/_{100}$ Prozent	1,0	
27		0,8	Die Gesamtflüssigkeit ist von gleichmäßig rotgelber Färbung, nur unmittelbar über dem Bodensatz etwas stärker rot gefärbt.
28		0,7	
29		0,6	
30		0,5	Die ganze Flüssigkeit ist gleichmäßig schwach rot-gelb gefärbt.
31		0,4	
32		0,35	
33		0,3	
34		0,25	Die Flüssigkeit ist farblos.
35		0,2	
36	Kontrolle (ohne Giftzusatz)		

2. Gruppe:

Pyocyaneus. Es läßt sich hier keine bestimmte Regel aufstellen, doch eignen sich wohl die meisten Stämme.

Typhus. Die Produktion ist schwach und durchaus nicht bei allen Stämmen vorhanden, doch gelang es uns wenigstens bei einzelnen Stämmen mit Sicherheit hämolysierende Filtrate zu erzeugen.

Coli. Nach Durante hängt die Hämolysinbildung von der Virulenz des Stammes ab und steht mit demselben in enger Beziehung. Auch Kayser untersuchte unter anderem zwei eitererregende Stämme. Bei

*) Vgl. Prüfung und Wertbestimmung pag. 212.

Pyocyaneus, Typhus und Coli ist die starke Alkaliproduktion, welche allein zur Lösung der roten Blutkörperchen genügt, zu berücksichtigen.

Dysenterie. Einzelne Stämme bilden nach CASTELLANI Hämolysin.

Der Vollständigkeit halber seien auch jene Mikroorganismen erwähnt, welche in Bouillonkulturen keine Hämotoxine bilden, wohl aber unter bestimmten Umständen Erythrozyten aufzulösen imstande sind: Streptokokken, Sarcinen, Choleravibrionen, Diphtheriebazillen, Xerosebazillen u. a., die Kapselbazillen und die säurefesten Bazillen.

Nährmedien, welche sich zur Hämotoxingewinnung für die einzelnen Stämme am besten eignen.

Staphylokokken. NEISSER und WECHSBERG empfehlen eine Bouillon, welcher so viel Alkali in Form von Normalkali- oder Natronlauge zugesetzt ist, als dem Drittel jenes Quantums entspricht, das man zur völligen Neutralisation gegen Phenolphtalein zusetzen müßte. Eine solche Kulturflüssigkeit enthält das Optimum der Alkaleszenz. Die Produktion von Hämotoxin findet übrigens auch in etwas mehr oder weniger stark alkalischer Bouillon statt, besonders bei Stämmen, die sehr stark blutlösend wirken.

Vibrionen. Als günstigster Alkaleszenzgrad wird von KRAUS jener angegeben, welcher durch Zusatz von 2—4 ccm einer 5 % Natronlauge zu 1000 ccm lackmusneutraler Bouillon erreicht wird. Die Empfindlichkeit der Vibrionen gegen Schwankungen in der Zusammensetzung der Kulturflüssigkeit drückt sich rasch durch ein beträchtliches Sinken der hämotoxischen Kraft aus.

Tetanus. Um eine möglichst reichliche Hämotoxinproduktion zu erzielen, züchtet man am besten in neutraler oder schwach alkalischer frisch bereiteter Nährbouillon, natürlich anaerob unter Paraffinabschluß (Über die Methoden der Züchtung vgl. das Kapitel Tetatanustoxin). Der Zusatz von Traubenzucker ist unbedingt zu vermeiden, da er die Hämotoxinproduktion hemmt.

Megatherium. Statt der gewöhnlichen schwach lackmusalkalischen Bouillon verwendet TODD eine solche, der 7 ccm Normalnatronlauge pro Liter Nährflüssigkeit zugesetzt wird. Das Pepton der Nährbouillon — TODD verwendet stets Pepton Witte — scheint für die Hämotoxinproduktion nicht ohne Belang zu sein, denn manchmal erwiesen sich die Filtrate als fast unwirksam, was TODD auf die nicht konstante Zusammensetzung des Peptons zurückführt. Statt Pepton Witte verwenden LANDSTEINER und HEYROVSKY bei Milzbrand Pepton Chapoteaux zur Bereitung der Bouillon (s. unten). Es sei hier auch darauf hingewiesen, daß die Anwesenheit von Sauerstoff für die Bildung der Hämotoxine sehr wichtig erscheint, denn anaerob gehaltene Kulturen hatten keine Wirksamkeit. Will man darauf Rücksicht nehmen, so züchtet man mit Vorteil in Erlenmeyerkolben mit großer Oberfläche.

Proteus. Es eignet sich die Nährbouillon von gewöhnlicher Zusammensetzung, ebenso auch für die Züchtung des Bazillus der Hühnercholera und für das Pestbazillenhämotoxin (RAYBAUD).

Milzbrand. CASAGRANDI züchtet in LÖFFLER-Bouillon, erhält übrigens nur ein sehr schwaches Hämotoxin. In jüngster Zeit haben LANDSTEINER und HEYROVSKY das erwähnte Pepton Chapoteaux mit Erfolg verwendet.

2. Gruppe.

Pyocyaneus. Eine lackmusneutrale mit 1,5 % Pepton versetzte Bouillon eignet sich am besten.

Für Typhus setzt man 30 ccm einer 10 prozentigen Sodalösung zu einem Liter Bouillon (E. und P. Levy). Die Hämotoxinproduktion ist, wenn überhaupt vorhanden, wie erwähnt sehr gering. Coli bildet in schwach alkalischer oder stärker saurer Nährflüssigkeit überhaupt kein Hämolysin, am besten soll sich ein Zusatz eignen, durch welchen die Bouillon derartig sauer wird, daß in 100 ccm ein Säuregehalt entsprechend 8 ccm einer $^1/_{10}$ Normaloxalsäure vorhanden ist (Kayser).

Züchtungsdauer.

1. Gruppe.

Staphylokokken. Das Optimum des Hämotoxingehaltes der Nährflüssigkeit liegt ungefähr zwischen dem 9. und 13. Tage. Die Hämotoxinbildung beginnt etwa am 4. Tage. Dann steigt sie langsam bis zu dem Höhepunkt, verweilt dort längere Zeit und sinkt dann schließlich wieder ab. Lubenau hat an einer größeren Zahl von Staphylokokkenstämmen die zeitliche und quantitative Produktion geprüft und für jeden einzelnen Fall eine Kurve konstruiert. Er fand, daß innerhalb des Maximums oft beträchtliche Schwankungen zu konstatieren sind.

Fig 1.

(Vgl. nebenstehende Kurve, in welcher auf der Abszisse die Züchtungsdauer in Tagen, auf der Ordinate die Wirksamkeit aufgetragen wurde. — Die Werte beziehen sich auf einen Staphylokokken-Stamm aus Buboneneiter.)

Vibrionen. Das Verhalten verschiedener Stämme ist sehr verschieden und auch ein und derselbe Stamm bildet sein Hämotoxin nicht stets zur selben Zeit. Bei einzelnen Stämmen ist es bereits sehr bald, etwa am 2. oder 3. Tage nachzuweisen (Vibrio Nasik), verschwindet aber oft schon am 5. oder 6. Tage aus der Kulturflüssigkeit. Die El Torstämme zeigen fast alle am 2. bis 4. Züchtungstage bereits reichliche Hämotoxinproduktion (Kraus und Pribram).

Tetanus. Das eigentliche Optimum liegt meist zwischen dem 7. und 10. Tage des Wachstums. Enthält die Bouillon mehr als $^1/_2$ % Kochsalz, so bleibt das Tetanushämotoxin nur wenige Tage bei einer Temperatur von 37 Grad unverändert wirksam. Man züchtet deshalb nur kurze Zeit bei Bruttemperatur und hält dann die Kulturen bei Zimmertemperatur (Knorr).

Megatherium. Beginn der Hämotoxinproduktion am 2. Tage, Höhepunkt am 7. bis 8. Tage, dann langsames Absinken. Die nachfolgende Kurve Fig. 2 (nach Todd) veranschaulicht die Wirksamkeit einer nach verschiedenen Zeiträumen geprüften Kultur für Meerschweinchenblutkörperchen.

(Auf der Ordinate ist die Menge der Blutaufschwemmung in Kubikzentimeter, gelöst durch 1 ccm der Kultur, auf der Abszisse das Alter der Kultur in Tagen eingetragen).

Fig. 2.

Ähnlich verhält sich Proteus und Milzbrand. Pestbazillen beginnen am 4. Tage Hämotoxine zu erzeugen und erreichen das Optimum zwischen dem 9. und 12. Tage.

Von den Mikroorganismen der zweiten Gruppe fängt Pyocyaneus am 3. Tage mit der Hämolysinproduktion an, erreicht rasch sein Maximum und fällt dann etwa am 8. Tage wieder ab. (Vergl. nebenstehende Kurve Fig. 3 nach LUBENAU).

Bei Typhus findet man das Optimum etwa in der zweiten Woche. Coli beginnt am 2. Tage mit der Hämolysinproduktion und erreicht den Höhepunkt am 4. Tage.

Fig. 3.

Filtration.

Es ist stets zweckmäßig, mit keimfreien Kulturfiltraten zu arbeiten, zuweilen sogar unerläßlich (Tetanus, Pest). Deshalb pflegt man die Bouillonkulturen, nachdem man sich von ihrer Wirksamkeit durch einen Vorversuch überzeugt hat, zu filtrieren. Bei der Filtration durch Tonfilter verlieren sie allerdings oft einen Teil ihrer Wirksamkeit, bei Staphylokokken z. B. macht sich die Abnahme der hämotoxischen Kraft einer Kultur nach Filtration besonders in den ersten Tagen des Wachstums geltend. Dies zeigt die folgende kleine Übersichtstabelle.

Tabelle 2.

Staphylococcus pyogenes aureus (Septikämie).

Wert	Prüfung der Kulturen nach Tagen								
	1	2	3	4	5	7	9	11	13
komplett			1,0–0,9	1,0–0,6	1,0—0,2	1,0—0,08	1,0—0,05	1,0—0,05	1,0—0,08
deutlich		1,0–0,8	0,8–0,5	0,5–0,3	0,1—0,08	0,07—0,04	0,04—0,03	0,04—0,02	0,07—0,06
Spur	1,0–0,7	0,7–0,4	0,4–0,1	0,2–0,08	0,07—0,04	0,03—0,01	0,02—0,01	0,01	0,05—0,02
Wert	**Prüfung des Filtrates nach Tagen**								
	1	2	3	4	5	7	9	11	13
komplett						1,0—0,9	1,0—0,09	1,0—0,09	1,0—0,1
deutlich					1,0—0,6	0,8—0,5	0,08—0,06	0,08—0,06	0,09—0,07
Spur				1,0–0,8	0,5—0,1	0,4—0,1	0,05—0,04	0,05—0,04	0,06—0,04

Ziemlich leicht und ohne große Verluste zu filtrieren ist das Hämotoxin von Megatherium, von Subtilis und von Proteus. Dagegen wird z. B. Tetanushämotoxin durch Filtration sehr erheblich abgeschwächt. Besonders groß sind die Verluste durch Filtration bei Vibrionen, schwanken übrigens bei verschiedenen Stämmen nicht unerheblich. Eine tabellarische Übersicht entnehmen wir einer Arbeit Meinickes:

Tabelle 3.

Stamm	Unfiltrirte Kultur		Filtrat	
	Lösung complett	Spur	Lösung complett	Spur
	0			
31	0,1	0,005	0,5	0,1
34	0,1	0,01	0,5	0,05
5	—	0,1	—	1,0
V. Metschnikoff	1,0	0,05	—	0,1
V. Metschnikoff-Wien	0,5	0,005	1,0	0,05
V. Metschnikoff-Paris	0,05	0,005	1,0	0,05
V. Nordhafen	0,5	0,05	1,0	0,1
V. El Tor II	0,1	0,05	—	0,5
V. 77	1,0	0,05	—	1,0

Die in der Tabelle 3 genannten Kulturen sind alle gleichalterig und zeigen durchweg sehr erhebliche Verluste durch Filtration.

Die hämolytische Kraft der Pyocyaneuskulturen erfährt durch Filtration eine sehr erhebliche Einbuße. In diesen Fällen gelingt es mitunter überhaupt nicht mit einer Kultur, welche vor der Filtration ge-

prüft, rote Blutkörperchen gelöst hat, nach der Filtration durch Tonfilter Erythrozyten aufzulösen. Es empfiehlt sich dann statt der keimdichten Filter durch sehr dichtes schwedisches Filtrierpapier so oft zu filtrieren, bis eine möglichst weitgehende Klärung eingetreten ist. Die wenigen Keime, welche bei einer derartigen Filtration zurückbleiben, werden ohnehin beim Konservierungsverfahren mit Toluol, Karbol getötet. Nicht statthaft ist diese Methode bei Tetanuskulturen (wegen der Sporen) und bei Pestkulturen.

Die Konservierung geschieht durch den Zusatz von:

Karbol 10,0
Glyzerin 20,0
Aq. dest. 70,0

davon 5: 100,0 ccm Filtrat

oder durch Schütteln und Stehenlassen mit Toluol. Im letzteren Falle filtriert man vor Benutzung die Flüssigkeit durch feuchtes Filtrierpapier. Die Filtrate sind vor Licht und Wärme zu schützen und an einem kühlen Orte aufzubewahren. Auch starke Erschütterungen, häufiges Schütteln können ihre Wirksamkeit sehr beeinträchtigen. Ihre Haltbarkeit im flüssigen Zustande ist übrigens auch bei einem und demselben Stamme sehr großen Schwankungen unterworfen. Weit größer ist ihre Haltbarkeit nach Ausfällung mit Ammonsulfat (Madsen). Ein solches Trockenhämotoxin ist viel haltbarer als die hämotoxische Lösung. Dies läßt sich am besten in folgender Weise beurteilen: man löst ein Trockenhämotoxin in physiologischer Kochsalzlösung und läßt es eine Zeit lang bei Zimmertemperatur stehen. Bei dieser Behandlung findet man, daß eine $^1/_{10}$ prozentige Aufschwemmung in weniger als einer Stunde schon beträchtlich abgeschwächt wird, eine 4prozentige sinkt nach fünf Stunden auf die Hälfte, nach 24 Stunden bis auf ein Fünfzehntel ihres ursprünglichen Wertes herab.

Während bei Tetanuskulturen mit dem Hämotoxin das Tetanustoxin durch Ammonsulfat gefällt wird, ist dies bei Toxin und Hämotoxin produzierenden Choleravibrionen (El Tor), wie Eisler kürzlich nachgewiesen hat, nicht der Fall. Der gefällte Körper enthält wohl das Hämotoxin, nicht aber das Toxin.

Empfindlichkeit verschiedener Blutarten gegen die Kulturfiltrate der einzelnen Bakterienstämme.

Das Blut verschiedener Tierarten wird von den hämotoxischen Kulturfiltraten in ganz verschiedener Weise gelöst. Individuelle Schwankungen innerhalb einer Tierart kommen zwar vor, sind aber stets bloß quantitativer Art, niemals kann man wahrnehmen, daß das Blut eines Individuums von einem starken Hämotoxin gelöst, das eines anderen derselben Art hingegen nicht gelöst würde. In welcher Weise sich die einzelnen Blutarten gegenüber den einzelnen Kulturfiltraten verhalten, darüber gibt folgende kleine Tabelle Aufschluß:

(s. Tab. 4 pag 210.)

Die hämotoxische Wirkung eines Filtrates auf das Blut verschiedener Tierarten ist nicht identisch, vielmehr wird durch Erschöpfung des Hämotoxins mit einer Blutart die Wirksamkeit für die anderen nicht mit aufgehoben, wovon man sich durch folgenden Versuch überzeugen kann. Man fügt zu einer abgemessenen Menge Filtrat einen Überschuß einer

Tabelle 4.

Blutart: (Durch peinliche Befreiung vom Serum (pag. 212) werden Blutarten, deren Serum antitoxisch wirkt, leichter gelöst).

Kulturfiltrate von:	Mensch	Affe	Pferd	Esel	Rind	Ziege	Schaf	Schwein	Hund	Katze	Kaninchen	Meer-schweinchen	Ratte (Maus)	Gans	Huhn	Taube	Sperling
Staphylokokken	×		+			×	+	+	+	+	++	+		×			
Vibrionen (verschiedene Stämme verhalten sich verschieden!)	+	+	+	+							++	++					
El Tor-Vibrionen	+	+	+	+		+	+		+		++	++					
Tetanus	+		++	++		×	×				++						
Megatherium	++	++	○	○	+	+	+	+	×		×	++	×		×		×
Hühnercholera											++	+			○		
Pestbazillen	++																
Pyocyaneus	+	+	+		++		+		+	+	+		+				
Typhus	+					○			+		○	+					
Coli	○		++				○	○	++					○		○	

Zeichenerklärung: ++ bedeutet: sehr gut lösend; + bedeutet: gut lösend; × bedeutet: wenig lösend; ○ bedeutet: gar nicht lösend.

5 prozentigen Meerschweinchenblutlösung zu, läßt das Gemenge drei Stunden bei 37° stehen, zentrifugiert die nicht mehr gelösten Blutkörperchen ab und fügt zu der abpipettierten klaren Flüssigkeit eine 5 prozentige Aufschwemmung von Schafblutkörperchen. Diese wird noch gelöst. Auch bei umgekehrter Versuchsanordnung erhält man dasselbe Resultat.

Bestimmt man die gerade lösende Dosis des Filtrates für je 1 ccm einer 5 prozentigen Meerschweinchen- und einer ebensolchen Schafblutlösung getrennt, und nun diejenige für 2 ccm eines Gemisches beider Blutarten, so ist zur kompletten Hämolyse des Gemisches eine viel geringere Menge Filtrat notwendig als die Summe der einzelnen Werte ausmacht. Dieser Versuch wurde von Todd für Megatheriumhämotoxin und die beiden genannten Blutarten angegeben und braucht selbstverständlich durchaus nicht für alle Blutarten oder alle anderen Hämotoxine Giltigkeit zu haben.

Widerstandsfähigkeit blutkörperchenlösender Filtrate gegen äußere Einflüsse.

1. Wärme. Besonders auffallend ist, wie erwähnt, das verschiedene Verhalten blutkörperchenlösender Filtrate gegenüber Temperaturveränderungen. Die Differenz ist so auffallend, daß sie, wie erwähnt, den Anlaß dazu gab, die Hämotoxinbildner, deren Kulturfiltrate durch Erwärmung auf 65° C ($^1/_2$ Stunde) ihre blutkörperchenlösende Wirkung ganz oder teilweise verlieren, von einer zweiten Gruppe abzugrenzen,

deren Kulturfiltrate gegen Wärme resistent sind (thermostabile Hämolysine). Doch scheinen auch innerhalb der einzelnen Stämme Übergänge vorzukommen, wie aus einer allerdings ganz vereinzelten Angabe in der Literatur hervorzugehen scheint. So z. B. erwähnen Fränkel und Baumann einen Staphylokokkenstamm, dessen Kulturfiltrate auch auf höhere Temperaturen erhitzt, ihre hämolytische Kraft nur unbedeutend einbüßen. Andererseits scheint von den thermostabilen Hämolysinen besonders das Typhushämolysin gegen Temperaturen von 60° C bei langdauernder Erwärmung nicht widerstandsfähig zu sein, so daß man geneigt wäre, es der ersten Gruppe zuzurechnen.

Eine eigentümliche Ausnahmestellung scheint das Megatheriumhämotoxin, wenigstens einzelner Stämme, einzunehmen. Erhitzt man es nämlich eine halbe Stunde lang auf 56° C, so verliert es seine Wirksamkeit fast vollständig, erhitzt man es jedoch weitere 10 Minuten, auf 100° C, so wird es wieder wirksam und läßt sich durch wirksames Antitoxin ebenso neutralisieren wie zuvor. Die Wirksamkeit ist etwa $^2/_5$ der ursprünglich vorhandenen (Dreyer und Jex Blake). Die Resistenz gegen Kälte ist bei allen Filtraten eine sehr erhebliche.

2. Gegen die Wirkung chemischer Agentien: Salze (Nolf, Pohl, Bashford, Markl, Arrhenius und Madsen usw.), Alkalilösungen und Säuren sowie Eiweißkörper (Arrhenius und Madsen) können je nach dem Konzentrationsgrade die Wirkung der Filtrate auf rote Blutkörperchen sehr erheblich abschwächen.

Bei Salzlösungen handelt es sich dabei wahrscheinlich nicht bloß um eine rein osmotische Wirkung, sondern es scheint auch die elementare Zusammensetzung der Salze von Belang zu sein. Dafür sprechen Versuche von Volk und Lipschütz, welche äquimolekulare Normallösungen von $BaCl_2$, $NaCl$, $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ und Na_2SO_4 zu einer derartigen Untersuchung herangezogen. Die Versuchsmethode war folgende: sie versetzten die einfach, zweifach und vierfach lösende Dosis (Lo, 2 Lo, 4 Lo) eines Staphylokokkenhämotoxins mit 2 ccm 10prozentiger Kaninchenblutaufschwemmung, welche in den äquimolekularen Normallösungen der zu untersuchenden Salze hergestellt waren und füllten alle Proben mit den entsprechenden Salzlösungen auf 4 ccm Gesamtvolumen auf. Die Beurteilung geschah in der üblichen Weise, an der Hand einer Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung (Methode siehe unten).

Von den untersuchten Salzen hemmten am stärksten $NaCl$, $BaCl_2$ und $MgSO_4$, bedeutend weniger $(NH_4)_2SO_4$, am wenigsten Na_2SO_4 die Hämolyse durch Staphylokokkenhämotoxin. Ähnliche Resultate erhielten sie bei Versuchen mit Vibrionenhämotoxin. Die Wirkung der Salze war dort geringer, doch war das Vibrionenhämotoxin dem Staphylokokkenhämotoxin nicht gleichwertig. Durch eine geeignete Kontrolle zeigten die Beobachter, daß eine Bindung an die roten Blutkörperchen (siehe unten) erfolgt war, und nur die Auflösung derselben durch die Salzwirkung verhindert wurde.

Stärkerer Alkali- und Säurezusatz hemmt die Wirkung stets. Bei den thermostabilen Hämolysinen schwächt übrigens bereits die Neutralisierung der meist stark alkalischen Filtrate die Hämolysinwirkung (Pyocyaneus, Typhus und sogar Coli (Kayser), der sonst doch ein starker Säurebildner ist).

Prüfung und Wertbestimmung*).

Um den Grad der Wirkung eines Hämotoxins auf eine bestimmte Blutart zu prüfen, geht man in folgender Weise vor: Man befreit durch Zentrifugieren die roten Blutkörperchen der zu untersuchenden Tierart von ihrem Serum, nimmt sie dann mit der dem Blute der entsprechenden Tierart isotonischen Kochsalzlösung auf, zentrifugiert abermals und wäscht sie auf diese Weise noch ein drittes Mal, um die lösungshemmende Wirkung des ihnen anhaftenden Serums sicher auszuschalten, dann stellt man sich mit physiologischer Kochsalzlösung eine Blutkörperchenaufschwemmung her, welche in 100 ccm 5 ccm Blut enthält. Nun füllt man von der zu prüfenden Flüssigkeit bei Trockenhämotoxinen von der 1 $^0/_0$igen Stammlösung absteigende Mengen in mehrere Röhrchen, bringt durch Zusatz von isotonischer Kochsalzlösung jedes Quantum auf das gleiche Volumen (1 oder 2 ccm) und setzt jeder Probe dieselbe Menge der 5 $^0/_0$igen Blutkörperchenaufschwemmung (1—2 ccm) zu. Dann schüttelt man gut durch, bringt die ganze Versuchsreihe für 2 Stunden in Bruttemperatur und läßt sie schließlich weitere 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Die Beobachtung darf nicht früher abgeschlossen werden, weil bei einigen Hämotoxinen eine längere Inkubationszeit abzuwarten ist. Auch ist stets eine Kontrolle aufzustellen, durch welche man sich überzeugt, ob die verwendete Kochsalzlösung für das Blut der betreffenden Tierart wirklich isotonisch war, da einige Blutarten, z. B. Hundeblut, bereits in wenig anisotonischer Kochsalzlösung aufgelöst werden können.

Kolorimetrische Beurteilung der Hämolyse: Um die Farbintensität einer Blutlösung und damit die Lösungsintensität eines Hämotoxins abschätzen zu können, stellt man sich nach Madsen zwei Stammlösungen von roten Blutkörperchen in einem Wasser-Glyzeringemisch her, von welchem die eine 60 Teile des Gemisches auf ein Teil Blut, die andere 120 Teile auf ein Teil Blut enthält. Verwendet man zur Prüfung des Hämotoxins die oben erwähnte 5 $^0/_0$ige Blutkörperchenaufschwemmung, so entspricht der kompleten Lösung eine Farbennuance von $^1/_{20}$ (empirisch gefunden), folglich $^1/_{60}$ eine Lösung des 3. Teiles der roten Blutkörperchen, $^1/_{120}$ die Lösung des 6. Teiles.

Eine andere Methode gründet sich auf die Bestimmung des Hämoglobingehaltes der durch Abzentrifugieren etwa restierender roter Blutkörperchen geklärten Flüssigkeit. Man bestimmt den Hämoglobingehalt mit Hilfe des für klinische Zwecke angegebenen Hämometers von Fleischel.

Die Wirksamkeit des Hämotoxins äußert sich entweder in einer vollständigen oder nur teilweisen Auflösung der zugefügten Erythrozyten; für die Beobachtung drückt sich diese Erscheinung entweder in gänzlichem Durchsichtigwerden der ursprünglich deckfarbenen Flüssigkeit oder in nur teilweiser Rötung des Röhrcheninhaltes unter Bildung eines Bodensatzes aus. Neben dem Austritte des Hämoglobins aus dem Stroma scheint, wenigstens bei den meisten Hämotoxinen, noch ein zweiter Vorgang, eine vollständige Zerstörung des Stromas (durch ein verdauendes Ferment?) stattzufinden.

---

*) Siehe auch dieses Handbuch: Madsen, Toxine, allgemeine Methodik.

Schließlich sei noch eine Eigenschaft der blutkörperchenlösenden Bouillonkulturen erwähnt, welche jedoch nur nach Abschwächung der hämotoxischen Wirkung (durch nicht zu weit gehende Verdünnung, gelinde Erwärmung, langes Stehenlassen usw.) wahrnehmbar ist. Es werden dann durch den Einfluß der verwendeten Kulturfiltrate die roten Blutkörperchen der Aufschwemmung verklumpt und fallen zu Boden, eine Erscheinung, welche übrigens auch bei Kulturfiltraten häufig vorkommt, die überhaupt keine hämotoxische Kraft besitzen.

Methoden zur Zerlegung der Hämotoxinwirkung in einzelne Phasen.

Madsen hatte schon darauf hingewiesen, daß das Hämotoxin (Tetanus) an die roten Blutkörperchen zuerst gebunden wird und erst dann nach einer von Giftquantum und Temperatur abhängigen Latenzzeit die Auflösung bewirkt.

Kraus und Lipschütz wenden folgende Methode an, um die Bindung des Hämotoxins an die roten Blutkörperchen von dem Vorgange der Lösung getrennt zu verfolgen: Zu einer bestimmten Menge Blutes (5 ccm defibrin. Kaninchenblut zu 100 ccm 0,85 $^0/_0$ ige Kochsalzlösung) wird die einfach lösende Giftdosis zugesetzt, dann nach verschiedenen Zeiträumen die Blutzellen zentrifugiert, nach zweimaligem Auswaschen mit isotonischer Kochsalzlösung in diesem Medium wieder aufgeschwemmt. 24 Stunden später bestimmt man den Hämoglobingehalt des aufgelösten Blutes. Parallel mit dieser Versuchsanordnung fügt man zu dem gewonnenen Zentrifugat abermals Blutkörperchen und bestimmt aus der Hämolyse die Menge des übrig gebliebenen leicht gebundenen Hämotoxins.

Aus der nachfolgenden Tabelle von Kraus und Lipschütz sind die Versuchsresultate zu entnehmen.

Tabelle 5.

Hämotoxin	Zeit	Hämoglobingehalt	
		der Blutkörperchenaufschwemmung + Kochsalz	des Zentrifugates + Blut
Vibrio	sofort	150	100
	5 Min.	175	80
	10 „	200	—
	15 „	200	—
	20 „	200	—
	30 „	200	—
Tetanus	sofort	40	175
	5 Min.	125	175
	10 „	150	125
	15 „	150	100
	20 „	175	100
	20 „	200	80
Staphylokokken	sofort	175	
	5 Min.	350	
	10 „	400	
	15 „	400	
	30 „	500	

Diese Versuche zeigen, daß die Bindung des Hämotoxins an die roten Blutkörperchen rasch erfolgen kann, andererseits daß die Menge des gebundenen Giftes mit der Versuchsdauer zunimmt.

Die Bindung erfolgt bei den verschiedenen Hämotoxinen zeitlich verschieden.

Mit einer ähnlichen Methode untersuchte Volk, in welcher Weise die Bindung des Hämotoxins (verwendet wurde Staphylokokkenhämotoxin) quantitativ an die roten Blutkörperchen stattfindet.

Er setzte zu einem gewissen Quantum roter Blutkörperchen steigende Mengen Hämotoxin, füllte jede Probe mit 0,85 %iger Kochsalzlösung auf das gleiche Volumen auf und bestimmte die Lösungskraft in der üblichen Weise. Als Lysineinheit nahm er eine der Ehrlichschen Marke „rot" entsprechende Lösungsgrenze, festgestellt nach der kolorimetrischen Methode von Madsen.

Die Differenz der zugesetzten und übrig gebliebenen Lysineinheiten, berechnet auf die stets gleiche Flüssigkeitsmenge, gab die absolute absorbierte Lysinmenge an; die relative läßt sich durch den Quotienten aus absoluter absorbierter und zugegebener Lysinmenge prozentuell leicht angeben.

Zur tunlichsten Vermeidung von Fehlerquellen müssen stets eine größere Zahl von Kontrollversuchen angestellt werden.

Nachfolgende Tabelle (entnommen aus Volks Arbeit) zeigt die Resultate.

Tabelle 6.

Wert des verwendeten Lysin = 100 L_0.

	Zugegebene Lysinmenge in ccm	Zugegebene Lysinmenge in Einheiten	Restliche Lysinmenge in Einheiten	Absorbierte Lysinmenge in Einheiten	Absorbierte Lysinmenge in Prozenten
			5 % Kaninchenblut		
a	0,2	20	5	15	75
	0,4	40	8,5	31,7	79
	0,8	80	25	55	69
	1,0	100	ca. 40	ca. 60	60
	1,6	160	83,3	76,7	48
			10 % Kaninchenblut		
b	0,2	20	0	20	100
	0,4	40	5	35	88
	0,8	80	12,5	67,5	84
	1,0	100	25	75	75
	1,6	160	62,5	97,5	61
			20 % Kaninchenblut		
c	0,2	20	0	20	100
	0,4	40	0	40	100
	0,8	80	5	75	94
	1,0	100	6,3	93,7	93,7
	1,6	160	25	135	84

Aus den Ergebnissen des Versuches a konstruiert Volk folgende Kurve der Absorption (s. Fig. 4, pag. 215).

Bei gleichbleibender Menge der bindenden Substanz wächst also die absolute Absorptionsgröße mit der zugegebenen Lysinmenge, während die relative fällt. Er konnte weiter zeigen, daß sich die Erythrozyten verschiedener Tiere ein und derselben Spezies (Kaninchen) in bezug auf ihre

Bindungsfähigkeit verschieden verhalten. Für den Ausfall der Versuche ist es irrelevant, ob die Hämotoxinmengen auf einmal oder in Intervallen zugefügt werden.

Die Latenzzeit ist der Bindung verkehrt proportional, d. h. die Bindung (resp. Latenzzeit für die Lösung) ist umso kürzer, je mehr Hämotoxin zugefügt wurde. Bei höherer Temperatur erfolgt die Bindung rascher als bei niedriger.

Fig. 4.

Anschließend an diese Untersuchungen haben VOLK und LIPSCHÜTZ und unabhängig von ihnen LANDSTEINER und v. EISLER nachgewiesen, daß nicht nur frische Blutkörperchen, sondern auch die Stromata allein das Vermögen haben, Bakterienhämotoxine zu binden. Die Stromata erhält man leicht, wenn man Blutkörperchen in Aqua destillata oder 1‰ Natrium bicarbonicum aufschwemmt. Es entsteht eine klare durchsichtige Flüssigkeit, aus der man nach Zusatz von etwas Kochsalz (in Lösung oder Substanz) ein Sediment — bestehend aus Detritus und Blutschatten — abzentrifugieren kann. Diese Blutschatten absorbieren zugesetztes Hämotoxin, so daß es in der klaren Flüssigkeit nicht mehr nachweisbar ist.

Nach LANDSTEINER und v. EISLER vermögen Ätherextrakte von Blutkörperchen und Gehirn — erstere allerdings schwächer als durch Einfrieren oder mit destilliertem Wasser hergestellte Stromata — das Tetanushämotoxin zu binden, ebenso auch Cholesterin und in geringerem Grade Lecithinpräparate (MERK, RIEDEL).

Wir wollen kurz die Versuchsanordnung und die Resultate erwähnen:

Von den Lipoiden wurden Ätherlösungen mit einem Gehalt von 0,002 mg im Kubikzentimeter hergestellt. Es ist nötig zu bemerken, daß das Tetanolysin auch durch die im käuflichen Äthyläther vorhandenen Verunreinigungen beeinflußt wird und daß aus diesem Grunde der Äther vor dem Gebrauch zu reinigen ist. Von der Ätherlösung kamen abgemessene Mengen in Reagenzröhrchen; der Äther wurde verdampft, der Rückstand unter Verreiben mit einem Glasstabe mit 1 ccm 1 %iger Kochsalzlösung versetzt und dann 0,1 ccm Tetanolysin und 0,3 ccm 5 %ige serumfreie Aufschwemmung von Kaninchenblut in 1 %iger Kochsalzlösung zugefügt. Die angewendete Tetanolysinmenge ist wenig höher als die einfach komplettlösende Dosis. Die Proben wurden 2 Stunden im Brutschrank und über Nacht im Eisschrank gehalten; dann wurde abgelesen.

LANDSTEINER und v. EISLER stellen nachstehende Tabelle ihrer Versuchsresultate zusammen:

(s. Tabelle 7 pag. 216.)

Aus den eben erwähnten Tatsachen geht hervor, daß eine Bindung des Hämotoxins unter bestimmten Versuchsbedingungen erfolgen kann, ohne daß es zur Auflösung der roten Blutkörperchen zu kommen braucht. In Kenntnis dieser Tatsache ist es leicht erklärlich, daß ein Hämotoxin, das seine blutkörperchenlösende Eigenschaft durch irgend eine Einwirkung eingebüßt hat (Licht, Erwärmen usf.), noch von Erythrozyten gebunden werden kann, natürlich ohne die Diffusion des Hämoglobins in das umgebende Medium zu veranlassen. Die Erythrozyten können dann auch

Tabelle 7.

Art des Zusatzes	Menge der zugesetzten Lösung in ccm	Erfolg
Lecithol Riedel	1,0	gelöst
	0,5	„
	0,1	„
Lecithin Merk	1,0	gelöst
	0,5	„
	0,1	„
Cholesterin	1,0	ungelöst
	0,5	„
	0,2	„
	0,1	teilweise gelöst
Ätherextrakt von Ziegenblutkörperchen	1,0	ungelöst
	0,5	teilweise gelöst
	0,2	„
	0,1	gelöst
Ätherextrakt v. Kaninchenblutkörperchen	1,0	ungelöst
	0,5	teilweise gelöst
	0,2	gelöst
	0,1	„

nach Zusatz eines vollkommen wirksamen Hämotoxins gleicher Art nicht mehr aufgelöst werden. Die Versuchsanordnung, durch welche man sich von dieser Tatsache überzeugen kann, ist folgende:

Es werden bestimmte Mengen eines alten Filtrates, über dessen Unwirksamkeit auf Erythrozyten man sich durch einen Versuch überzeugt hat, mit einem Quantum Blutkörperchen versetzt und durch 2 Stunden bei 37° stehen gelassen. Hernach zentrifugiert man die genannten nicht gelösten Blutzellen ab, setzt sie nach mehrmaligem Waschen in isotonischer Kochsalzlösung einem sicher wirksamen Kulturfiltrat derselben Bakterienspezies zu und hält das Gemisch bei 37° durch weitere 2 Stunden. Während nun in einem entsprechenden Kontrollröhrchen Hämolyse auftritt, bleiben die früher abzentrifugierten Erythrozyten erhalten.

Nachweis der Wirkung des Hämotoxins im Organismus.

Für die Pathogenese der Anämie bei verschiedenen Infektionskrankheiten ist das Vermögen der Hämotoxinbildung der in Betracht kommenden Erreger von Wichtigkeit.

Durch Untersuchungen, die Todd und gleichzeitig und unabhängig Kraus und Ludwig später Streng anstellten, wurde der klinischen Vermutung eine experimentelle Grundlage gegeben. Kraus und Ludwig injizierten Kaninchen mit lebenden Kulturen sicher hämotoxisch wirkender Staphylokokken und Vibrionen. Das Verhalten der Blutkörperchen wurde numerisch im Apparat von Thoma-Zeiß (Zählflüssigkeit: physiologische Kochsalzlösung oder Hayemsche Flüssigkeit), morphologisch in mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Deckglaspräparaten festgestellt. Eine Reihe von Kontrolluntersuchungen ergab, daß der Gehalt an roten Blutkörperchen beim normalen Kaninchen zwischen $5^1/_2$—$6^1/_2$ Millionen im Kubikzentimeter schwankte.

Aus der nachfolgenden Tabelle (nach dem Original) sind Versuchsbedingungen und Resultate zu ersehen.

Tabelle 8.

Kaninchen No.	Injektion am	Zählung vor der Injektion	Zählung nach der Injektion	Im gefärbten Blutpräparate
241	25. September; subkutan 2 ccm Staphylococcus aureus, 10 Tage alte Bouillonkultur	6 000 000 rote Blutkörperchen	29. September 4 800 000 rote Blutkörperchen	29. September: Mäßige Leukocytose, viele mononukleäre Elemente; die roten Blutkörperchen schlecht gefärbt, keine kernhaltigen roten Blutkörperchen. 30. September: Spärliche kernhaltige, polynukleäre Leukocytose, wenig mononukleäre Elemente. 1. Oktober †.
140	25. September; subkutan 2 ccm Staphylococcus aureus, 10 Tage alte Kultur	6 080 000 rote Blutkörperchen	29. September 4 160 000 30. September 3 800 000 1. Oktober 3 600 000 rote Blutkörperchen	29. September: Ungleichheit der roten Blutkörperchen, Makro-, Mikrocyten, 8—10 kernhaltige rote, polynukleäre Leukocytose, wenig große mononukleäre Elemente. 30. September: Starke polynukleäre Leukocytose; kernhaltige rote Blutkörperchen. 17. Oktbr. †.
137	25. September; subkutan 1 ccm Vibrio, 10 Tage alte Bouillonkultur	6 100 000	30. September 3 200 000 1. Oktober 1 800 000 rote Blutkörperchen	27. September: Polynukleäre Leukocytose, kernhalt. rote Normoblasten. 30. September: Ungleichheit der Erythrocyten, Poikylocytose, viele kernhaltige; polynukleäre Leukocytose.
194	27. September; subkutan 2 ccm Vibrio, 2 Tage alte Bouillonkultur	—	1. Oktober 4 800 000 4. Oktober 4 200 000 rote Blutkörperchen	29. September: Mittlere Leukocytose, kernhaltige rote. 1. Oktober: Kernhaltige rote, mäßige polynukleäre Leukocytose.
185	27. September subkutan 2 ccm Vibrio, 2 Tage alte Bouillonkultur	—	3. Oktober 5 600 000 4. Oktober 4 900 000 rote Blutkörperchen	—

Ähnlich sind die Versuche STRENGS, der bei Kaninchen, welchen er Filtrate von Staphylokokken Bouillonkulturen injizierte, einerseits eine beträchtliche Gewichtsabnahme, andererseits eine Verminderung der Zahl der Erythocyten und des Hämoglobingehaltes wahrnahm.

Seine Versuchstiere gingen durchweg an „Kachexie" zugrunde, ohne bei der Sektion einen besonderen pathologischen Befund zu zeigen. Auf Grund seiner Versuchsresultate kommt STRENG zu der Anschauung, daß

in vivo ebenfalls eine Zerstörung der Erythrozyten vor sich gehe, die sich außer einer reichlicheren Ablagerung von Hämosiderin in Milz und Niere durch die oben genannten Symptome zeige.

Die folgende Tabelle, der Arbeit Strengs entnommen, gibt über die einzelnen Details Aufschluß.

Tabelle 9.

Datum	Gewicht	Temperatur		Zahl der roten Blutkörperchen	Zahl der weißen Blutkörperchen	Hämoglobingehalt
		Morgens	Abends			
16. VI.	1600	38,9	39,1	6 152 000	11 600	88
17. VI.	1600	39,1	40,5			
18. VI.	1500	38,4	38,7	5 422 000	13 200	70
19. VI.	1450	38,9	38,8			
20. VI.	1350	39,0	39,1	5 360 000	17 200	75
21. VI.	1350	38,9	39,2			
22. VI.	1300	39,1	39,3	4 860 000	16 800	70
23. VI.	1200	38,9	39,8			
24. VI.	1100	38,6	†			

Für Megatheriumkulturfiltrate wurde die Wirkung im Organismus von Todd beobachtet. Er injizierte größere Mengen von Kulturfiltraten (20 cm) Meerschweinchen subkutan. Die Tiere bekamen meist an der Injektionsstelle ausgedehnte Schwellungen mit nachfolgender Nekrose, ohne jedoch daran zugrunde zu gehen.

Die Resultate von intravenösen Injektionen bei Meerschweinchen stellt er in folgender Tabelle zusammen.

Tabelle 10.

Meerschwein. Nr.	Dosis der filtrierten, intravenös injizierten Kultur	Erscheinungen	Resultat
1	1 ccm + 9 ccm Na Cl	Fünf Stunden später Hämoglobinurie; es waren keine roten Blutkörperchen im Urin.	Bleibt am Leben.
2	2 ccm + 8 ccm Na Cl	Fünf Stunden später Hämoglobinurie; es waren keine roten Blutkörperchen im Urin.	Bleibt am Leben.
3	5 ccm + 5 ccm Na Cl	Eineinhalb Stunden später Hämoglobinurie; es wurden Kristalle von Hämoglobin und wenige rote Blutkörperchen gefunden.	Bleibt am Leben.
4	8 ccm + 2 ccm Na Cl	Drei Stunden später Hämoglobinurie; es waren Krystalle von Hämoglobin und viele Blutkörperchen vorhanden.	Bleibt am Leben.
5	10 ccm	Nach zwei Stunden Hämoglobinurie; keine Blutkörperchen; dreieinhalb Stunden später Hämoglubinurie mit vielen Blutkörperchen.	Stirbt nach 12 Stunden.
6	10 ccm	Hämoglubinurie; Hämaturie; Epistaxis.	Stirbt nach 10 Stunden.

Bei Injektionen von Kaninchen mit dem Bacillus Cholerae gallinarum beobachtete v. WUNSCHHEIM Hämoglobinämie, (nicht bei Hühnern). Bei Milzbrandinfektion tritt nach demselben Autor das Hämoglobin post-mortal stets aus dem Erythrozyten in das Serum, intravital beobachtete er die Erscheinung bloß ein einziges Mal. Bei wiederholter intravenöser Injektion von Colikulturen sah CHARLTON progressive Anämie auftreten.

Die Agarblutplatte und deren Verwertung zur Differentialdiagnose der Vibrionen.

Herstellung der Agarblutplatte.

Zu 10 ccm verflüssigten und auf 42—45 ° abgekühlten Agars werden $^1/_2$—2 ccm frischen, sterilen Blutes zugesetzt. Man kann entweder das Blut direkt aus einem Körpergefäße des Tieres (Carotis) in den Nährboden einfließen lassen, oder verwendet es nach Defibrinierung durch Schütteln mit Porzellankügelchen*).

Will man sich Menschenblutes bedienen, so kann man entweder solches aus dem Nabelstrang vor Abgang der Placenta leicht steril in einem Kolben auffangen und defibrinieren oder man saugt es aus der Vena femoralis einer Leiche nach gründlicher Desinfektion des Operationsfeldes mittelst steriler Pipetten auf. In diesem Falle ist darauf zu achten, daß die Blutkörperchen nicht spontan aufgelöst sind und es sich auch nicht um einen Fall von Sepsis handelt, da man sonst selbstverständlich Verunreinigungen der Platte zu befürchten hätte. Nach gründlichem Vermengen des Blutes mit dem Agar (nicht Schütteln wegen der Bildung zahlreicher störender Luftblasen!) wird die Flüssigkeit in einer Petrischale zur Platte ausgegossen und erstarren lassen.

Auf dem so gewonnenen Nährboden verteilt man nach dem Erstarren oberflächlich sehr sorgfältig, um möglichst isoliert Kolonien zu erhalten, die zu untersuchende Kultur und läßt bei Bluttemperatur die Platten durch 24 Stunden stehen. Nach Ablauf dieser Zeit zeigt sich die Zerstörung der Erythrozyten entweder in einer hellen Zone um jede einzelne Kolonie oder in einem totalen Lackfarbigwerden der ganzen Platte.

Nach PRIBRAM (l. c.) zeigen die erstere Erscheinung jene Mikroorganismen, welche filtrierbare Hämotoxine produzieren, die letztere eine große Anzahl, vielleicht sogar die meisten bekannten Bakterienarten.

Durch die Untersuchungen von KRAUS und seinen Mitarbeitern erlangte die Agarblutplatte eine hervorragende Bedeutung zur Differenzierung in der Gruppe der Vibrionen. Wenn auch die Agglutination und der PFEIFFERsche Versuch die Unterscheidung der Choleravibrionen von anderen nicht spezifischen Vibrionen möglich macht, so muß man doch zugeben, daß diese zwei Reaktionen allein nicht immer genügen. Es war also nicht nur von theoretischem, sondern in Anbetracht der Wichtigkeit dieser Frage auch von praktischem Interesse, daß KRAUS den Nachweis erbringen konnte, es fehle den echten Choleraerregern im allgemeinen das Vermögen der Hämotoxinproduktion, während die anderen in diese

*) Näheres siehe dieses Handbuch: MADSEN, Toxine, allgemeine Methodik.

Gruppe gehörigen Mikroorganismen dasselbe in geringerem oder stärkerem Grade besäßen. (Über die Ausnahmestellung einzelner Stämme s. oben.) In Blutagarplatten lassen sich Choleravibrionen durch den erwähnten Mangel an Hämotoxinproduktion von artverwandten Vibrionen unterscheiden (Kraus).

Kraus hatte ursprünglich zur Herstellung der Platten Kaninchenblut verwendet. Die Nachprüfungen durch Meinike ergeben, daß Kaninchen- und Menschenblutagarplatten für die Differentialdiagnose der Vibrionen ohne Bedeutung seien, weil man eine Inkonstanz des Verhaltens verschiedener Stämme zu häufig konstatierte. Prausnitz wendete noch Kalbsblutagarplatten an und kam zu dem Schlusse, daß zwar nicht qualitative, wohl aber bedeutende quantitative Unterschiede in der Hämolysinbildung auf der Agarblutplatte zwischen Cholera- und verwandten Vibrionen bestehen und hält die Methode von Kraus gerade deshalb im Vereine mit den bisher geübten für verwertbar (so auch Schumacher). Durch weitere Untersuchungen fanden Kraus und Prantschoff, daß Ziegen- oder Hammelblutagarplatten der geeignetste differentialdiagnostische Nährboden sei.

Literatur.

1) Arrhenius und Madsen, Zeitschr. für physikalische Chemie 1903.
2) Bashford, Arch. intern. de Pharmac. et de Thér., Vol. VIII, Fasc. 1/2.
3) Bulloch und Hunter, Centralbl. für Bakt. 1900, Bd. XXVIII.
4) Calamida, Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXV, Nr. 5.
5) Castellani, Lancet 1902, 15. Febr.
6) Dreyer and Jex Blake, Lancet 1904.
7) Durante, Pediatria, Jahrg. X, Nr. 10.
8) Ehrlich, Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 12.
9) Eijkmann, Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXIX.
10) Eisler, v., Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 27 und Nr. 30.
11) Fraenkel und Baumann, Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 20.
12) Kayser, Zeitschr. für Hyg. 1903, Bd. XLII.
13) Koch, Berliner klin. Wochenschr. 1884.
14) Kolle und Meinike, Klinisches Jahrbuch 1905, Bd. XV.
15) Kraus, Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV, Nr. 6.
16) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 50.
17) Ders., Erste Tagung der „Freien Vereinigung für Mikrobiologie" 1906.
18) Kraus und Clairmont, Wiener klin. Wochenschr. 1900, Nr. 3 und 1901 Nr. 42.
19) Kraus und Lipschütz, Zeitschr. für Hyg. 1904, Bd. XLVI.
20) Kraus und Ludwig, Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 5.
21) Kraus und Prantschoff, Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 11.
22) Dies., Centralbl. für Bakt., 1906, Bd. XLI, Nr. 3.
23) Kraus und Pribram, Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 39.
24) Dies., Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLI.
25) Kutscher und Konrich, Zeitschr. für Hyg. 1904, Bd. XLVIII, Nr. 2.
26) Landsteiner und v. Eisler, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXIX, Nr. 3.
27) Landsteiner und Heyrovsky, Erste Tagung der „Freien Vereinigung für Mikrobiologie" 1906.
28) Lewy, E. und P., Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXX.
29) Liefmann und Nieter, Med. Klinik 1906, Nr. 10.
30) Lubenau, Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXX.
31) Madsen, Zeitschr. für Hyg. 1899, Bd. XXXII.
32) Madsen und Walbum, Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVI.
33) Markl, Zeitschr. für Hyg. 1902, Bd. XXXIX.
34) Meinike, Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 28.
35) Ders., Zeitschr. für Hyg. 1905, Bd. L.
36) Neisser, Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 49.

37) Neisser und Wechsberg, Zeitschr. für Hyg. 1901, Bd. XXXVI.
38) Nolf, Annal. de l'Inst. Pasteur 1900, Bd. XIV.
39) Pohl, Arch. intern. de Pharmac. et de Thér., Vol. VII, Fasc. 1/2.
40) Prausnitz, Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 19.
41) Pribram, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen 1906. Erstes Ergänzungsheft.
42) Raybaud, Compt. rend. de la Soc. de biolog., Nr. 32, 54.
43) Sachs, Berliner klin. Wochenschr. 1904.
44) Ders., Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVII.
45) Schottmüller, Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 7.
46) Schumacher, Zeitschr. für Hyg. 1906, Bd. LIV.
47) Streng, Arbeiten aus dem pathologischen Institut zu Helsingfors 1902.
48) Todd, Transactions of the Pathological Society of London 1902, Vol. LIII, Part. II.
49) Volk, Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV.
50) Volk und Lipschütz, Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 50.
51) Dies., Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV.
52) Wassermann, Zeitschr. für Hyg. 1896, Bd. XXII.
53) Weingeroff, Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXIX.
54) Wunschheim, v., Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 26.

XI.

Leukocidin, Aggressin.

Von

Dr. C. Levaditi

in Paris.

I. Leukocidin.

Theoretisches.

Man versteht unter Leukocidin ein vom Staphylococcus pyogenes aureus gebildetes lösliches Toxin, das eine spezifische toxische Wirkung auf weiße Blutkörperchen ausübt, welche sich durch das Absterben derselben und die mehr oder minder vollständige Zerstörung ihres Protoplasmas und des Zellkernes äußert.

Dieses Leukocidin ist eine von vielen Gesichtspunkten aus interessante Substanz. Da sich seine toxische Wirkung auf Leukocyten auch in vitro äußert, kann man bei Leukocidinversuchen mit isolierten Zellen arbeiten, statt, wie dies z. B. für das Studium des Diphtherie- und Tetanustoxins nötig ist, mit ganzen Organismen. Bakteriengifte, die deutlich toxische Wirkung gegenüber bestimmten isolierten Zellen entfalten, sind an sich nicht zahlreich. Das Diphtherietoxin z. B. übt, obwohl es doch für Meerschweinchen äußerst giftig ist, keinerlei zerstörende Wirkung auf die isolierten Leukocyten dieses Tieres aus (Bordet). Nur die Erythrocyten bestimmter Säugetiere sind für einige Bakteriensekrete empfindlich. Diese letzteren — es sind das im speziellen die des Streptococcus pyogenes, des Staphylokokkus, des Tetanusbazillus und einiger bestimmter Rassen der Paracholeravibrionen (Kraus) — lösen in vitro bestimmte Arten roter Blutkörperchen und sind unter dem Namen der Bakterienhämolysine bekannt. Sie haben demnach in gewisser Hinsicht Beziehungen zu dem hier zu besprechenden Leukocidin.

Injiziert man letzteres geeigneten Tieren, so erhält man ein antitoxisches Serum, das Antileukocidin, das im Reagensglasversuch die toxische Wirkung des Leukocidins auf die Leukocyten in typischer Weise neutralisiert. Sein Studium ist also auch insofern interessant, als es gestattet, Untersuchungen über die Neutralisation von Bakterientoxinen durch ihre Antitoxine an isolierten Zellen außerhalb des lebenden Organismus zu führen.

Die weißen Blutkörperchen sind für Gifte der verschiedensten Herkunft empfänglich. Unter die Substanzen, welche Leukocyten zerstören und nicht Bakterienprodukte sind, gehört vor allem das Pepton, dessen leukotoxische Eigenschaften von E. BOTKIN[3]) aufgedeckt wurden. BOTKIN nahm an, daß die Leukopenie, welche man durch die Injektion einer Peptonlösung in den Blutkreislauf beim Hunde oder Kaninchen erzeugen kann, direkt durch die Auflösung der zirkulierenden Leukocyten hervorgerufen wird. Zum Beweise dieser Anschauung mischte BOTKIN Eiter mit einer 15 %igen Lösung von Wittepepton und fand, daß nach 20 Minuten Kontakt die Leukocyten durchsichtig wurden, einen Teil ihrer um den Kern angehäuften Granulationen verloren und schließlich in ein kleines Bläschen sich umwandelten. Diese Schädigungen, die das Anfangsstadium einer vollständigen Auflösung der Zellen darstellen, erinnern an die Befunde HOLZMANNS[7]) in der Milz von mit Terpentin behandelten Kaninchen und Hunden. Völlige Lösung tritt nur bei Anwendung konzentrierter Peptonlösungen ein; bei schwachen Lösungen fehlt sie, wie TSCHISTOWITSCH[11]) und BAIL[1]) gesehen haben.

Eine andere Art leukolytischer Substanzen tierischen Ursprungs sind die Leukotoxine. Man bezeichnet mit diesem Namen Bestandteile des Serums von Tieren, die mit Leukocyten einer fremden Tierspezies vorbehandelt sind. Die Leukotoxine sind für weiße Blutkörperchen äußerst starke Gifte. Da sie aber Gegenstand eines besonderen Kapitels dieses Werkes sind, haben wir uns hier nicht weiter mit ihnen zu beschäftigen.

Der Nachweis, daß überhaupt Bakterien oder Bakterienprodukte einen schädigenden Einfluß auf die weißen Blutzellen ausüben können, ist zuerst von METSCHNIKOFF[9]) erbracht worden. Im Verlaufe seiner bekannten Studien über eine Krankheit der Daphnien, und zwar über die durch Monospora bicuspidata (einen für diese Tierart pathogenen Pilz) hervorgerufene Infektion fand METSCHNIKOFF regelmäßig die Sporen des Infektionserregers von den Wanderzellen der Wasserflöhe eingeschlossen, wenn das Tierchen die Krankheit überstand. Wenn es jedoch dem Pilz gelingt, in der Leibeshöhle der Daphnie zur Entwicklung zu kommen, dann sind die Leukocyten unfähig, den Parasiten zu phagocytieren; ja sie unterliegen sogar einer schädigenden Wirkung seinerseits. METSCHNIKOFF beschreibt die Veränderung, die sie hierbei erleiden, mit folgenden Worten:

„Auch konnte man mehrmals sehen, daß die Blutkörperchen in der Nachbarschaft von zahlreichen Pilzzellen sich allmählich auflösten und vollständig verschwanden, was darauf hinweist, daß die Gonidien irgend eine für Blutkörperchen schädliche Flüssigkeit absondern. . . . . Je weiter die Krankheit fortgeschritten ist, um so mehr Blutkörperchen werden aufgelöst, so daß zu der Zeit, wo die Daphnie eine bedeutende Anzahl reifer Sporen enthält, sie bereits keine oder nur wenige Blutkörperchen aufweist*)."

Es handelt sich also um eine Auflösung weißer Blutkörperchen, die durch bestimmte, von der Monospora produzierte Substanzen hervorgerufen wird, also einen Vorgang, der den Daphnienorganismus teilweise oder vollständig seiner leukocytären Verteidigungsmittel beraubt und ihn der Infektion preisgibt. Obwohl METSCHNIKOFF keinen direkten Nachweis für das Vorhandensein löslicher Leukocidine beigebracht hat, haben

*) METSCHNIKOFF, l. c. pag. 186.

doch seine Beobachtungen das eingehendere Studium bakterieller Leukocytengifte inauguriert.

Gleichfalls im Sinne von Vorarbeiten seien die Versuche von Borissow[4]) angeführt. Er untersuchte den chemotaktischen Einfluß (siehe den Abschnitt Chemotaxis in dem Kapitel über Phagocytose. Bd. II.) verschiedener Chemikalien und Bakterienkulturen auf Hunde- und Kaninchenleukocyten am lebenden Tiere, und zwar unter Anwendung folgender Technik:

Methode. Man benötigt eine Anzahl kleiner Glaskapillaren von 18–20 mm Länge und 1,3–1,5 mm Weite, die an einem Ende verschlossen sind. An dieses Ende kommt die zu untersuchende Substanz in einer Schicht von etwa 6—8 mm Höhe; der übrige Teil der Kapillare wird mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt. Man sterilisiert die Röhrchen bei 100° und führt sie mit Hilfe eines Trokarts unter die Haut des Versuchstieres ein. Nach Ablauf einer bestimmten Zeit werden sie nacheinander herausgezogen und mikroskopiert. Die Quantität der Leukocyten, die sich dabei an ihrem offenen Ende vorfindet, zeigt die Stärke der Chemotaxis der untersuchten Substanz an.

Mit Hilfe dieses Verfahrens wies Borissow nach, daß abgetötete Kulturen von Staphylococcus aureus nicht nur mit großer Intensität weiße Blutkörperchen anziehen, sondern in deutlichster Weise direkt lytisch auf sie wirken. So enthielt z. B. eine Kapillare mit Staphylokokken nach viertägigem Verweilen unter der Haut eines Hundes zahlreiche „zerstörte weiße Blutkörperchen“, und ebenso verhielt es sich beim Experiment am Kaninchen. Borissow schließt hieraus auf einen starken Giftgehalt der von Staphylokokkus gelieferten Stoffwechselprodukte.

Trotz dieser Ergebnisse, die zugunsten von löslichen Bakterienprodukten mit leukolytischen Eigenschaften sprachen, ist es erst van de Velde[12]) gelungen, diese Körper zu isolieren und mit Kulturfiltraten Leukolyse in vitro hervorzurufen. Van de Velde studierte das Verhalten von Kaninchen gegenüber zwei Staphylokokkenstämmen (A und V), von denen der eine eine mittlere Virulenz hatte (M. T. D. = 5—6 ccm Bouillonkultur); der andere durch wiederholte Tierpassagen stark virulent gemacht worden war (M. T. D. = $^1/_{150}$ ccm). Bei Injektionen in die Pleurahöhle von Kaninchen beobachtete van de Velde nun, daß beim Stamme V die im Pleuraexsudat enthaltenen Leukocyten schon nach kurzer Zeit (4—8 Stunden) abstarben, was sich durch Deutlicherwerden der Kerne und Aufhören der amöboiden Bewegungen äußerte, (van de Velde vermutete, daß diese Veränderungen durch eine im Exsudat enthaltene, die Leukocyten schädigende Substanz verursacht würden, die er ihrerseits für ein Sekretionsprodukt der injizierten Staphylokokken hielt). Um die Richtigkeit seiner Annahme zu beweisen, mischte van de Velde in vitro lebende weiße Blutkörperchen mit einer geringen Menge zentrifugierten Pleuraexsudats, das von einem durch Injektion mit virulenten Staphylokokken vorbehandelten Kaninchen stammte. Er konnte nun wahrnehmen, daß die Leukocyten unter diesen Bedingungen ähnliche wie die eben beschriebenen Veränderungen erlitten. Zum endgültigen Nachweis, daß das Leukocidin tatsächlich vom Staphylokokkus produziert wird und nicht etwa ein Sekretionsprodukt des Kaninchens ist, untersuchte van de Velde Staphylokokkenkulturen in Bouillonblutserum oder reinem Blut auf diese Substanz hin. Er fand nun, daß schon Filtrate von 24stündigen, besonders aber von zweimal 24stündigen Kulturen die gleichen degenerativen Ver-

änderungen hervorriefen, die er früher im Pleuraexsudat beobachtet hatte*). Nach VAN DE VELDE besteht in der Fähigkeit, das Leukocidin zu bilden, kein Unterschied zwischen virulenten und avirulenten Stämmen; nur entwickelt sich das Leukocidin rascher in der Kaninchenpleura, wo es schon nach 4 Stunden nachweisbar ist, als in der Brutschrankkultur (mindestens 24 Stunden).

Was nun die Natur des Leukocidins anlangt, so hat VAN DE VELDE die Vermutung geäußert, daß es sich um einen Körper von der Art der Enzyme handelt; er stützt diese Ansicht auf das Verhalten des Leukocidins gegen Wärmeeinflüsse. Vergleichende Versuche haben nämlich erwiesen, daß die fragliche Substanz thermolabil ist und bei 58° zerstört wird: während beim Versuch mit Leukocidin, das 10 Minuten auf 55° erwärmt worden war, die Leukocyten noch stark geschädigt wurden, war dies beim Erwärmen auf 58° nicht mehr der Fall. Die Zellen zeigten normales Aussehen und normale Beweglichkeit. Das Leukocidin ist also ein thermolabiles Bakteriengift, wie von allen Untersuchern, die sich nach VAN DE VELDE mit dieser Frage beschäftigten, bestätigt wurde. BAIL[1]) fand, daß leukocidinreiches Pleuraexsudat eines mit Staphylokokken vorbehandelten Kaninchens nach Erwärmung auf 60° vollkommen unwirksam wird, während längeres Verweilen im Brutschrank bei 37° keinerlei Einfluß hat. NEISSER und WECHSBERG[10]) sahen, daß das Leukocidin durch Erwärmen auf 50° durch 20 Minuten seine leukotoxischen Eigenschaften einbüßt, während das vom Staphylococcus aureus produzierte Hämolysin erst bei 56° inaktiv wird, was auf gewisse Unterschiede dieser beiden von einem und demselben Bakterium stammenden Substanzen hinweist.

Zusammenfassend können wir also sagen: das Leukocidin ist ein vom Staphylococcus aureus gebildetes giftiges Stoffwechselprodukt mit Toxincharakter; es wird durch den Einfluß mäßiger Temperaturgrade zerstört. Seine Wirkung entfaltet es namentlich gegenüber den weißen Blutelementen, die unter seinem Einflusse absterben und sich mehr oder weniger vollständig auflösen*).

Untersuchungstechnik.

Herstellung des Leukocidins.

a) in vivo. Man injiziert mittelst einer Pravazspritze einem Kaninchen eine oder mehrere tödliche Dosen (z. B. 1 ccm) einer Bouillonkultur von Staphylococcus aureus in die Pleurahöhle, wartet den spontanen Tod des Tieres ab oder tötet dasselbe, was besser ist, einige Stunden nach der Injektion. BAIL rät, die Menge der zu injizierenden Kultur so zu bemessen, daß das Tier ungefähr nach 24 Stunden eingeht. Man öffnet dann die Pleurahöhle durch seitliche Einschnitte, oder wie HAHN[8]) angibt, indem man mittelst einer sterilen Scheere ein kleines Fenster in die Brustwand macht. Das gewöhnlich etwas blutige Exsudat wird mit einer Kugelpipette aufgesaugt und zentrifugiert; die über dem Sediment befindliche Flüssigkeitsschicht enthält das gewünschte Leukocidin.

b) in vitro. Methode von VAN DE VELDE. — Wie wir schon oben gesehen haben, stellt letzterer das Leukocidin in vitro dar. Größere

*) DENYS und VAN DE VELDE haben gefunden, daß die das Leukocidin enthaltenden Stoffwechselprodukte von Staphylococcus aureus nicht nur auf Leukocyten, sondern auch auf andere Zellen, so z. B. auf Bindegewebszellen und auf die Elemente des sympathischen Nervensystems des Kaninchens einwirken, und zwar auch in vitro.

Kölbchen mit Bouillon-Kaninchenserum resp. defibriniertem Kaninchenblut werden mit Staphylococcus aureus geimpft und zweimal 24 Stunden bei 38° belassen. Sie enthalten dann bedeutende Mengen von Leukocidin.

Methode von Bail[2]). — Bail gelang es, ein aktives Leukocidin zu erhalten, indem er einen für Kaninchen sehr virulenten Staphylokokkenstamm auf folgende zwei Nährböden aussäte:

1.	Glyzerinlösung 1 %	40 ccm
	Kaninchenserum	15 ccm
2.	Bouillon	80 ccm
	Ovarialcystenflüssigkeit	20 ccm.

Nach Bail variiert die Leukocidinbildung in verschiedenen Kolben, die mit dem gleichen Stamm beschickt wurden, ohne erkennbaren Grund in sehr bemerkenswerter Weise. Die größte Leukocidinmenge fand er in 11 tägigen Kulturen.

Methode von Neisser und Wechsberg[10]). — Diese beiden Forscher benutzen gewöhnliche Bouillon, die jedoch in besonderer Weise alkalisch gemacht ist. In eine Anzahl von Reagensgläsern werden je 10 ccm Bouillon gefüllt und in jedes einige Tropfen Phenolphthalein hinzugefügt. Von einer aus gleichen Teilen einer $^1/_{10}$ Normalnatrium- und einer $^1/_{10}$ Normalkaliumlösung bestehenden Mischung wird in die einzelnen Gläser so viel hineinpipettiert, daß eben gerade der Umschlag des Phenolphthaleins in Rot erfolgt, und dann berechnet, wie viel von der Mischung nötig wäre, um mehrere Kolben derselben Bouillon zu alkalinisieren. Um nun ein möglichst aktives Leukocidin zu erhalten, empfehlen Neisser und Wechsberg die Bouillon nicht mit der ganzen berechneten Menge (n), sondern nur etwa $^1/_3$ derselben zu versetzen. Das Leukocidin ist schon nach viertägigem Stehen der Kulturen bei 38° nachweisbar; es erreicht das Maximum seiner Produktion am achten Tage. Um diese Zeit müssen also die Kulturen durch ein Chamberland-, Berkefeld- oder Reichelfilter filtriert werden. Das erhaltene bakterienfreie Präparat wird im Eisschrank aufbewahrt, nachdem zu je 100 ccm des Filtrats 5 ccm folgender Lösung hinzugefügt worden sind:

Karbolsäure	10 g
Glyzerin	20 g
Aqua destill.	70 g.

Trotz dieser Vorsichtsmaßregeln schwächt sich das Leukocidin ziemlich rasch ab. So erwähnen Neisser und Wechsberg ein Toxin, dessen wirksame Dosis anfänglich 0,0075 betrug. 11 Tage später war sie auf 0,025 ccm gestiegen; nach weiteren fünf Tagen betrug sie sogar das 10fache. Es ist nicht uninteressant, daß das vom Staphylokokkus gebildete Hämolysin sich in dieser Hinsicht verschieden verhält; es wird weit langsamer abgeschwächt als das Leukocidin und man erhält daher durch Stehenlassen oft Filtrate, die noch hämolytisch wirken, während sie ihre leukolytische Eigenschaft vollständig verloren haben.

Präparation der Leukocyten.

Die für einen Leukocidinversuch notwendigen Leukocyten erhält man nach van de Velde durch Injektion einer abgetöteten Bouillonkultur von Staphylokokken in die Kaninchenpleura. 20 Stunden nach der Injektion enthält das Exsudat eine große Anzahl lebender beweglicher Leukocyten.

Bail[2]), Neisser und Wechsberg[10]) benützen zu dem gleichen Zweck Aleuronatbrei. Aleuronat (Merck) wird in physiologischer

0,85 %iger Kochsalzlösung im Verhältnis von 3:40 aufgeschwemmt, die Aufschwemmung sterilisiert und 7—12 ccm davon in die Pleurahöhle eines Kaninchens eingespritzt, natürlich unter sorgfältiger Vermeidung der Interkostalgefäße. 24 Stunden nach der Injektion werden die Tiere durch Entbluten getötet und das Pleuraexsudat mit dem gleichen Volumen einer 1 %igen Natriumoxalatlösung verdünnt, um die Gerinnung zu verhindern.

Hinzuzufügen ist noch, daß, wenn man mit Meerschweinchenleukocyten zu arbeiten wünscht, eine einzige Einspritzung von 10 ccm Bouillon oder isotonischer Kochsalzlösung in das Peritoneum genügt, um die Bildung eines sehr leukocytenreichen Exsudates anzuregen, dessen weitere Behandlung analog dem eben Gesagten erfolgt.

Versuchsanordnung.

Nach van de Velde injiziert man Kaninchen mehrfach tödliche Dosen von Staphylococcus aureus in die Pleura, punktiert in regelmäßigen Zeitabständen mittels einer Pravazspritze oder einfach einer feinen Glaspipette und untersucht im hängenden Tropfen. Schon vier, sechs bis acht Stunden nach der Injektion läßt sich deutliche Vakuolisierung, Verlust der Granula usw. nachweisen. — Bail[2]) empfiehlt folgende Untersuchungsmethode: zwei Kaninchen von gleichem Gewicht erhalten bestimmte Mengen einer sterilen Aleuronatemulsion (s. oben) in die Pleurahöhle; 24 Stunden später injiziert man auf der gleichen Seite 1—3 ccm leukocidinhaltigen Kulturfiltrats von Staphylococcus aureus, und zwar erhält das eine Kaninchen aktives Leukocidin, das andere als Kontrolle ein durch Erhitzen auf 60° inaktiviertes. Je nach der Aktivität des Präparates beginnen die degenerativen Veränderungen an den Leukocyten 1—1½ Stunde nach der Injektion. Späterhin treten nach und nach in der Pleurahöhle wieder größere Mengen normaler weißer Blutkörperchen ohne Entartungserscheinungen auf, ein Beweis, daß das injizierte Leukotoxin in dieser Zeit schon verbraucht resp. resorbiert ist. Nach Bails Angaben verhalten sich die verschiedenen Leukocytenarten gegenüber dem Leukocidin verschieden. Es sind besonders die polynukleären Pseudoeosinophilen, die der Giftwirkung zuerst erliegen, während die Lymphocyten länger Widerstand leisten.

In vitro kann man die Leukolyseuntersuchungen auf zwei Arten vornehmen:

a) mittels des heizbaren Objekttisches. van de Velde und Bail empfehlen Leukocyten, die man auf die eben beschriebene Art gewonnen hat, und das aus Pleuraexsudat oder filtrierten Kulturen gewonnene Leukocidin auf einem Deckgläschen zu mischen, mittels eines hohlen Objektträgers durch Abschließen mit Vaselin eine feuchte Kammer herzustellen und auf dem heizbaren Objekttische bei 37° zu beobachten (Fig. 1).

Fig. 1. Wirkung des Leukocidins (nach van de Velde). *a* normale lebende Leukocyten. *b* ebensolche nach Einwirkung des Leukocidins. *s* Staphylokokken.

Die hierbei zu beobachtenden Veränderungen sind von den zuletzt genannten Autoren in allen ihren Einzelheiten beschrieben worden.

Die Leukocyten erscheinen danach im Laufe der Beobachtung immer mehr und mehr als durchsichtige Scheiben, die Granulationen werden an der Peripherie der Zelle spärlich und häufen sich mehr in der Nachbarschaft des Kernes an, der seinerseits scharf hervortritt (Fig. 1). Alsbald verwandelt sich der einzelne Leukocyt in ein helles Bläschen, das nurmehr unregelmäßige Kernfragmente enthält. Bail nimmt an, daß die Leukocytengranula sich meist erst nach Verlust des Cytoplasmas gewissermaßen extracellulär auflösen. Man hat aber mitunter den Eindruck, daß das Toxin durch Imbibition in die noch erhaltenen Zellen eindringt und die Körnung an Ort und Stelle zur Lösung bringt (Fig. 2).

Das genannte Verfahren eignet sich wenig zur quantitativen Untersuchung. Neisser und Wechsberg haben es deshalb durch ihre bioskopische Methode ersetzt.

a b c

Fig. 2. Wirkung des Rauschbrandleukocidins auf menschliche Leukocyten: *a* polynuklearer frischer Leukocyt; *b* und *c* derselbe nach Einwirkung des Leukocidins. Fuchsinfärbung. (Nach einem Präparat des Herren Eisenberg.)

b) Bioskopische Methode von Neisser und Wechsberg. Sie beruht auf der Eigenschaft lebender Zellen, bestimmte Farben, besonders das Methylenblau, in ihre Leukoverbindung zu reduzieren; dieses Vermögen erlischt mit dem Leben der Zelle (Ehrlich). Fügt man zu einer bestimmten Leukocytenmenge aus frischem Exsudat eine Spur von Methylenblau, so entfärbt sich das blaue Gemisch nach Ablauf einer gewissen Zeit vollständig. Waren jedoch vorher die Leukocyten unter dem Einflusse des Leukocidins in ihrer Vitalität geschädigt worden, so bleibt die Reduktion des Methylenblaus aus. Die am besten geeignete Farblösung besteht aus:

Methylenblau	1,0
Alcohol absol.	20,0
Aqua destill.	20,0.

Unmittelbar vor Gebrauch verdünnt man diese Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis von 1:50. Der Versuch wird auf folgende Weise angestellt: Man füllt in eine Anzahl kleiner Reagensgläschen steigende Mengen eines zur Hälfte mit Natriumcitratlösung verdünnten Leukocytenexsudats (0,05, 0,1, 0,15 usw.), füllt die Röhrchen mit Kochsalzlösung auf 2 ccm auf, fügt je zwei Tropfen der Methylenblaulösung hinzu und bringt auf die Oberfläche eine Schicht sterilen flüssigen Vaselins, die den Zutritt der Luft und damit die Oxydation der entstehenden Leukoverbindung verhindert. Die Röhrchen werden nun auf zwei Stunden in den Brutschrank gestellt. Dasjenige, in welchem das Methylenblau fast vollständig reduziert ist, entält die Limes reducens (l. c. Neisser und Wechsberg).

Nachdem diese so bestimmt ist (z. B. = 0,25 ccm), gibt man in eine zweite Serie von Reagensgläschen die doppelte Dosis (also 0,5) und fügt steigende Dosen Leukocidin hinzu. Nach $1\frac{1}{2}$ stündigem Verweilen im Brutschrank bei 37° erhält jedes Röhrchen zwei Tropfen der Methylenblaulösung und darüber die Vaselinschicht. Dann werden die Röhrchen abermals, und zwar für zwei Stunden in den Thermostaten (38°) gestellt. Nach Ablauf dieser Zeit werden sie miteinander verglichen; dasjenige, in

dem die Reduktion des Methylenblaus nahezu vollständig gehemmt ist, enthält die toxische Minimaldosis des Leukocytengiftes.

Diese Methode hat NEISSER und WECHSBERG gestattet, einige speziellere, auf die Analyse des Leukocidins bezügliche Fragen zu beantworten — Fragen, auf welche wir hier aber nur kurz eingehen können.

Da ist vor allem die Zeit, in welcher das Leukocidin die weißen Blutkörperchen abtötet. Es zeigt sich, daß sie einmal von der Aktivität des Staphylokokkengiftes, andererseits von der Zahl der Leukocyten bei konstanter Leukocidinmenge abhängt. Im allgemeinen ist sie ziemlich kurz; VAN DE VELDE sah schon nach Ablauf weniger Minuten die weißen Blutzellen sich auflösen; quantitative Untersuchungen von NEISSER und WECHSBERG haben in einem gewissen Gegensatz dazu gezeigt, daß das Leukocidin ziemlich langsam wirkt wenn man in der von diesen Autoren angegebenen Art vorgeht, so daß als Index der Toxizität das Reduktionsvermögen der Leukocyten angenommen wird. So war in einem Versuche von NEISSER und WECHSBERG bei halbstündiger Einwirkung 0,75 ccm Leukocidin notwendig, um die reduzierende Kraft eines halben Kubikzentimeters Leukocytenexsudats zu neutralisieren; während nach dreistündigem Kontakt diese toxische Minimaldosis auf 0,025 sank. Eine andere Frage, die durch die Untersuchungen der letztgenannten Autoren ziemlich geklärt worden ist, betrifft die Variation der Leukocidinbildung je nach den dazu verwandten verschiedenen Bakterienrassen (Staphylococcus aur. und alb.). Im allgemeinen scheinen sehr virulente Varietäten ein wirksameres Leukocidin zu bilden, als Stämme, die lange Zeit in vitro kultiviert wurden und wenig pathogen sind. Durch wiederholte Kaninchenpassagen gelang es, die Produktionsfähigkeit eines Staphylokokkenstammes wieder herzustellen, die er durch wiederholtes direktes Überimpfen auf Agar eingebüßt hatte.

Schließlich variiert das Sekretionsvermögen von Stämmen verschiedener Herkunft innerhalb ziemlich weiter Grenzen (beispielsweise kann ein bestimmter Stamm bis über 100 Mal mehr Toxin produzieren als ein anderer). Im allgemeinen bildet die Mehrzahl von Staphylococcus aureus-Stämmen relativ bedeutende Mengen von Leukocidin. Unter 19 untersuchten Stämmen fanden NEISSER und WECHSBERG 15 Leukocidinbildner.

Der Staphylococcus pyogenes albus produziert ebenfalls Leukocidin, aber viel seltener als der aureus (von fünf untersuchten Stämmen zwei). Beide Leukocidinarten scheinen miteinander identisch zu sein, da sie sich nach NEISSER und WECHSBERG durch ein und dasselbe Antileukocidin (s. oben) neutralisieren lassen.

Das sind im wesentlichen die über Entstehungsbedingungen und Eigenschaften des Leukocidins vorliegenden Befunde. Es ist sehr wahrscheinlich, daß ähnliche leukocytenschädigende Gifte auch von anderen Bakterien gebildet werden, jedoch fehlt es nach dieser Richtung hin zurzeit noch an ausreichend begründeten Untersuchungen*). Alles, was man darüber

---

*) DENYS und VAN DE VELDE haben bei Kaninchen in Pleuraexsudaten die durch Injektion von Kolibazillen, Streptokokken, Diphtherie-, Typhusbazillen und Pneumokokken hervorgerufen worden waren, Leukocidin nicht nachweisen können. Dagegen hat GEORGIEWSKI[6a] gefunden, daß Kulturen von Bacillus pyocyaneus schädigend auf Leukocyten einzuwirken vermögen. Das Pyocyaneusleukocidin wird durch Serum aktiv gegen Pyocyaneus immunisierter Tiere nicht neutralisiert.

Es sei schließlich noch an neuere Versuche von EISENBERG[5a] erinnert, der in Kulturen vom Bazillus des malignen Ödems und von Rauschbrandbazillen lösliche, auf

weiß, ist, daß nicht allein Spaltpilze, sondern auch bestimmte giftige Vertreter der Tierklasse leukotoxische Stoffe produzieren, wie aus den Untersuchungen von Flexner und Noguchi[6]) über ein Schlangengiftleukocidin hervorgeht. Die genannten Autoren erzeugten durch Injektion einer sterilen Kultur von Bacterium megatherium Pleuraexsudate, die 20—25 % Lymphocyten enthielten. Indem sie nun eine bestimmte Menge dieses Exsudates mit 0,02 % Kobragift mischten, sahen sie, daß die Leukocyten sich zuerst und verhältnismäßig schnell auflösten, während die Lymphocyten als letzte zugrunde gingen. Vermutlich hat das Leukotoxin des Kobragiftes eine komplexe Konstitution, entsprechend der des Hämolysins, das in dem gleichen Gifte enthalten ist.

Literatur.

1) Bail, Arch. für Hyg. 1897, Bd. XXX, pag. 348.
2) Ders., Arch. für Hyg. 1898, Bd. XXXII, pag. 133.
3) Botkin, Virchows Archiv 1894, Bd. CXXXVII, pag. 476.
4) Borissow, Zieglers Beiträge 1894, Bd. XVI, pag. 432.
5) Denys und van de Velde, La Cellule 1895, Tome XI, pag. 365.
5a) Eisenberg, C. R. de la Société de Biologie 1907, Tome LXII, pag. 491.
6) Flexner und Noguchi, Univ. of Pennsylv. Med. Bull. 1902, pag. 194; Journ. of experim. Med. 1902, Bd. VI, pag. 186.
6a) Georgiewsky, Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII, pag. 298.
7) Holzmann, Dissertation. St. Petersburg 1893.
8) Hahn, Arch. für Hyg. 1896, Bd. XXV, pag. 105.
9) Metschnikoff, Virchows Archiv 1884, Bd. XCVI, pag. 177.
10) Neisser und Wechsberg, Zeitschr. für Hyg. 1901, Bd. XXXVI, pag. 299.
11) Tchistowitsch, Centralbl. für med. Wissenschaften 1894, Nr. 14/15.
12) Van de Velde, La Cellule 1894, Tome X, Fasc. 2, pag. 403.
13) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1895, pag. 580.

Leukocyten lytisch wirkende Substanzen nachwies. Unter dem Einfluß des von diesen Anaeroben gebildeten Leukocidins runden sich die polymorphkernigen Leukocyten rasch ab, das Protoplasma wird unter Verlust der Granula homogen, der gelappte Kern fließt zu einer hohlen runden Blase zusammen (siehe Fig. 2). Dieses Leukocidin wird bei Temperaturen zwischen 50 und 55° zerstört, es ist also gleichfalls thermolabil.

II. Aggressine.

Begriffsbestimmung; Theoretisches.

Eines der am eifrigsten diskutierten biologischen Probleme betrifft den Mechanismus der sog. Virulenz der verschiedenen Mikroorganismen. Man hat sich von jeher die Frage vorgelegt, warum sich die diversen Bakterienarten dem tierischen Organismus gegenüber so grundverschieden verhalten, — warum beispielsweise ein einziger virulenter Streptokokkus unter Umständen genügt, um beim Kaninchen eine tödliche Sepsis hervorzurufen, während die Injektion ganzer Kulturen von Bac. subtilis bei derselben Tierart ohne jede Wirkung bleibt. Eine Reihe von Forschern zieht gewisse Eigenschaften der Körperzellen und Körpersäfte zur Lösung dieser Frage in der Weise heran, daß, nach ihrer Ansicht, der mit „natürlicher Immunität" ausgestattete Organismus in Gestalt von Zellen (Leukocyten, Schule von Metschnikoff) oder gewisser in den Säften zirkulierender „bakterizider" Substanzen (Buchner, Baumgarten, Pfeiffer u. a.) wirksame Waffen gegen das Eindringen und die Vermehrung von den Bakterienarten besitzt, die wir empirisch als Saprophyten (für den betreffenden Organismus nicht pathogene Mikroben) kennen; so daß andererseits das Fehlen phagocytärer und bakterizider Qualitäten gegenüber bestimmten Mikroorganismen, diese für gewisse Tierarten eben zu pathogenen, zu krankheitserregenden Keimen stempelt.

Während so die genannten und viele andere Autoren den springenden Punkt der Frage in Eigenschaften des reagierenden Organismus sehen, schreiben wieder andere den Mikroorganismen selbst und deren Lebensäußerungen hierbei die Hauptrolle zu. Ein gegebenes Tier besitzt, nach dieser Auffassung, allen Bakterienarten mit denen es überhaupt in Konflikt gerät, die gleichen Verteidigungsmöglichkeiten, dieselben Waffen. Wenn nun trotzdem dieses Tier gegen eine Injektion mit der Spezies **a** z. B. äußerst empfindlich ist, während es sich der Spezies **b** gegenüber völlig indifferent verhält, so liegt dies daran, daß die Spezies **a** ihrerseits imstande ist, sich gegen die zerstörende, resp. hemmende Arbeit der Körperphagocyten und der bakteriziden Säfte zur Wehr zu setzen, während der Spezies **b** diese Eigenschaft abgeht.

Zu den Hauptvertretern dieser letzteren Anschauung über das Wesen der Virulenz gehört O. Bail mit der von ihm aufgestellten Aggressinhypothese. In Übereinstimmung mit seinen Vorgängern Kruse[30]) und Deutsch[17]) verficht Bail[1,2]) die Anschauung, daß die pathogenen Mikroorganismen die Eigenschaft besitzen **im lebenden tierischen Organismus** gewisse lösliche Substanzen zu sezernieren, die er Aggressine nennt und deren wesentliche Aufgabe es ist, die Abwehrmaßregeln des betroffenen Tieres null und nichtig zu machen. Diese Hypothese, die mit der von Kruse aufgestellten insofern Ähnlichkeit hat, als dort den Lysinen dieselbe Rolle zugeschrieben wird, wie hier den supp. Aggressinen, stützt sich auf eine Unmenge von experimentellen Befunden, die zum großen Teil von Bail selbst, zum Teil von seinen Mitarbeitern Weil, Kikuchi Salus u. a. beigebracht worden sind. Sie erstrecken sich auf eine größere Anzahl von Bakterienarten, hauptsächlich Cholera-, Typhus-,

Tuberkellbazillen, Staphylococcus aureus, Hühnercholera, Schweinepest usw. usw. Ungeachtet dieses umfangreichen Beweismaterials ist Bails Hypothese nicht von allen Bakteriologen anerkannt worden und die Diskussion über sie dauert fort. Das würde eigentlich ein näheres Eingehen auf die einzelnen Untersuchungen erübrigen, wenn nicht die praktische Seite der Frage von Interesse auch für denjenigen wäre, der theoretischen Erörterungen kühl gegenüber steht. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß die „Aggressine" ein vorzügliches Ausgangsmaterial für aktive Immunisierung gegen Bakterien sind und daß bei Behandlung geeigneter Tiere mit Aggressinen „Antiaggressine" entstehen, welche unstreitig eine präventive (prophylaktische) Wirkung zu entfalten vermögen.

Bail teilt die Bakterien in drei Klassen ein: 1. Echtparasiten, 2. Halbparasiten, 3. Saprophyten.

Zu den Echtparasiten gehören die am ausgesprochensten pathogenen Mikroben, wie virulenter Milzbrand und Hühnercholera. Die Injektion nur weniger Individuen dieser Klasse genügt, um bei empfänglichen Tieren tödliche Sepsis hervorzurufen, wobei gleichzeitig eine kolossale und rapide Vermehrung der Parasiten erfolgt.

Zur Klasse der Halbparasiten rechnet Bail solche Bakterien, deren Virulenzgrad nicht so hoch ist, wie bei der ersten Gruppe, so daß es der Injektion relativ größerer Kulturmengen bedarf, um eine Erkrankung des Versuchstieres herbeizuführen. Hierzu gehörten z. B. Bac. typhi und Vibrio cholerae.

Das Charakteristikum der dritten Gruppe endlich bildet die völlige Abwesenheit pathogener Eigenschaften. Von Bac. subtilis können z. B. manchen Tieren enorme Mengen injiziert werden, ohne daß irgendwelche Störungen auftreten oder die eingeführten Spaltpilze sich vermehren.

Vergleicht man, wie es Bail getan hat, im Tierversuch das Verhalten eines Echtparasiten (Milzbrand) und eines Saprophyten (Subtilis) gegenüber Kaninchen z. B., so konstatiert man für die allererste Zeit nach der Injektion eine weitgehende Übereinstimmung in beiden Fällen: Kulturen aus Blut und Organen lassen hier wie dort eine fortschreitende Abnahme der Keime erkennen, die so weit geht, daß zuletzt nur noch relativ ganz wenige lebensfähige übrig bleiben (Wyssokowitch). Von diesem Augenblick an aber ändert sich das Bild und es treten manifeste Unterschiede auf. Die Echtparasiten fangen nun an sich rapid zu vermehren; die Saprophyten dagegen tun dies nicht nur nicht, sondern verschwinden sehr bald gänzlich.

Nach Bail beruht, wie schon oben erwähnt, dieser Unterschied zwischen Saprophyten und Parasiten in der Fähigkeit der letzteren spezifische Aggressine zu sezernieren, sobald sie mit lebendem Gewebe in Berührung kommen. Falls diese Anschauung richtig ist, sagt Bail, dann muß es möglich sein, diese Aggressine in konkreter Form zu gewinnen, wenn man sie dort sucht, wo der Eröffnungskampf zwischen Bakterien und Körperzellen resp. -Säften gekämpft wird. Das dem in der Tat so sein soll, hat Bail selbst an Typhus- und Cholerabakterien gezeigt. Er injiziert Meerschweinchen mehrfach tödliche Dosen von Typhus- resp. Cholerakulturen intraperitoneal und sammelt das entstandene Exsudat unmittelbar post mortem. Durch Zentrifugieren werden die zellulären Elemente und der größte Teil der Bakterien niedergeschlagen und die dann relativ keimarme Flüssigkeit durch Zusetzen chemischer Anti-

septicis vollends sterilisiert. Es läßt sich danach in ihr eine Substanz mit folgenden Haupteigenschaften nachweisen:

1. Injiziert man sie gleichzeitig mit einer untertödlichen Dosis des betreffenden pathogenen Spaltpilzes, die an sich zu schwach wäre um greifbare Erscheinungen zu machen, dann geht das Tier an der akuten Infektion trotzdem zugrunde. Unter dem Einfluß resp. bei der Mitwirkung des Aggressins wird also eine an sich unwirksame Infektion zur tödlichen.

2. Die gleichzeitige Injektion von Aggressin und einer einfachen oder mehrfach letalen Dosis pathogener Keime bedingt schwerere Infektionserscheinungen, als die gleiche Dosis ohne Aggressine. So ist z. B. die Peritonitis nach Cholera- und Typhusinjektion beim Meerschweinchen ganz besonders heftig, wenn Aggressine mit einverleibt wurden: das Exsudat ist dann überaus zellarm und enthält dafür eine geradezu enorme Menge des betreffenden Virus.

3. Werden zu gleicher Zeit Typhus- (resp. Cholera-) Keime, genügende Mengen eines entsprechenden bakteriolytischen Serums und bestimmte Mengen Aggressin injiziert, so bleibt die schützende Wirkung des bakteriolytischen Serums, die sich bei Kontrolltieren ohne weiteres manifestiert, hier aus. Das Serum verliert also gewissermaßen unter dem Einfluß des Aggressins seine präventive Kraft.

4. Mehrfach wiederholte Injektion steriler Aggressine ruft bei einem für die korrespondierende Bakterienart empfänglichen Tiere (aktive) Immunität hervor. Im Blutserum des Tieres treten dabei Antiaggressine auf, die deutlich präventive Eigenschaften haben.

Die unter 1. und 2. genannten Punkte lassen verstehen, warum Bakterien, die Aggressine zu erzeugen vermögen, unter allen Umständen im Tierkörper sich stark vermehren und seine Abwehrmaßregeln unwirksam machen.

Die Art und Weise nun, wie dies erreicht wird, ist nach der Annahme Bails folgende:

Sehr eingehende Untersuchungen an Meerschweinchen und Kaninchen über den Mechanismus der erworbenen Immunität gegen Typhus und namentlich gegen Cholera haben Bail zu der Ansicht geführt, daß die herrschende Theorie von der überwiegenden Bedeutung der bakteriziden Körpersäfte für die Immunität nicht den Tatsachen entspricht. Für Typhusbazillen z. B. existiert durchaus kein Parallelismus zwischen dem bakteriziden Titer des Immunserums und der Extensität der Zerstörung, welcher in die Blutbahn injizierte Typhusbazillen beim passiv immunisierten Kaninchen anheimfallen. Andererseits haben Versuche von Bail über das Pfeiffersche Phänomen (körniger Zerfall und finale Auflösung von Cholera- oder Typhusbazillen im Peritoneum mit Immunserum vorbehandelter Meerschweinchen) gezeigt, daß — in Übereinstimmung mit der schon früher ausgesprochenen Annahme Metschnikoffs — die bakteriolytische extrazelluläre Auflösung so injizierter Spaltpilze keine conditio sine qua non der Resistenz der Versuchstiere gegen Typhus und Cholera ist, sondern daß bei entsprechender, auf Vermeidung der Phagolyse (Metschnikoff) hinzielender Versuchsanordnung, trotz völligen Ausbleibens des Pfeifferschen Phänomens die Versuchstiere dennoch nicht erkranken.

Aus diesen Befunden, die mit den Erfahrungen der Metschnikoffschen Schule völlig im Einklang stehen, schließt Bail, daß das wirksame

Mittel, dessen sich der Organismus im Kampf gegen seine mikrobiotischen Feinde bedient, nicht die Bakterizidie, sondern die Phagocytose ist.

Davon kann man sich leicht überzeugen, indem man vor der Injektion der Bakterienkultur (Cholera) eine reichlichere Ansammlung von Leukocyten in der Peritonealhöhle provoziert. Dann finden nämlich Zerfall, Körnchenbildung und Auflösung extracellulär überhaupt nicht statt; dafür aber eine überaus lebhafte Phagocytose der injizierten Vibrionen durch multinukleare Leukocyten.

Daraus ergibt sich der Schluß, daß der Angriffspunkt der Aggressine in einer Beeinflussung, richtiger gesagt einer Verhinderung, der Phagocytose zu suchen sein muß. Bail hat dies auch experimentell bestätigt: injiziert man bestimmte gleiche Mengen einer Kultur zwei immunisierten Tieren, von denen das eine außerdem Aggressine bekommt, so treten bei dem nicht vorbehandelten die ersten größeren Leukocytenmengen im peritonealen Exsudat schon nach 1—2 Stunden auf und erreichen mit 4 Stunden ganz beträchtliche Dimensionen; während beim Aggressintier diese Leukocytose entweder gänzlich fehlt oder doch auf ein Minimum reduziert ist; das Exsudat ist im ersteren Falle dick, zähflüssig, milchig, im anderen hell, klar, gelblich und enthält nur ganz wenig Formbestandteile.

Danach erscheint die Wirkungsweise der Aggressine als Hemmungskörper gegen die Phagocytentätigkeit ohne weiteres verständlich.

Auf den ersten Blick allerdings lediglich für Bakterienarten, die der Bakteriolyse gar nicht oder nur in unbedeutendem Maße unterliegen. Weniger plausibel ist sie schon bei solchen, die, wenn auch nicht sehr stark, bakteriolysiert werden können (Typhus). Und endlich versagt sie anscheinend ganz für den Fall der Cholerainfektion, wo im Anschluß an die Phagolyse, sehr bald post injectionem, extracellulär deutlichste Umwandlung der Vibrionen in Körnchen und Auflösung der letzteren erfolgt. Denn für den letzteren Fall ist es absolut nicht einzusehen, wie die Aggressine dadurch gefährlich werden und den Tod des Tieres herbeiführen sollten, daß sie das Auftreten und Einwirken von Leukocyten verhindern: kämen letztere wirklich bis auf den Kampfplatz, so würden sie ja ohnehin nur ganz aufgelöste oder in Körnchen zerfallene Bakterien vorfinden und also gar keine Arbeit mehr leisten können.

Letzteres tun die Leukocyten nun nach Bail trotzdem und zwar so, daß sie die Neutralisierung und Resorption der durch das Pfeiffersche Phänomen freigewordenen Bakterienendotoxine besorgen. Werden sie hieran durch anwesende Aggressine*) gehindert, so erliegt der Organismus schließlich einer Intoxikation durch die genannten Endotoxine, was direkt noch dadurch bewiesen wird, daß das Peritonealexsudat solcher Versuchstiere steril ist.

Dies ist in kurzen Zügen das Wesentliche der Aggressinhypothese. Wie schon eingangs bemerkt, wird sie durchaus nicht von allen Bakteriologen, die sich mit der Frage näher befaßt haben, akzeptiert. Die verschiedenen gegen die Lehre Bails erhobenen Einwände sollen nun im folgenden wiedergegeben und einer kurzen Betrachtung unterzogen werden.

*) Die Aggressine sind nicht als negativ chemo-(leuko-)taktische Substanzen aufzufassen. Injektion in die Bauchhöhle ohne gleichzeitige Anwesenheit von Bakterien ruft im Gegenteil Leukocytose hervor. Nur in der Kombination mit bakteriellen Elementen verhindern sie die Diapedese der weißen Blutzellen (Bail.)

Ist das Aggressin eine besondere, vor den Untersuchungen BAILS unbekannt gewesene Substanz; wird sie durch die Lebensäußerungen pathogener Bakterien ausschließlich im lebenden Organismus gebildet? Diese Kardinalfrage haben WASSERMANN und CITRON [35]) und CITRON [14]) sich vorgelegt und nach eingehenden Untersuchungen folgendermaßen beantwortet:

Mit Typhus, Schweineseuche und Schweinepest lassen sich Substanzen, die den Aggressinen BAILS entsprechen, nicht nur in vivo, sondern, wenngleich in geringerer Menge, auch in vitro erzeugen. a) Das Filtrat von Schweinerotlaufkulturen in Kaninchenpleuraexsudat oder Kaninchenserum ruft in gleichzeitiger Injektion mit untertödlichen Dosen des genannten Bakteriums tödliche Sepsis hervor. b) Es genügt eine Kultur von Schweineseuche mit destilliertem Wasser zu schütteln, um ein, gewissermaßen künstliches, Aggressinpräparat zu erhalten, das alle Eigenschaften der „echten" Agressine besitzt, auch die immunisierende Komponente. So gelang es CITRON, nachdem er festgestellt hatte, daß die Injektion von nach BAIL hergestellten Schweineseucheagressinen Kaninchen gegen die 1 000—10 000fache tödliche Dosis zu immunisieren vermag, dasselbe Resultat für Schweineseuche und Hogcholera mit seinen Bakterienextrakten (Ausschüttelungen mit Aqua destill.) zu erzielen. CITRON bemerkt weiter, daß das Immunserum so behandelter Tiere ganz die gleichen präventiven Eigenschaften*) besitzt, wie das mit BAILschen Agressinen behandelter Kontrolltiere. Zieht man weiter noch analoge Befunde von LEVY und FORNET [31]) in Betracht, die sie an Paratyphus B erheben konnten, so gelangt man zu dem Schluß, **daß sich zwischen den in vivo erzeugten Aggressinen und den aus Kulturen auf toten Nährböden hergestellten Bakterienextrakten kein wesentlicher Unterschied feststellen läßt.**

Diese letztere Schlußfolgerung lassen BAIL [3, 4]) und WEIL [9, 10]) nicht gelten. In ihren Erwiderungen auf die oben wiedergegebenen Einwände von WASSERMANN und CITRON einerseits, PFEIFFER und FRIEDBERGER andererseits, versuchen sie gewisse Unterschiede zwischen den natürchen Aggressinen und jenen Bakterienextrakten**) aufzudecken. Sie bemerken beispielsweise, daß es zwar leicht gelinge, aus Kulturen von Halbparasiten (Cholera, Typhus, Schweineseuche) in vitro Bakterienextrakte zu gewinnen, die agressive und gleichzeitig immunisatorische Qualitäten besitzen, daß dies aber unmöglich sei mit Kulturen der Echtparasiten (Milzbrand, Hühnercholera), die doch andererseits in vivo gerade sehr starke Aggressinbildner sind (Oedemflüssigkeit mit Milzbrand infizierter Kaninchen). Weiter verhindern die künstlich hergestellten Extrakte in gleichzeitiger Injektion mit Vibrionen und bakteriolytischem Serum das PFEIFFERsche Phänomen, während die echten Aggressine dies — ebensowenig, wie in vitro — tun. Endlich, sagen BAIL und WEIL, würde die Anwesenheit von Aggressinkörpern in Kulturen auf toten Nährböden nichts gegen die Aggressintheorie als solche beweisen können, denn es ist nicht abzusehen, weshalb — mit entsprechenden quantitativen Unterschieden — gewisse Lebensäußerungen der Spaltpilze im lebenden tierischen Körper nicht unter günstigen Umständen auch im Reagenzglase zustande kommen können sollten.

---

*) Für Mäuse.

**) PFEIFFER und FRIEDBERGER arbeiteten mit Bakterienextrakten, die durch Einwirkung von normalem Serum auf Bakterienkulturen hergestellt waren.

Letztere Bemerkung ist zweifellos richtig. Nur ist nicht recht ersichtlich, was dann an den von Bail entdeckten Substanzen prinzipiell neues sein soll. War doch seit längerer Zeit bekannt, daß Kulturfiltrate mancher Bakterienarten infektionsbegünstigend zu wirken vermögen (substances favorisantes von Bouchard), ebenso wie es feststand, daß solche Filtrate zu Immunisierungszwecken sich mit Vorteil verwenden lassen. Das Verdienst von Bail wäre demnach darin zu sehen, daß er diese aus Kulturen bekannten Bakterienleibsubstanzen auch im infizierten Tierkörper entdeckt und mit mehr Nachdruck als seine Vorgänger auf die Beziehungen dieser Substanzen zum Mechanismus der Infektion hingewiesen hat. Das ist auch der Schluß zu dem einer der eifrigsten Gegner Bails, Doerr kommt [18, 19, 20, 21, 22]).

Doerr hat sich der Präzipitinreaktion (Kraus) bedient, um lösliche Bakterienprodukte in den Aggressinexsudaten Bails nachzuweisen. Eine Mischung von 0,1 ccm Typhusimmunserum (vom Pferde) mit verschiedenen Mengen von Typhusaggressin erzeugte stets einen dichten Niederschlag. Dies beweist einwandsfrei, daß in solchen Exsudaten lösliche Bakterienbestandteile vorhanden sein müssen, deren Herkunft sich einfach aus dem Zerfall einer gewissen Anzahl von Typhusbakterien im Verlauf der Infektionsperitonitis ergibt. Doerr gelangt so zu der Ansicht, daß die infektionsbefördernde Wirkung der Aggressine höchstwahrscheinlich auf eine toxische Wirkung der Bakterienstoffe zurückzuführen ist, die den infizierten Organismus primär schwächt und somit die Vermehrung und Verbreitung des Virus die Wege ebnet, resp. unterwirksame Dosen wirksam macht. Gestützt wird diese Annahme sehr wesentlich dadurch, daß nicht nur Aggressinexsudate, sondern auch abgetötete Bakterienkulturen, ebenso wie die Bakterientoxine (Diphtherietoxin, Choleragift usw.) in Kombination mit untertödlichen Kulturen letale Infektionen hervorrufen können. Schließlich sind, nach Doerr, die Bailschen Aggressine durchaus nicht spezifisch mit bezug auf die einzelnen Bakterienarten. So können subletale Dosen von Bac. typhi durch Wirkung von Choleraaggressin zu letalen werden; ebenso wie Bac. dysenteriae durch Staphylokokkenaggressin, Staphylokokken durch Dysenterieaggressin und Typhus durch Coliaggressin in dem bewußten Sinne „aktiviert“ werden*).

Der Hauptbeweis aber dafür, daß die Wirkung der Aggressine auf ihrer Toxizität beruht, ist die Tatsache, daß peritoneale Injektion genügend großer Mengen von aggressinhaltigem Exsudat bei Meerschweinchen nach einigen Tagen unter Abmagerung und allgemeinem Marasmus zum Tode führt (Dysenterie-, Cholera- und Staphylokokkenaggressin).

Was nach Doerr weiterhin den Wert der Untersuchungen Bails und seiner Mitarbeiter sehr beeinträchtigt, ist der Umstand, daß es nur sehr schwer möglich ist, für die sogenannten Halbparasiten die Dosis letalis minima (bei intraperit. Injektion am Meerschweinchen) festzustellen und stets auch wirklich unterletale Dosen anzuwenden. Auch sorgfältige Beachtung des Gewichtes der Tiere, Anwendung gleich alter Kulturen desselben Stammes schließen störende Einflüsse individueller (und sonst zufälliger) Faktoren so wenig aus, daß die etwaige größere Inten-

---

*) Dieser Mangel der Spezifität zeigt, wie verfehlt die Untersuchungen sind, die die Aufdeckung verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen diversen Bakterienarten auf Grund gleichsinniger Beeinflussung durch dasselbe Aggressin bezwecken (z. B. zwischen Typhus und Coli). Siehe hierzu die Arbeit von Salus [33]) und ihre Kritik von Doerr [22]).

sität des Infektionsprozesses bei den mit Aggressin behandelten Tieren nur mit äußerster Vorsicht zu verwenden ist.

Was die Antiaggressinimmunität Bails anlangt, so gehört sie, wenigstens für Typhus und Cholera, in das Bereich der Immunisierung mit Bakterienextrakten und abgetöteten Kulturen. Das Ausbleiben der Schutzwirkung von Immuniseris, die gleichzeitig mit Aggressinen und virulentem Bakterienmaterial injiziert werden, beruht nach der Ansicht Dörrs darauf, daß die in dem injizierten Aggressinpräparat gelöst enthaltenen Bakterienstoffe einen großen Teil des mitinjizierten Ambozeptors, sowie des vorhandenen Komplements in Beschlag nehmen und so die Bakteriolyse verhindern. Tatsächlich läßt sich der Versuch der Komplementablenkung von Bordet und Gengou (Absorption des hämolytischen Komplements) sehr leicht ausführen, wenn man Bailsches Aggressin, Choleraambozeptor, Choleravibrionen und Kaninchenkomplement in vitro zusammenbringt und fortlaufend beobachtet.

Diese Einwände, zu denen event. noch die v. Pirquets und Schicks [32]) hinzuzurechnen wären, welche Autoren die Aggressine für Produkte des infizierten Organismus halten, zeigen in genügender Weise, daß die Aggressintheorie von Bail keinen Anspruch auf absolut sichere Begründung machen kann. **Zur Zeit berechtigt nichts, in den Aggressinen spezifische, von bereits früher bekannten Substanzen zu differenzierende und mit völlig neuen Eigenschaften ausgestattete Körper zu sehen.** Im Gegenteil scheint alles darauf hinzuweisen, daß sich hinter ihnen Bakterienbestandteile verbergen, die zum geringsten Teil auf sekretorischem Wege, zum allergrößten durch Absterben und Zerfall von Bakterienleibern frei werden; letzteres besonders reichlich im Peritoneum infizierter Tiere. Denn die den Verlauf der Infektion aggravierende Wirkung verdanken sie zum meisten ihrer Toxizität. Für Bac. typhi z. B. ist dies durch Untersuchungen von F. Lange aus dem Metschnikoffschen Laboratorium sicher festgestellt [30a]). Lange injizierte Meerschweinchen größere Mengen virulenter Typhusbouillonkultur intraperitoneal, punktierte das Exsudat, ehe Zerfall der ersten Bakterien auftrat (2—4 Stunden). Die durch Porzellankerzen filtrierte Flüssigkeit erwies sich schon in Dosen von $1^1/_2$—2 ccm (subkutan) als stark toxisch für Meerschweinchen von 250—300 g Gewicht.

Wohlbemerkt ist bei Beurteilung der Aggressinwirkung in vivo ihre unzweifelhafte hemmende Wirkung auf die Phagocytose mit in Betracht zu ziehen [Bail [1, 5]), Kikuchi [26])*), Levy und Fornet], eine Wirkung, die aber in letzter Linie auf eben dieselben toxischen Eigenschaften solcher Peritonealexsudate zurückzuführen sein dürfte.

Technik.

Methoden der Erzeugung von „Aggressinexsudaten".

1. in vivo:

a) Typhus- und Choleraagressin. Meerschweinchen von mittlerem Gewicht (350—400 g) werden mit mehrfach tödlichen Dosen eines

*) Kikuchi hat festgestellt, daß Dysenterieaggressin, welches vorher mit Leukocyten in Kontakt gewesen ist, später die Infektion mit Bac. dysenteriae nicht mehr begünstigt, seine Eigenschaften also einbüßt. Diese Beobachtung ist von Bail [6]) bestätigt worden.

Typhus- oder Cholerastammes intraperitoneal infiziert. Als Virus dient eine Aufschwemmung von 24stündigen Agarkulturen in 0,8 % Kochsalzlösung. Unmittelbar post exitum wird das entstandene Exsudat mit Hilfe einer Kugelpipette steril entnommen. Es sieht gewöhnlich gelblich, mitunter etwas sanguinolent aus, ist sehr zellarm und enthält wechselnde Menge lebender virulenter Bakterien. Durch intensives Centrifugieren (Bail empfiehlt zu dessen Beschleunigung Zusatz sterilen Asbestpulvers) werden vor allem etwaige zelluläre Elemente, sowie auch der größte Teil der vorhandenen Bakterien niedergeschlagen. Die in der klaren Schicht der zentrifugierten Flüssigkeit jetzt noch übriggebliebenen werden durch Zusatz von etwas Chloroform, Toluol oder $^1/_4$ % Phenol abgetötet. Zu diesem Zweck bleibt das Gemisch über Nacht im Eisschrank stehen. Am nächsten Tage verjagt man das Chloroform resp. das Toluol im Vakuum und kontrolliert die Sterilität des Präparats durch Anlegen von Bouillonkulturen. Geht nichts auf, so ist das Aggressin (richtiger die nun leicht gelbe, zähflüssige, sehr eiweißreiche Flüssigkeit, in der das Aggressin enthalten ist) gebrauchsfertig. Erwärmung auf 60° zerstört die aggressiven Eigenschaften dieser Substanz: Cholera- und Typhusaggressine sind also thermolabil (Bail).

b) Coliaggressin (Salus [34]). Meerschweinchen von 250—300 g Gewicht erhalten intraperitoneal 4—5 tödliche Dosen einer virulenten Colikultur. (Die D. l. m. für 200 g Meerschweinchen beträgt bei Salus $^1/_{25}$ Öse.) Die Gewinnung des Exsudats geschieht in der gleichen Weise, wie oben angegeben. Sterilisiert wird mit Toluol. Der Kontakt soll nach den Erfahrungen von Salus möglichst lange ausgedehnt werden (24—50 Stunden). Erst dann kann man der Sterilität des Präparates sicher sein.

c) Dysenterieaggressin (Kikuchi [27, 28, 29]). Man injiziert Meerschweinchen intraperitoneal mehrere Agarkulturen des Bac. Shiga-Kruse (oder statt dessen eine Bouillonkultur desselben Bakteriums). Das post mortem (12 Stunden und mehr) in der beschriebenen Weise gewonnene meist recht getrübte Exsudat wird 4 Stunden zentrifugiert, danach die klare Schicht dekantiert, mit Toluol versetzt und 4 Stunden auf Eis gestellt. Dann ist, nach Kikuchi, die Keimfreiheit erreicht. Man verdampft das Toluol, indem man das Exsudat in sterile Petrischalen ausgießt. Die schließlich resultierende klare, etwas gelbliche Flüssigkeit ist sehr reich an Dysenterieaggressin.

d) Hühnercholeraaggressin (Weil [36]). Man verwendet mit Vorteil Kulturen eines durch Kaninchenpassagen möglichst hochvirulent gemachten Stammes. Mehrfach tödliche Dosen einer Bouillonkultur (bei 24stündigen Kulturen virulenter Stämme enthält schon 1 Tropfen mehrere D. l. m.) werden mit etwas isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und in die Pleurahöhle von Kaninchen injiziert. Nach dem Eingehen der Tiere, das in Weils Versuchen nach 5—8 Stunden erfolgte, wird das zähe, zellarme und bakterienreiche Exsudat steril entnommen, durch Fließpapier filtriert und das Filtrat zentrifugiert. Das klare Zentrifugat wird mit Phenol im Verhältnis von 0,5 % versetzt und durch 3 Stunden auf 44° gehalten. Diese Temperatur darf keineswegs überschritten werden, da das Hühnercholeraaggressin sehr empfindlich gegen höhere Temperaturen ist. Durch Verimpfen größerer Mengen auf Bouillon wird die Sterilität der Präparate kontrolliert. Die eigentlichen Versuche mit dem so erhaltenen Aggressin werden nicht an dem überaus empfänglichen Kaninchen, sondern an Meerschweinchen angestellt, bei denen sich die Größe der

untertödlichen Dosis einer bestimmten Kultur viel bequemer und sicherer bestimmen läßt.

e) Staphylokokkenaggressin [Hoke[23]), Bail und Weil[11, 12, 13])]. Dieses Aggressin erhält man durch intrapleurale Behandlung von Kaninchen mit großen Dosen Agarkultur von Staphylococcus aureus, dessen Virulenz vorher durch Tierpassagen möglichst gesteigert worden ist. Das Exsudat enthält hämolysierte Erythrocyten (Wirkung des Staphylolysins), degenerierte Leukocyten (Wirkung des Leukocidins) und massenhaft Kokken. Es genügt nach Bail und Weil, dieses Exsudat kräftig zu zentrifugieren, um es fast mit Sicherheit keimfrei zu machen. Der Zusatz chemischer Antisepsis ist also hier nicht so indiziert, wie bei Bereitung etwa des Typhus- oder Choleraaggressins.

Die Versuche werden an ganz jungen Kaninchen (500—700 g) angestellt. Man injiziert intrapleural eine untertödliche Dosis Staphylococcus aureus und einige Kubikzentimeter des Aggressins. Die so behandelten Tiere gehen rapide zugrunde, während die nur mit der Kultur gespritzten Kontrolltiere leben bleiben.

Bail und Weil haben festgestellt, daß bei den ersteren, also den Aggressintieren, das Pleuraexsudat post mortem steril ist. Sie schließen daraus, daß das Staphylokokkenaggressin im Gegensatz zum Typhus- und Choleraaggressin die tödliche Erkrankung nicht dadurch herbeiführt, daß es die Vermehrung der injizierten Kokken begünstigt (s. den theoretischen Teil), sondern dadurch, daß unter seinem Einfluß die Staphylokokken einer rapiden Bakteriolyse verfallen, bei der Endotoxine frei werden, welche die letale Intoxikation auslösen.

Dieser Anschauung würde man sich nur dann anschließen können, wenn andererseits einwandfrei bewiesen würde, daß das Staphylokokkenaggressin nicht als solches giftig sei. Denn sonst würde es sich offenbar um eine einfache Superposition einer Aggressinintoxikation und einer an sich leichten Staphylokokkensepsis handeln. Während Bail und Weil in ihrer ersten Veröffentlichung die Giftigkeit des Aggressins leugnen, haben sie in einer späteren Arbeit zugeben müssen, daß das Staphylokokkenaggressin sogar recht starke toxische Wirkung hat: 0,5 ccm genügen, um in intrapleuraler Injektion Kaninchen in ganz kurzer Zeit zu töten. Ebenso sind auch Mäuse gegen dieses Aggressin sehr empfindlich.

Erinnert man sich andererseits, daß nach Kikuchi das Dysenterieaggressin ziemlich giftig für Kaninchen ist, daß ferner die anderen Aggressine beim Meerschweinchen unter Umständen recht toxisch wirken (Doerr), so erscheint der von uns in Übereinstimmung mit letztgenanntem Autor oben gezogene Schluß, daß die Wirkung der Aggressine in der Hauptsache auf ihrer Giftigkeit an sich beruht, um so berechtigter.

Es sei noch kurz daran erinnert, daß nach Bail und Weil[11, 12, 13]) die Anwesenheit größerer Leukocytenmengen die Wirkung des Staphylokokkenaggressins verhindert. In Übereinstimmung mit den Anschauungen Metschnikoffs, haben Bail und Weil gefunden, daß, wenn man das Aggressin in eine durch vorangegangene Aleuronatinjektion sehr leukocytenreich gemachte Kaninchenpleura einspritzt, die Tiere nicht sterben.

f) Subtilisaggressin (Weil[38]). Mittelst dieses Aggressins ist es Weil gelungen nachzuweisen, daß es möglich ist, durch Saprophyten heftige Infektionen zu erzeugen, wenn gleichzeitig mit den betreffenden Mikroben durch sie an anderen Tieren erzeugte Exsudate injiziert werden.

Er stellt das Subtilisaggressin dar durch intraperitoneale Behandlung von Mäusen mit großen Mengen von Heubazillen. Das Exsudat wird durch Zentrifugieren sterilisiert; die weiteren Versuche werden an Mäusen und Meerschweinchen angestellt*).

2. „Künstliche Aggressine“ (Bakterienextrakte).

Zur Herstellung der im ersten Kapitel genannten „künstlichen Aggressine“ oder Bakterienextrakte empfehlen Wassermann und Citron[35]), insbesondere für Bac. typhi, Schweineseuche und Schweinepest folgendes Verfahren:

Durch Injektion von Aleuronat erzeugt man bei Kaninchen ein reichliches Pleuraexsudat, das punktiert und steril aufgefangen, dann sorgfältig zentrifugiert, auf seine Sterilität genau geprüft und schließlich in geeignete Kulturgefäße verteilt wird. In jede Fraktion kommen 3 Ösen frische Kultur. Brüten bei 37° durch 24 Stunden, Abzentrifugieren der entwickelten Bakterien. Statt des Pleuraexsudates kann auch steriles Blutserum von Kaninchen verwendet werden. Das so hergestellte Präparat trägt die Bezeichnung „Seröses Aggressin nach Wassermann und Citron.“ Als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Bakterienextrakten können auch gewöhnliche Agarkulturen dienen. Man geht in folgender Weise vor:

Schweinepestaggressin (Citron[15]). Man bereitet eine größere Anzahl möglichst üppiger Agarkulturen, am besten in Rouxschen Flaschen (flache Gefäße, in denen der Agar in flacher Schicht ausgebreitet ist) oder in Brutkolben nach Kolle. Wenn die Bakterienentwicklung ihren Höhepunkt erreicht hat, wird die Oberfläche der Kultur mit etwas Kaninchenserum (für Hühnercholera nimmt man Taubenblutserum) oder mit sterilem destilliertem Wasser benetzt und zwar so, daß auf 12 gewöhnliche Reagenzglaskulturen 5—10 ccm Flüssigkeit kommen. Mittelst eines langen Platindrahtes werden die Kulturen emulsioniert, die Emulsion abpipettiert und in Erlemeyersche Kölbchen gefüllt, die dann, unter Lichtabschluß und bei Zimmertemperatur, für 2 Tage in den Schüttelapparat kommen. Danach mehrstündiges Zentrifugieren und schließliches Sterilisieren der erhaltenen, schon sehr bakterienarmen, Flüssigkeit entweder durch 0,5 % Phenol, mehrtägigen Aufenthalt im Eiskasten oder einfacher und besser mit Chloroform, das man dann durch Erwärmen auf 44° wieder verjagt.

Dasselbe Verfahren kann zur Herstellung von Hühnercholeraaggressin (Citron und Pütz[16]) und Wildseucheaggressin (dieselben) angewendet werden.

Von Paratyphus B haben Levy und Fornet[31]) ein künstliches Aggressin in der Weise hergestellt, daß sie Bouillonkulturen eines sehr virulenten Stammes, dessen D. l. für 200—250 g Meerschweinchen $^1/_8$—$^1/_{10}$ Öse betrug, durch Porzellankerzen filtrierten.

Methodik der Immunisierung mit „Aggressinen (Antiaggressinimmunität)“.

1) Mit natürlichen Aggressinen.

Die ersten Versuche Tiere mit Aggressin zu immunisieren, wurden mit Cholera- und Typhusaggressinen von Bail[1]) angestellt. Er injizierte

*) Über Tuberkuloseaggressin siehe: Bail[7, 8]) und v. Pirquet und Schick[32]); über Pneumokokkenaggressin: Hoke[24]).

Meerschweinchen mehrfach intraperitoneal von einem nach seiner Vorschrift hergestellten Typhusaggressin und prüfte die Resistenz der so behandelten Tiere gegenüber 1 Öse virulenter Typhuskultur in intraperitonealer Injektion. Während die Kontrolltiere nach 12 Stunden unter starker Vermehrung zugrunde gingen, genasen die immunisierten Tiere, wobei sich in der Peritonealflüssigkeit starke Leukocytenansammlung und lebhafte Phagocytose feststellen ließen.

Später hat Bail [5]) gezeigt, daß man mit dem Serum der durch Aggressininjektionen aktiv immunisierter Tiere deren Immunität passiv auf andere nicht behandelte Tiere übertragen und bei letzteren so passive Immunität erzeugen kann. Das Serum von Kaninchen, die intravenös mit Aggressin behandelt wurden, zeigte ebenfalls deutliche Schutzkraft, wobei aber hervorzuheben ist, daß sein bakterizider Titer den eines Normalserums nicht überstieg, daß es sich also bei der Antiaggressinimmunität nicht um eine solche durch Bakterizidie handeln kann (Reagenzglasversuche mit Bac. typhi, Bail).

Kikuchi [28]) immunisiert Kaninchen, Meerschweinchen und Schafe gegen das Shiga-Krusesche Dysenteriestäbchen in der Weise, daß er den Tieren das oben beschriebene Dysenterieaggressin subkutan oder intravenös in größeren Mengen injiziert, wobei allerdings in Anbetracht der großen Giftigkeit der Dysenterieexsudate mit kleinen Dosen (1,0 bis 1,5 ccm) begonnen werden soll. Gegen Ende des Immunisierungsprozesses liefern die behandelten Tiere ein Serum, das seinerseits Meerschweinchen subkutan appliziert, diese letzteren gegen intraperitoneale Infektion mit einer vielfach letalen Dosis schützt; 0,5—1,0 ccm Kaninchen subkutan gegeben, macht die nachfolgende Injektion von 0,1 g Dysenterietoxin wirkungslos. Daraus geht hervor, daß dieses Serum zugleich antitoxisch und antiaggressiv wirkt. Die vielleicht etwas unverständlich erscheinende antitoxische Komponente wird sofort plausibel, wenn man einerseits das konstante Vorkommen von Dysenterietoxin in derartigen Exsudaten berücksichtigt, andererseits sich der Leichtigkeit erinnert, mit der es auf dem gewöhnlichen Immunisierungswege gelingt Dysenterieantitoxin darzustellen (Todd, Rosenthal und namentlich Kraus und Doerr).

Die Immunisierung von Kaninchen gegen Hühnercholera mittelst H.-Ch.-Aggressinen ist zuerst von Weil [36]) durchgeführt worden. Sein Verfahren besteht darin, daß man den Tieren in drei Intervallen je 0,5 1,5 und 3,0 ccm des von Weil hergestellten Aggressins (s. o.) subkutan injiziert. Zu beachten ist strengste Sterilität des Materials wegen der außerordentlich hohen Empfänglichkeit der Kaninchen gegen den Bazillus der Hühnercholera. Nach Beendigung des Verfahrens vertragen diese Tiere $^{1}/_{10}$ Öse virulenter Bouillonkultur von H.-Ch. ohne Beschwerden; höchstens tritt ein leichtes Ödem auf. In der gleichen Weise lassen sich auch Hühner und Tauben gegen dasselbe Virus immunisieren.

Das Serum hyperimmunisierter Kaninchen ist präventiv, sowohl für Kaninchen, wie auch für Mäuse. 0,5 ccm in subkutaner Injektion schützen Kaninchen vor einer Virusdose, der Kontrolltiere innerhalb 20 Stunden erliegen. Bei Tauben ist diese Schutzwirkung weniger ausgesprochen. Natürlich ist als Ausgangsmaterial ein möglichst aggressinreiches Exsudat zu verwenden; Erwärmung über eine gewisse Temperatur hinaus macht die Präparate für Immunisierungszwecke unbrauchbar.

Ebenso kann man, nach Weil [40]), empfängliche Tiere gegen Schweineseuche immunisieren. Nach einer oder mehreren subkutanen Injektionen

mit Aggressin des B. der Schweineseuche werden Meerschweinchen unempfindlich auch gegen hohe Dosen dieses Virus[36, 37]). Die injizierten Bakterien erhalten sich dabei im Innern der Organe vollkommen lebensfähig. Beim Kaninchen genügt eine einzige subkutane Injektion, um eine mehrere Monate anhaltende Immunität zu erzeugen.

Die Immunisierung des Hausschweins gegen Schweineseuche gelang Weil auf folgendem Wege:

Nachdem in der weiter oben beschriebenen Weise das Aggressinexsudat hergestellt ist, wird es einer peinlichen Kontrolle auf seine absolute Sterilität hin unterworfen und zwar nicht durch Anlegen von Kulturen, was für diesen Fall lange nicht sicher genug wäre, sondern durch Probeinjektionen bei sehr empfänglichen Tieren (Kaninchen oder Mäusen). Von dem so geprüften Aggressin spritzt man pro Schwein erst 3,0 ccm unter die Haut; nach 8 Tagen eine weitere Dosis von 6—7 ccm. Dadurch wird eine Immunität erzeugt, die das Tier vor einer Virusdosis ($^1/_2$ Tropfen Bouillonkultur) schützt, welche beim Kontrolltier innerhalb 36 Stunden zum Tode führt.

Statt Kaninchenexsudaten kann ebensogut Ödemflüssigkeit von seuchekranken Schweinen in Anwendung kommen. Nach Weil scheint es sogar, als ob solches Schweineaggressin dem Kaninchenagressin als Antigen vorzuziehen sei*).

2. Immunisierung mit Bakterienextrakten.

Das über Aggressinimmunität soeben Gesagte enthebt uns der Mühe die von Wassermann und Citron[35]), Citron[14, 15]) und Citron und Pütz[16]) realisierte Immunisierung gegen Hühnercholera, Schweineseuche und Schweinepest mittelst Kulturextrakten dieser Bakterien (künstlichen Aggressinen) ausführlich zu behandeln. Die an Kaninchen, Meerschweinchen, Tauben und Mäusen angestellten Versuche haben befriedigende Resultate ergeben, die jedoch in manchen Punkten den mit natürlichem Aggressin erzeugten nachstehen. Die Technik ist, hier wie da, die gleiche: subkutane oder intravenöse Injektion einiger Kubikzentimer eines wirksamen Bakterienextraktes, die, je nach den Umständen, 1—2 mal wiederholt wird.

Zu bemerken ist für die Immunisierung gegen Hog-Cholera, daß Kaninchen, die mehrfach, sei es mit natürlichem, sei es mit künstlichem Aggressin gespritzt worden sind, ein Serum liefern, das subkutan infizierte Meerschweinchen sehr gut schützt, bei Mäusen und intraperitoneal geimpften Meerschweinchen weniger wirksam ist und bei Kaninchen selbst gänzlich versagt. Ebenso erfreuen sich die Immunserum liefernden Kaninchen durchaus nicht konstant und durchweg einer — aktiven — Immunität.

Literatur.

1) Bail, O., Archiv für Hygiene, Bd. LII, pag. 272.
2) Ders., Berliner klin.-therap. Wochenschr. 1905, Nr. 37.
3) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 37.
4) Ders., Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 39 u. 40.
5) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1905, Bd. XVIII, Nr. 17.
6) Ders., Archiv für Hygiene, Bd. LIII, pag. 302.
7) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 30; 1905, Nr. 9.
8) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1905, Bd. XVIII, Nr. 21.

*) Über Aggressinimmunität gegen Pest s. Hueppe und Kikuchi[25]).

9) Bail, O. und Weil, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XL, H. 3, pag. 371.
10) Dies., Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLI, H. 5, pag, 536.
11) Dies., Wiener klin. Wochenschr. 1906, Bd. XIX, Nr. 9.
12) Dies., Wiener klin. Wochenschr. 1906, Bd. XIX, Nr. 14.
13) Dies., Wiener klin. Wochenschr. 1906, Bd. XIX, Nr. 27.
14) Citron, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XL, H. 1, pag. 153.
15) Ders., Zeitschr. für Hygiene 1906, Bd. LIII, pag. 515.
16) Citron und Pütz, Zeitschr. für Hygiene 1907, Bd. LVI, pag. 145.
17) Deutsch, L. und Feistmantel, Die Impfstoffe und Sera. Leipzig 1903, bei G. Thieme.
18) Doerr, Centralbl. für Bakt., Bd. XLI, H. 5.
19) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1905, Bd. XVIII, Nr. 42.
20) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1906, Bd. XIX, Nr. 25.
21) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1906, Bd. XIX, Nr. 34.
22) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1906, Bd. XIX, Nr. 36.
23) Hoke, Zeitschr. für Hygiene 1905.
24) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1905, Bd. XVIII, Nr. 15.
25) Hueppe und Kikuchi, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIX, H. 5, pag. 610.
26) Kikuchi, Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 15.
27) Ders., Archiv für Hygiene, Bd. LII, pag. 378.
28) Ders., Archiv für Hygiene, Bd. LIV, pag. 297.
29) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1905, Bd. XVIII, Nr. 17.
30) Kruse, Zieglers Beitr., Bd. XII.
30a) Lange, C. R. de la Société de Biologie, 1905.
31) Levy und Fornet, Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 26.
32) Pirquet, v. und Schick, Wiener klin. Wochenschr. 1905, Bd. XVIII, pag. 573.
33) Salus, Archiv für Hygiene 1906, Bd. LV.
34) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1905, Bd. XVIII, Nr. 25.
35) Wassermann und Citron, Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 28.
36) Weil, Archiv für Hygiene, Bd. LII, pag. 412.
37) Ders., Archiv für Hygiene, Bd. LIV, pag. 149.
38) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1905, Bd. XVIII, Nr. 25.
39) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1905, Bd. XVIII, Nr. 16.
40) Ders., Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLI, H. 1, pag. 121.

XII.

Antigene tierischen Ursprunges.

Von

Hans Sachs,

in Frankfurt am Main.

Im folgenden Abschnitt sollen solche Stoffe tierischen Ursprungs eine kurze Besprechung finden, welche bei der Einführung in den fremdartigen Organismus zu einer Antikörperbildung irgend welcher Art Anlaß geben, also Antigene sind. Da die Schlangengifte in einem besonderen Aufsatz von berufener Seite in diesem Handbuch abgehandelt werden, sind sie an dieser Stelle nur, soweit ihre hämolytische Wirkung in Betracht kommt, berücksichtigt. Man kann die Antigene tierischen Ursprungs in zwei große Gruppen einteilen, von denen die eine dadurch charakterisiert ist, daß sie solche antikörperauslösenden Agentien umfaßt, die gleichzeitig noch eine deletäre Wirkung auf ein empfindliches Substrat ausüben. Es gehören dazu also alle diejenigen Antigene, denen außer der haptophoren Gruppe noch eine ergophore Funktionsgruppe zukommt, durch welche sie befähigt werden, im Reagensglas oder im Tierkörper charakterisierte sichtbare Wirkungen auszuüben. Diese Klasse umfaßt im wesentlichen das Gebiet der tierischen Toxine. Aber auch die Fermente, deren antigener Charakter wenigstens bei einem Teil ihrer Vertreter erwiesen ist, dürften in diese Klasse einzureihen sein.

Die zweite Gruppe von Antigenen betrifft Substanzen, von denen wir keinerlei Giftwirkung vom Toxin- oder Fermentcharakter kennen. Es sind diejenigen Rezeptorenträger, deren Antikörper als Ambozeptoren, Agglutinine, Präzipitine bekannt sind, also die Zellen und die in den Körpersäften gelösten Eiweißstoffe tierischer Herkunft.

Wir beginnen mit der Besprechung der ersten Gruppe:

I. Tierische Toxine.

Zu den tierischen Toxinen oder Zootoxinen, wie sie auch genannt werden, gehören diejenigen tierischen Gifte, welche, in den fremdartigen tierischen Organismus eingeführt, die Auslösung von Antikörpern bewirken. Neben dieser fundamentalen Eigenschaft, welche den zu untersuchenden Stoff als Antigen charakterisiert, wird also als weiteres Kriterium für den Toxincharakter noch eine ausgesprochene Giftwirkung hinzukommen müssen. Die Beobachtung der letzteren erstreckt sich zunächst

nach allgemein toxikologischen Prinzipien auf den Tierversuch, indem Lösungen, welche das Toxin enthalten, Tieren auf irgend eine Weise, in der Regel durch subkutane, peritoneale oder intravenöse Injektion einverleibt werden. Aber gerade für das Studium der tierischen Toxine hat in letzter Zeit der Reagensglasversuch eine dominierende Rolle gespielt. Die Vorteile, welche diesem Verfahren zukommen, sind bei der Erforschung der tierischen Toxine die gleichen, wie auf dem Gesamtgebiet der Immunitätsforschung, die ja dem Experimente in vitro so reiche Anregung und Förderung zu danken hat. Es liegt auf der Hand, daß man die Ursache und den intimen Mechanismus der Giftwirkung leichter übersehen kann, wenn man das Gift auf die isolierte Zelle einwirken läßt, als wenn man das komplizierte Getriebe des Organismus als Indikator benutzt. Von den verschiedenen Zellarten sind nun diejenigen am geeignetsten, welche die eingetretene Schädigung durch sinnfällige Veränderungen anzeigen. Es kommen also vornehmlich solche in Betracht, welche durch Eigenbewegungen ausgezeichnet sind, wie die Spermatozoen oder Flimmerepithelien. Ganz besonders aber sind es die roten Blutkörperchen, welche durch den Umstand, daß ihre Schädigung sich in der Regel durch den Austritt des Hämoglobins verrät, der angeführten Forderung am besten entsprechen. Es ist daher kein Wunder, daß ein großer Teil der bekannten Wirkungen und Eigenschaften der tierischen Toxine ihre hämolytische Funktion betrifft.

a) Tierische Toxine als hämolytische Gifte.

Bei der Untersuchung tierischer Exkrete oder aus tierischen Organen geronnener Extrakte auf hämolytische Wirkung wird zunächst die Frage zu entscheiden sein, ob das aufgefundene Hämolysin ein echtes Toxin, ein Hämotoxin ist. Bekanntlich ist das Lackfarbenwerden der roten Blutkörperchen, die Hämolyse, ein Vorgang, der durch die verschiedenartigsten Einwirkungen verursacht werden kann. Ich nenne nur mangelhafte Isotomie des Mediums, freie Alkalien, freie Säuren, die Saponinsubstanzen und die unübersehbar große Schar von Stoffen, welche, ohne Toxine zu sein, als hämolytische Gifte wirken. Demgegenüber kann man für die Toxinnatur der als hämolytisch erkannten Stoffe etwa folgende Kriterien aufstellen.

1. Hämotoxine müssen, um als solche charakterisiert zu werden, Antigene sein, d. h. bei der Einführung in den tierischen Organismus die Bildung von Antitoxinen auslösen.

2. Hämotoxine besitzen meist eine außerordentlich starke hämolytische Wirksamkeit, d. h. sie wirken noch in sehr stark verdünnten Lösungen hämolytisch.

3. Hämotoxine weisen in der Regel eine mehr oder weniger ausgesprochene Thermolabilität auf. Sie werden durch relativ geringgradige Wärmeeinwirkungen ihrer hämolytischen Wirksamkeit beraubt, inaktiviert, während die übrigen hämolytischen Stoffe bekannter chemischer Konstitution auch der Siedehitze widerstehen, koktostabil sind.

4. Hämotoxine werden von den empfindlichen Blutzellen in spezifischer Weise gebunden.

Von diesen vier Merkmalen, die überhaupt für die Toxinnatur einer Substanz gelten, besitzt nur das erste eine allgemeine Gültigkeit. In der Tat muß der Nachweis der Antikörperbildung stets gefordert werden, wenn eine Substanz in die Klasse der Toxine eingereiht werden

soll. Jedoch kann es vorkommen, daß dieser Nachweis auf besondere Schwierigkeiten stößt, z. B. dann, wenn etwa ein aufgefundenes Toxin tierischer Herkunft eine allgemeine Verbreitung unter den Vertretern der Tierreihe besitzt, oder auch dann, wenn die Tierart, welche zur Immunisierung benutzt wird, derjenigen, von welcher das Toxin stammt, zu nahe steht. Da auf diese besonderen Verhältnisse gelegentlich der Erwähnung der Fermente einzugehen sein wird, erübrigt es sich hier darauf hinzuweisen, daß unter Umständen der Nachweis der Antikörper von der Wahl der Tierart abhängen kann. Im allgemeinen erscheint es am günstigsten, eine von dem Toxinspender möglichst entfernt stehende Spezies zur Immunisierung zu wählen.

Die drei übrigen Punkte, besonderss 3 und 4, lassen, wenn sie vorhanden sind, die Toxinnatur sehr wahrscheinlich erscheinen, genügen aber nicht zu ihrem Nachweis. Andererseits ist aber die Thermolabilität durchaus nicht immer bei den Toxinen anzutreffen. Ursprünglich war man ja der Ansicht, daß die Toxine allgemein sehr labile Stoffe sind, die durch $^1/_2$—1 stündiges Erhitzen auf 56° zerstört werden. Das hat sich aber nicht immer als zutreffend erwiesen. Gerade bei den tierischen Toxinen ist sehr oft eine höhere Wärmebeständigkeit beobachtet worden, die ihren höchsten Grad bei den Lecithiden erreicht, Stoffen, bei denen nur noch die immunisierende Fähigkeit als einziges, allerdings wesentliches Kriterium für die Toxinnatur vorhanden ist. Die Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit der Giftlösungen und ihrer Beeinflussung durch thermische Einwirkungen erfolgt in der Weise, daß absteigende Mengen der Giftlösung mit einer konstant gehaltenen Blutmenge (1 ccm einer 5% Aufschwemmung von Blut in physiologischer Kochsalzlösung) gemischt werden. Die durch Auffüllen von physiologischer Kochsalzlösung auf gleiches Volumen gebrachten Mischungen werden sodann in den Brutschrank gebracht. Die Technik der die Hämolyse betreffenden Versuche, wird im II. Teile dieses Handbuches bei der Besprechung der Hämolysine des Blutserums ausführlich erörtert werden, es ist hier daher nicht der Ort, länger bei ihr zu verweilen. Bemerkt sei nur, daß auch zur Untersuchung der hämolytisch wirkenden tierischen Toxine stets serumfrei gewaschenes Blut verwendet werden soll, da die Stoffe des Blutserums bereits den hämolytischen Vorgang in erheblicher Weise stören können.

Die Prüfung auf Wärmeeinfluß wird in der Weise vorgenommen, daß Proben der Giftlösung in Reagensgläsern im Wasserbade, das auf die gewünschte Temperatur erhitzt ist, $^1/_2$—1 Stunde lang gehalten werden. Es dürfte sich empfehlen, zunächst das Erwärmen bei 55° und 100° vorzunehmen. Ist die hämolytische Kraft bei 55° noch ganz oder teilweise erhalten geblieben, bei 100° aber zerstört worden, so werden weitere, dazwischen gelegene Temperaturen (etwa 60—65°—70—75° usw.) heranzuziehen sein. Bei den höheren Temperaturen ist es angezeigt, die Giftlösung, wenn möglich, in geeigneter Verdünnung zu verwenden, um der in konzentrierten Lösungen erfolgenden Koagulation der Eiweißkörper vorzubeugen.

Was das vierte Kriterium der Toxinnatur, die spezifische Bindung an die empfindlichen roten Blutkörperchen anlangt, so liegen die Verhältnisse etwas kompliziert. Man hat zwischen zwei Typen der hämolytischen Toxinwirkung zu unterscheiden. Die Hämolyse kann einmal durch einfache Toxine verursacht werden, wie es für die Bakteriohämotoxine der Fall ist. Es kann aber auch die Hämolyse durch die Vermittelung zweier

Substanzen zustande kommen, von denen jede an und für sich unwirksam ist. Dieser Mechanismus ist bei den Hämo- und Cytotoxinen des Blutserums stets anzutreffen (Amboceptoren), kommt aber auch bei einer Reihe von tierischen Toxinen vor. Die Untersuchung der Frage, ob ein Hämotoxin einfacher oder komplexer Konstitution ist, erstreckt sich zunächst auf die Komplettierung der durch Erwärmen oder durch andersartige künstliche oder natürliche Einflüsse inaktiv gewordenen Hämotoxine. Die einwandsfreie Wiederherstellung der Wirksamkeit durch irgendwelche Aktivatoren, die an und für sich natürlich in den entsprechenden Mengen nicht hämolytisch wirken dürfen, ist für die komplexe Konstitution beweisend. Gelingt aber die Aktivierung nicht, so ist man wohl berechtigt, das Toxin zu den einfachen Toxinen zu rechnen, wenn man sich auch darüber klar bleiben muß, daß ein direkter Beweis der einfachen Konstitution nicht erbracht werden kann, da alle Möglichkeiten der Aktivierung kaum ausgeschlossen werden können.

Der Bindungsversuch ist nun bei den Hämotoxinen von komplexer Konstitution dann ohne weiteres auszuführen, wenn die inaktive Giftkomponente bereits an und für sich mit den empfindlichen Zellen reagiert. Man läßt dann eine Lösung der ungiftigen Toxinkomponente eine Zeitlang, in der Regel eine Stunde bei 37°, mit den Blutzellen stehen, zentrifugiert dann ab und prüft den Abguß auf hämolytische Wirksamkeit unter gleichzeitigem Zusatz einer hinreichenden Menge der aktivierenden Substanz. Ein Vergleich mit dem gleichzeitig angestellten Kontrollversuch, der die hämolytische Wirksamkeit der originalen Giftlösung bestimmt, ergibt dann, ob im Abguß eine Einbuße oder ein vollständiger Verlust an hämolytischer Kraft vorhanden ist, d. h. ob das wirksame Prinzip gebunden worden ist. Allein diese Methode hat ihre natürlichen Grenzen und versagt selbstverständlich dann, wenn die inaktive Giftmodifikation mit der Zelle überhaupt nicht reagiert und erst nach ihrer Vereinigung mit dem aktivierenden Agens in Beziehungen zur Zelle treten kann. Daß derartige Verhältnisse in der Tat vorkommen, zeigt das Beispiel der Schlangengifthämolysine. In diesem Falle liegen die Verhältnisse für den Bindungsversuch, da man nur mit dem fertigen hämolytischen Reaktionsprodukt arbeiten kann, nicht anders als bei den einfachen Hämolysinen. Man kann nämlich, wenn es sich um unempfindliche Zellarten handelt, zwar demonstrieren, daß das Hämolysin nicht gebunden wird. Dagegen ist die Bindung durch die empfindlichen Elemente nicht ohne weiteres nachzuweisen. Denn beim Digerieren empfindlicher Blutkörperchen mit dem aktiven Hämolysin tritt ja Hämolyse ein. Setzt man zu solchen lackfarben gewordenen Blutlösungen frisches Blut hinzu, so kann man stets sehen, daß letzteres nicht mehr gelöst wird; das Hämolysin ist also verschwunden. Aber diese Tatsache besagt nur, daß mit der Giftwirkung auch ein Giftverbrauch vergesellschaftet ist, und läßt daher die Frage nach der spezifischen Bindung offen. Man ist dann auf die Verwendung der aus den roten Blutkörperchen dargestellten Stromata zum Bindungsversuch angewiesen. Die Stromata haben nämlich die Eigenschaft, die entsprechenden Toxine usw. spezifisch zu binden, bewahrt, während sie andererseits doch so weit stabilisiertes Zellprotoplasma darstellen, daß von einer toxischen Wirkung schwerlich noch gesprochen werden kann. Was die Darstellung der Stromata anlangt, so muß auf den späteren Abschnitt „Tierische Zellen als Antigene" verwiesen werden. Hier soll nur die Technik des Bindungsversuches beschrieben sein und zwar möge als Paradigma ein von SACHS[71]) analysierter Fall dienen, welcher die Hämo-

lyse durch das aus Kreuzspinnen gewonnene Arachnolysin betrifft. Arachnolysin wirkt auf Kaninchenblut hämolytisch, aber nicht auf Meerschweinchenblut. Das Protokoll des Bindungsversuches ist folgendes:

„Die aus je 40 ccm Kaninchen- und Meerschweinchenblut gewonnenen Stromatasedimente werden mit 10 ccm einer Arachnolysinlösung versetzt, von der 0,025 ccm genügen, um 0,05 ccm Kaninchenblut (1 ccm einer 5% Aufschwemmung) gerade komplett zu lösen. Die derart behandelten Stromata werden unter wiederholtem Umschütteln eine halbe Stunde lang im Wasserbad bei 40° digeriert und darauf abzentrifugiert. Der Abguß von den Stromata des Meerschweinchenblutes löst, wie das Ausgangsmaterial, 0,05 ccm Kaninchenblut noch in einer Menge von 0,025 ccm komplett, der Abguß von den Kaninchenblutstromata dagegen hat seine Giftigkeit vollständig verloren; er vermag selbst in einer Menge von 1,0 ccm Kaninchenblut nicht mehr im geringsten anzugreifen.“

Dieses Versuchsbeispiel zeigt, daß die verschiedene Empfindlichkeit der beiden Blutarten gegenüber dem Arachnolysin auf die differente Bindungsfähigkeit des Zellprotoplasmas zu beziehen ist. Die verschiedene Empfindlichkeit beruht auf dem Vorhandensein resp. Fehlen geeigneter Rezeptoren, wenn man mit Ehrlich unter Rezeptoren diejenigen Organe des Zellprotoplasmas versteht, welche die Giftbindung vermitteln. Technisch ist in Betracht zu ziehen, daß man, um einen möglichst starkea Bindungseffekt zu erzielen, einen Überschuß von Stromata verwenden müssen wird. Die äquivalente Menge Stromata ist diejenige, welche einer Blutmenge entspricht, die von der verwandten Giftmenge gerade vollständig aufgelöst wird. Im vorliegenden Versuche wurde, wie eine einfache Berechnung ergibt, das doppelte der äquivalenten Stromatamenge herangezogen. In anderen Fällen dürfte ein mehrfaches Multiplum am Platze sein. Selbstverständlich ist, daß auch Temperatur und Bindungszeit auf den Bindungseffekt von Einfluß sein kann. Man muß daher danach trachten, diese Faktoren, wenn das Versuchsergebnis den Erwartungen nicht entspricht, durch geeignete Variation günstiger zu gestalten.

Hervorgehoben sei, daß die verschiedene Empfindlichkeit auch bei den toxinartigen Giften nicht immer eine Funktion der Rezeptoren sein muß. Es genügt in dieser Hinsicht, an das Beispiel der Schlangengifthämolysine zu erinnern. Die Untersuchungen von Kyes[29]), sowie Kyes und Sachs[34]) haben gelehrt, daß Blutarten, welche durch Schlangengift nicht gelöst werden, der Hämolyse anheimfallen, wenn Lecithin hinzugefügt wird, daß dagegen solche Blutarten, welche bereits durch Schlangengift allein gelöst werden, das Lecithin bereits in ihrem Protoplasma in einer geeigneten Form beherbergen. Es wäre also in diesem Falle irrig, aus der verschiedenen Empfindlichkeit irgend welche Schlüsse auf das Vorhandensein oder Fehlen von giftbindenden Rezeptoren zu ziehen. Die Ursache der verschiedenen Empfindlichkeit ist vielmehr hier darin gelegen, daß das endozellulär gelegene Lecithin in dem einen Falle das Schlangengift aktiviert, in dem anderen nicht.

Die tierischen Hämotoxine, deren kurze Besprechung nun folgen soll, können in zwei Gruppen eingeteilt werden, für deren Differenzierung die Frage maßgebend ist, ob es sich dem gegenwärtigen Stande der Wissenschaft entsprechend um einfache oder um komplexe, d. h. durch die Synergie zweier Komponenten wirkende Hämotoxine handelt.

I. Einfache Hämotoxine.

Die Zahl der bekannten einfachen Hämotoxine tierischen Ursprungs ist gering, da sich bei einer größeren Reihe tierischer Hämolysine durch die Forschung der letzteren Jahre herausgestellt hat, daß ihre Wirkung eine komplexe ist. Als einfache Hämotoxine kommen heute im wesentlichen in Betracht die Gifte der Kröten und Spinnen.

a) Krötengift (Phrynolysin).

Vom Standpunkt der Immunitätslehre aus ist das Krötengift von Pröscher[68]) untersucht worden. Der wirksame hämolytische Bestandteil wurde „Phrynolysin" genannt. Die Gewinnung und Untersuchung des Phrynolysins gestaltet sich nach Pröscher folgendermaßen:

Darstellung: Die Kröten (Bombinator igneus [Feuerkröte])*) werden mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült und enthäutet. Die Haut wird mit Glaspulver möglichst homogen zerrieben und die nach Zusatz von 2—3 ccm physiologischer Kochsalzlösung erhaltene Emulsion filtriert oder zentrifugiert. Es resultiert eine schwachsaure Flüssigkeit, von grauweißer Farbe und knoblauchartigem Geruch. Die Giftlösung wird durch Toluolzusatz konserviert und im Eisschrank aufbewahrt. Frisch gefangene Kröten liefern ein stärkeres Hämolysin als solche, die längere Zeit in Gefangenschaft gelebt haben.

Eigenschaften: Das Phrynolysin ist sehr labil. Erwärmen auf 56°, Licht, Alkohol, Äther, Chloroform, Mineralsäuren, starke Kalilauge, Pepsin, Trypsin zerstören es rasch. Auch Eintrocknen der Giftlösung im Vakuum schwächt ihre Wirksamkeit. Das Phrynolysin dialysiert nicht. Die Zerstörung des Toxins geht auch in neutralisierten Lösungen in gleicher Weise vor sich.

Hämolytische Wirkung: Das Phrynolysin wirkt in äußerst verdünnten Lösungen hämolytisch, besonders auf Hammelblut. Die verschiedenen Blutarten ordnen sich nach dem absteigenden Grade ihrer Empfindlichkeit in die Reihenfolge: Hammel, Ziege, Kaninchen, Hund, Meerschweinchen, Ratte, Ochs. Vogelblut wird nur sehr schwach gelöst, Frosch- und Krötenblut gar nicht. Untersuchungen über die Ursache der verschiedenen Empfindlichkeit liegen nicht vor. Hier müßten Bindungs- und Aktivierungsversuche einsetzen. Das bei 56° unwirksam gewordene Phrynolysin wird durch Zusatz von Serum der höheren Wirbeltiere nicht aktiviert.

Antiphrynolysin: Normales Serum von Taube, Hammel, Meerschweinchen, Pferd, Kaninchen, Ziege hemmt die hämolytische Wirkung des Phrynolysins nicht. Dagegen gelingt es, durch Immunisierung von Kaninchen ein Antilysin zu gewinnen. Immunisierung von Kaninchen durch subkutane Injektion: steigende Dosen von 0,5 ccm bis 5 ccm nach 8 Tagen, weiter alle 5—6 Tage je 5 ccm, im ganzen 30 bis 35 ccm im Verlaufe von 3 Wochen. Das antilytische Serum schützt in einer Dose von 0,025 ccm 1 ccm 5 % Hammelblutaufschwemmung gegen die Hämolyse durch die doppelte Menge der gerade komplett lösenden Giftdose. Damit ist die Toxinnatur des Phrynolysins erwiesen.

b) Spinnengift (Arachnolysin).

Die Giftwirkungen, welche sich bei dem Studium der aus Spinnen hergestellten Extrakte ergeben haben, betreffen im wesentlichen die Karakurte (Lathrodectes Erebus) und die Kreuzspinne (Epeira diadema).

1. Karakurtengift.

Das Karakurtengift ist eingehend von Kobert[25]) untersucht worden. Zur Prüfung dienten wässerige, resp. Kochsalzextrakte aus ganzen Spinnen oder Teilen derselben. Die Versuche Koberts über die hämolytische Wirkung sind nur mit Extrakten aus neugeborenen Spinnen angestellt. Man kann wohl annehmen, daß auch die Extrakte aus den Leibern erwachsener Spinnen die hämolytische Wirkung besitzen.

---

*) Die Haut der Gartenkröte (Bufo cinereus) liefert nur ein schwach wirksames Hämolysin.

Gewinnung: Die aus den Kokons entnommenen neugeborenen Spinnen werden lebend zerrieben und mit Wasser resp. physiologischer Kochsalzlösung extrahiert. Nach der Filtration resultiert ein klarer Extrakt von hellgelblicher Farbe.

Hämolytische Wirkung: Der Auszug wirkte auf Hundeblut hämolytisch, und zwar noch in einer Verdünnung von 1:127000 der in der Giftlösung enthaltenen organischen Substanz. Die organische Substanz wurde in der Weise bestimmt, daß ein Teil der Giftlösung im Platintiegel eingedunstet, letzterer im Trockenschrank bei 100—105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und geglüht wurde. Die Gewichtsdifferenz vor und nach dem Glühen entspricht der Menge der vorhanden gewesenen organischen Substanz.

Das Karakurtengift wirkt auch in der Weise auf das Blut ein, daß es die Gerinnung beschleunigt. Methodisch wurde dabei in der Weise vorgegangen, daß Proben des frisch dem Pferde entnommenen undefibrinierten Blutes mit und ohne Zusatz von Giftlösung sich selbst überlassen wurden. Unter sonst gleichen Bedingungen trat bei Giftzusatz bereits nach vier Minuten Gerinnen ein, während die Kontrolprobe noch nach 13 Minuten vollständig flüssig war.

Toxinnatur: Weitere Untersuchungen über das Karakurtenhämotoxin liegen nicht vor. Die übrigen Untersuchungen Koberts erstrecken sich auf die Wirkung in vivo. Die Toxinnatur ist nicht erwiesen, aber nach dem analogen Verhalten des in dieser Hinsicht eingehend untersuchten Kreuzspinnengiftes wahrscheinlich.

2. Kreuzspinnengift (Arachnolysin).

Über die hämolytische Wirkung des Kreuzspinnengiftes sagt Kobert[25]): „Ein Versuch, welcher die hämolytische Wirkung prüfen sollte, ergab, daß dieselbe zwar vorhanden, aber weit geringer als beim Karakurtengifte ist“. Beim Kreuzspinnengift spielt aber, wie die Untersuchungen von Sachs gezeigt haben, die Wahl der Blutart eine ausschlaggebende Rolle. Sachs[71]) hat das Hämatoxin der Kreuzspinne nach den Prinzipien der Immunitätslehre eingehend untersucht und das wirksame Prinzip „Arachnolysin“ genannt.

Gewinnung: Lebende Kreuzspinnen werden in toluolhaltiger physiologischer Kochsalzlösung zerrieben*). Auf 1 g Kreuzspinnengewicht werden 4 ccm Flüssigkeit gewählt. Die erhaltene Emulsion bleibt 24 Stunden im Eisschrank stehen, nachdem sie eventuell einige Stunden lang im Schüttelapparat geschüttelt wurde. Am nächsten Tage wird mit dem fünffachen Volumen Kochsalzlösung verdünnt und die nicht gelöste Masse durch Filtrieren (resp. Zentrifugieren) entfernt. Man erhält dann ein bräunlich-gelbes Filtrat, das, bei Zusatz einiger Tropfen Chloroform, jahrelang seine hämolytische Wirksamkeit bewahrt.

Eigenschaften: Das Arachnolysin ist thermolabil. Durch 40 Minuten langes Erwärmen auf 70°—72° wird die hämolytische Wirksamkeit vollständig aufgehoben. Dagegen hat ebenso langes Erhitzen auf 56° gar keinen Einfluß, bei 60° ist nur eine geringfügige Abnahme der Wirkung zu bemerken.

---

*) Die toluolhaltige Lösung wird in der Weise bereitet, daß Kochsalzlösung mit Toluol gründlich durchgeschüttelt wird und dann einige Tage stehen bleibt. Das Toluol bildet dann die obere Schicht und die unten abgesetzte Flüssigkeit, die noch etwas Toluol gelöst enthält, wird mit einer Pipette entnommen und zur Extraktion benutzt.

Hämolytische Wirkung: Das Arachnolysin wirkt in äußerst geringen Mengen hämolytisch. Die Hämolyse erfolgt rasch und kann bei Zimmertemperatur annähernd ebenso günstig wie bei 37° beobachtet werden. Die verschiedenen Blutarten zeigen aber ein sehr differentes Verhalten, das von hochgradiger Empfindlichkeit bis zu absoluter Resistenz alle Grade aufweisen kann. Die empfindlichsten Blutarten sind Kaninchen- und Rattenblut. Die Empfindlichkeitsskala ist, wenn man die Blutarten nach absteigender Empfindlichkeit ordnet: Kaninchen, Ratte, Maus, Mensch, Ochs, Huhn, Gans. Resistent ist das Blut von Meerschweinchen, Pferd, Hammel, Hund.

Nach den Erfahrungen, die für die später zu besprechenden Schlangenhämolysine vorliegen, muß man daran denken, daß die Resistenz der genannten Blutarten durch einen Lecithinmangel bedingt sein könnte. Methodisch wird in der Weise vorgegangen, daß man die Hämolyse, welche durch Arachnolysin allein nicht vermittelt wird, durch einen kombinierten Zusatz von Arachnolysin und Lecithin herbeizuführen versucht*). Nach meinen Erfahrungen bedingt ein Lecithinzusatz beim Arachnolysin keine Änderung der hämolytischen Wirkung.

Die Ursache der verschiedenen Empfindlichkeit wird durch die Ergebnisse der Bindungsversuche in hinreichender Weise aufgeklärt. Die Methodik und Technik ist bereits oben besprochen. Mit der verschiedenen Empfindlichkeit geht die verschiedene Bindungsfähigkeit der Blutarten parallel, und es ist somit Gelegenheit gegeben, einen Bestandteil der roten Blutkörperchen (den arachnolysinbindenden Rezeptor) nach den Prinzipien der physiologischen und vergleichend physiologischen Forschungsweise zu untersuchen. Die Fragestellungen, die sich ergeben, sind:

1. Besitzen alle Blutarten diesen Rezeptor? Diese Frage ist durch die angeführten Versuchsergebnisse bereits verneint.

2. Ist bei denjenigen Tierarten, deren Blutzellen den Rezeptor besitzen, der letztere stets qualitativ und quantitativ in gleicher Weise anzutreffen, oder bestehen Schwankungen individueller, zeitlicher oder sonstiger Art? Die Versuchsanordnung ist gegeben. Es ist die Empfindlichkeit der Blutkörperchen derselben Tierart unter den gewünschten verschiedenartigen Verhältnissen zu prüfen und bei aufgefundenen Differenzen der Grad des Bindungsvermögens mit dem Grade der Empfindlichkeit zu vergleichen. Was den Einfluß des Lebensalters anlangt, so kann auf die Arbeit von Sachs[72]) verwiesen werden, der darüber bereits Untersuchungen angestellt hat. Das Ergebnis war, daß die Blutkörperchen erst während des Lebens der Tiere allmählich empfindlich werden. Da man weiter schließen kann, daß nicht die vorhandenen Blutkörperchen empfindlich, sondern die unempfindlichen Blutzellen durch empfindliche ersetzt werden, so ergibt sich daraus ein methodischer Hinweis für die Frage der Lebensdauer der roten Blutzellen.

Antiarachnolysin: Normale Sera (Mensch, Kaninchen, Pferd, Schwein, Hund, Ratte, Meerschwein, Ziege, Hammel, Ochse, Gans, Taube) hemmen die Hämolyse durch Arachnolysin nicht. Auch Glykogen (Wendelstadt[79])) wirkt der Hämolyse nicht entgegen. Durch Vorbehandeln von Kaninchen oder Meerschweinchen (subkutan) werden stark antilytisch wirkende Sera erhalten. 0,0025 ccm eines solchen Serums genügen, um

*) Der Gang des Verfahrens wird bei der Besprechung der Schlangenlecithide erörtert werden.

1 ccm 5% Kaninchenblut vor der komplett lösenden Dosis von Arachnolysin völlig zu schützen.

Das Arachnolysin ist durch seine relative Stabilität für Untersuchungen über die Toxin-Antitoxin-Reaktionen besonders geeignet. Zu beachten ist, daß für die Reaktion: Arachnolysin-Antiarachnolysin in ausgesprochener Weise das Danysz-Dungernsche Kriterium gilt (cf. Sachs[74]), d. h. daß bei gleicher Antilysinmenge das Gemisch erheblich stärker hämolytisch wirkt, wenn das Toxin in mehreren zeitlich getrennten Fraktionen zugefügt wird, als bei sofortigem Zusatz der Summe der einzelnen Giftfraktionen. Ferner ist zu berücksichtigen, daß relativ frische (1 Stunde alte) Gemische von Arachnolysin und Antiarachnolysin die scheinbar paradoxe Eigenschaft besitzen, beim Verdünnen stärker hämolytisch zu wirken, trotzdem es sich sogar gleichzeitig auch um geringere absolute Mengen handelt. Nach 24stündigem Lagern der Gemische ist diese Fähigkeit sehr erheblich reduziert, wenn auch nicht ganz geschwunden (cf. Otto und Sachs[65])).

II. Lecithidbildende Hämotoxine.

Den komplex wirkenden Hämolysinen tierischen Ursprungs kommt, da wir von den Hämolysinen des Blutserums an dieser Stelle absehen, eine gemeinsame Art des Wirkungsmechanismus zu, die darin besteht, daß sie erst durch die Vereinigung mit gewissen „aktivierenden“ Stoffen zum wirksamen Hämolysin werden. Der wichtigste und am stärksten wirkende dieser Aktivatoren ist das Lecithin, und da man die Verbindungen des Lecithins als Lecithide bezeichnet, kann man diese Gruppe der Hämotoxine als „Lecithidbildende Hämotoxine oder Lecithide“, Toxolecithide zusammenfassen. Die Entdeckung der Lecithidbildung bei den Hämotoxinen ist den unter Ehrlichs Leitung entstandenen Arbeiten von Preston Kyes[29-34]) zu verdanken, und auf diese ist an erster Stelle bezüglich der einschlägigen Methodik zu verweisen. Die Arbeiten von Kyes, welche den Ausgangspunkt dieser Forschungsrichtung bilden, betreffen die Hämolyse durch Schlangengift, und an diesem Beispiel sollen daher zunächst Technik und Methodik geschildert werden.

a) Schlangengifte.

Die Untersuchungen über die hämolytische Wirkung der Schlangengifte, die durch Stephens und Myers begonnen wurden, sind zum großen Teil mit dem Gifte der indischen Kobra (Brillenschlange, Naja tripudians) angestellt. Auf das Kobragift beziehen sich daher an erster Stelle die weiteren Angaben.

Als erstes Erfordernis für hämolytische Reagensglasversuche mit den Schlangengiften muß die Benutzung serumfrei gewaschener Aufschwemmungen von roten Blutkörperchen bezeichnet werden. Die Notwendigkeit dieses Vorgehens ist zuerst von Flexner und Noguchi[16]) klar erkannt worden und ergibt sich ohne weiteres aus dem Umstande, daß in vielen Serumarten bereits aktivierende Stoffe vorhanden sind, welche die Versuchsbedingungen verwischen. Aber auch bei Verwendung völlig serumfreien Blutes können noch aktivierende Stoffe interferieren, die in den Blutzellen selbst gelegen sind und daher „Endo-Aktivatoren“ bezeichnet werden können. In solchen Fällen kann die Hämolyse bereits durch einen alleinigen Zusatz von Kobragift erfolgen. Die reinsten Versuchsbedingungen wird man demnach nur dann haben, wenn man Blutarten

benutzt, welche durch Kobragift allein nicht gelöst werden. Es sind dies Rinder-, Hammel- und Ziegenblut. Im Gegensatz zu diesen werden die Blutkörperchen von Frosch, Hund, Meerschweinchen, Mensch, Ratte, Schwein, Maus, Gans, Kaninchen, Pferd (nach absteigender Empfindlichkeit geordnet) durch Kobragift allein gelöst. Diese Angaben gelten dann, wenn als Verdünnungsmedium die physiologische (0,85 $^0/_0$) Kochsalzlösung benutzt wird, was ja in der Regel geschieht. In salzfreiem Medium (isotonischer (7,8 $^0/_0$) Rohrzuckerlösung) ändern sich die Bedingungen nach GOEBEL[21, 22]) dahin, daß auch die in Kochsalzlösung unempfindlichen Blutarten durch Kobragift allein gelöst werden. Dr. TERUUCHI[77]) hat auf meine Veranlassung diese Angaben nachgeprüft und sie bestätigen können. Im Gegensatz dazu verhindert nach GENGOU[20]) ein Gehalt an zitronensaurem Natron von 2,1 $^0/_{00}$ die Hämolyse auch der an und für sich empfindlichen Blutarten durch Kobragift; mittlere Dosen von Chlorcalcium beseitigen diese hemmende Wirkung des zitronensauren Natrons.

1. Die Aktivatoren des Schlangengiftes.

Die hämolytische Wirkung kann nun für alle Blutarten bis zu einem quantitativ annähernd gleichen Grade verstärkt, resp. herbeigeführt werden durch Zusatz geeigneter Aktivatoren, unter denen das Lecithin die erste Stelle einnimmt.

Die Auffindung des Lecithins als wesentlichen Aktivator des Schlangengiftes durch KYES[29]) ist für das methodische Vorgehen von großem Interesse, so daß ein kurzer geschichtlicher Rückblick auch an dieser Stelle gerechtfertigt erscheint. FLEXNER und NOGUCHI[16]) hatten zuerst festgestellt, daß das Serum das Kobragift aktiviert. CALMETTE[9]) zeigte dann, daß sich die im Serum vorhandene aktivierende Substanz dadurch von den thermolabilen Komplementen unterscheidet, daß sie auch nach Erhitzen des Serums auf 62 ^{0} in vielen Fällen erhalten bleibt oder sogar dann erst in Erscheinung tritt. KYES[29]) endlich hat den Nachweis geführt, daß alle Sera, gleichgültig ob sie im frischen Zustand aktivierend wirken oder nicht, nach dem Erhitzen auf 65 ^{0} oder 100 ^{0} aktivierende Fähigkeit besitzen. Es war damit erwiesen, daß die wirksamen Stoffe etwas anderes als die bekannten thermolabilen Komplemente des Serums sein müssen. Ihre Koktostabilität steht in Analogie zu dem Verhalten der von KORSCHUN und MORGENROTH[27]) in Verfolg der Beobachtungen TARRASSÉVITCHS beschriebenen hämolytischen Stoffe der Organextrakte. Weiter gelang der Nachweis, daß die aktivierende Substanz alkohol- und ätherlöslich ist. Durch ein systematisches Heranziehen der bekannten alkohol-ätherlöslichen Substanzen des Blutserums (Chlolestearin, Lecithin, Fette, Fettsäuren) wurde das Lecithin als das aktivierende Agens erkannt.

Da nun das Serum in vielen Fällen erst nach dem Erhitzen aktivierend wirkt und auch dann oft nicht so stark wie das Alkoholextrakt, so muß man annehmen, daß im Serum hemmende, lecithinbindende Stoffe (Eiweiß, Cholestearin usw.) vorhanden sind, die in ihrem Hemmungsvermögen je nach der Temperatur, auf welche das Serum erhitzt ist, variieren. Das ist methodisch wichtig. Man muß nämlich, um über das Aktivierungsvermögen der tierischen Säfte Aufschluß zu erhalten, das Lecithin isolieren, was durch Alkoholextraktion leicht gelingt.

Zur Isolierung des Lecithinaktivators verfährt man folgendermaßen: Die zu untersuchende Flüssigkeit (Blutserum usw.) oder Gewebsemulsion (Blut, Organextrakte) wird mit 10 Volumen Alkohol digeriert und zwei Stunden lang im Schüttelapparat geschüttelt und bleibt zweckmäßig bis

zum nächsten Tage bei öfter wiederholtem Umschütteln bei 37° stehen. Am nächsten Tage wird rasch von dem Eiweißniederschlag abfiltriert. Der Niederschlag enthält die hemmenden Stoffe. Das Filtrat wird nun im Vakuum bei ca. 30° abdestilliert*). Der nach dem Verdunsten des Alkohols verbleibende Rückstand wird in so viel physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, daß das Volumen demjenigen des Ausgangsmaterials entspricht. Die entstehende Flüssigkeit ist mehr oder weniger trübe opalescent. Sie dient zu Aktivierungsversuchen. Es ist dabei zu beachten, daß größere Mengen dieser Alkoholrückstandslösungen bereits an und für sich hämolytisch wirken können, entsprechend dem Gehalt an den koktostabilen, alkohollöslichen Stoffen der Gewebselemente (Korschun und Morgenroth[27]) und des Blutserums (Wölfel[80]), Levaditi[45, 46]). Man kann sich vor dem dadurch bedingten Irrtum leicht schützen, wenn man die Alkoholextrakte gleichzeitig mit und ohne Zusatz des Kobragiftes auf die roten Blutkörperchen einwirken läßt. Bei Berücksichtigung dieser Kautelen gelingt es ohne weiteres, den Gehalt an aktivierenden Substanzen bei verschiedenen Tierarten oder bei derselben Tierart unter individuellen Variationen vergleichend zu bestimmen. Da angenommen werden kann, daß die aktivierenden Stoffe im wesentlichen Lecithine sind, so ergibt sich aus dem beschriebenen Vorgehen natürlich auch ein Rückschluß auf den Lecithingehalt der untersuchten Stoffe, also ein einfaches Verfahren für vergleichende Bestimmungen des Lecithinvorrats.

Kann man den Lecithinvorrat auch durch chemische Analyse bestimmen, so ist durch die Heranziehung des Kobragiftes ein Mittel gegeben, um nicht das gesamte Lecithin der Gewebe und Körpersäfte zu ermitteln, sondern nur denjenigen Anteil, welcher in einer freieren, für die aktivierende Wirkung „disponiblen" Form vorhanden ist. Man braucht zu diesem Zwecke die Körperflüssigkeiten der Gewebssäfte nur in nativem Zustande zu untersuchen. In dieser Hinsicht sind Untersuchungen von Sachs[72]) zu nennen, welche zeigten, daß das Serum neugeborener Tiere eine erheblich stärkere aktivierende Wirkung besitzt als das Serum Erwachsener. Schon aus den Angaben von Kyes[29]) über die verschiedene aktivierende Wirkung differenter Serumarten einerseits, über die verschiedene Empfindlichkeit der Blutarten andererseits ergeben sich Hinweise, daß trotz des annähernd gleichen Lecithingehalts in verschiedenen Blutarten die Art der Lecithinspeicherung weitgehend variiert, was natürlich auch von hohem physiologischen Interesse ist. In dieser Hinsicht konnte Sachs[72]) nachweisen, daß das Lecithin in den fötalen Blutkörperchen weit lockerer als in den roten Blutzellen erwachsener Tiere vorhanden ist, was sich aus dem Umstande ergab, daß solche Blutkörperchen (Rind), welche durch Kobragift allein nicht gelöst werden, im fötalen Leben noch eine recht erhebliche Empfindlichkeit auch ohne Zusatz von Lecithin aufweisen.

Im allgemeinen kann man sagen, daß die Empfindlichkeit der Blutkörperchen direkt proportional der Avidität des Giftes zum Lecithin und umgekehrt proportional der Festigkeit der Lecithinspeicherung in der Zelle ist. Man kann daher die Festigkeit der Lecithinspeicherung in verschiedenen Blutarten durch Untersuchung ihrer Empfindlichkeit gegenüber einer Reihe von Schlangengiften, die nach Kyes[30]) alle, ebenso wie das Kobragift durch die Kombination mit dem Lecithin wirken, vergleichend messen (Kyes[32]), cfr. auch Rogers[70])).

---

*) Bezüglich der Technik der Vakuumdestillation sei auf die Lehrbücher der chemischen Untersuchungsmethoden hingewiesen, insbesondere auf: L. Gattermann, Die Praxis des organischen Chemikers. Leipzig (Veit u. Cie.) 1905 (VII. Auflage).

Eine noch nicht ganz geklärte Frage ist es, ob die aktivierende Funktion des Serums stets dem Lecithingehalt des Serums zuzuschreiben ist, oder ob auch eigentliche Komplemente des Kobragiftes vorkommen. Unter Komplementen sind hierbei die bekannten thermolabilen Stoffe des Blutserums zu verstehen, welche die wesentliche Rolle bei der Hämolyse durch Blutserum spielen. Die Differenzierung von Komplement und Lecithinwirkung ist nun nicht immer so einfach. Alle Aktivierungen, welche noch nach Erhitzung des Serums auf höhere Temperaturen vorhanden sind, werden wir ohne weiteres auf Lecithin beziehen müssen. Dagegen gibt es einige Kombinationen, bei denen das Serum bereits durch Erhitzen auf mittlere Temperaturen (56°), die aktivierende Wirkung einbüßt. Hier kann man in der Tat zweifelhaft sein, ob es sich um echte Komplemente oder Lecithin handelt. An sich ist es sehr wohl denkbar, daß Lecithin in dem nativen Serum dispositionsfrei ist und durch Erhitzen auf 56° bereits Verbindungen mit Serumstoffen eingeht, in denen es nicht aktivierungsfähig ist. Wir werden gleich auf ein erwiesenes Analogon zu einem solchen Verhalten noch zu sprechen kommen. Andererseits wird aber auch das Gegenteil beobachtet, indem das Serum in gewissen Fällen nativ unwirksam ist und erst nach dem Erhitzen zum Aktivator wird. Dazu kommt noch, daß ein und dasselbe Serum bei Verwendung verschiedener Blutarten sich verschieden verhalten kann. Da auch individuelle Variationen mehr oder weniger ausgeprägt vorkommen können, so läßt sich kein absolutes Schema für die Wirksamkeit der Sera aufstellen, indes kann folgende tabellarische Übersicht, die der Arbeit von Kyes[29]) entnommen ist, einen ungefähren Anhalt gewähren.

Tabelle 1.

Kombinationen		Aktivierungsfähigkeit des Serums		
Serum	Blutkörperchen	nativ	erhitzt auf	
			56°	65°–100°
Pferd	Rind	+	+	+
* „	Ziege	+	+	+
„	Pferd	+	+	+
Rind	„	+	0	+
„	Rind	0	+	+
Hammel	„	0	+	+
* „	Hammel	0	0	+
Mensch	Rind	0	0	+
* „	Ziege	0	0	+
„	Mensch	+	+	+
Kaninchen	Rind	+	+	+
* „	Ziege	0	0	+
Meerschwein	Rind	+	0	+
* „	Hammel	+	0	+
„	Kaninchen	+	0	0

Bei den mit * bezeichneten Kombinationen tritt nur schwache Hämolyse auf.

Wie aus alledem hervorgeht, kann die Inaktivierung der Sera durch Erhitzen auf 56° bei der Hämolyse durch Schlangengift nicht als Kriterium für die Komplementnatur der wirksamen Stoffe gelten. Immerhin sind für eine Kombination (Rinderblut — Kobragift — Meerschweinchen-

serum) durch KYES und SACHS[34]) eine Reihe von Eigentümlichkeiten im Verhalten des Serums festgestellt worden, die geeignet erscheinen, die aktivierende Substanz des nativen Serums vom Lecithin zu differenzieren und unter die eigentlichen Komplemente einzureihen*). Diese Merkmale, von denen die wichtigsten im folgenden aufgezählt werden, können natürlich zugleich auch als determinierende Kriterien für die Hämolyse durch Kobragift und Lecithin gelten.

1. Die Hämolyse durch Kobragift und Lecithin erfolgt rasch und auch bei niederer Temperatur (0°), während Komplement mit einer gewissen Inkubation und nur bei höherer Temperatur wirkt.

2. Komplementwirkungen werden im Gegensatz zur Aktivierung durch Lecithin durch Papainverdauung aufgehoben. Ebenso verhält sich die Einwirkung von Salzsäure oder Alkalien.

3. Cholestearin hemmt die Aktivierung durch Lecithin*), aber nicht diejenige durch Komplement.

4. Es kann daher durch diesen Faktor und durch andere Lecithin bindende Stoffe des Serums bedingt werden, daß dasselbe Serum, welches in größeren Dosen an und für sich aktivierend wirkt, dank seines Komplementgehalts in geringerer Menge die Aktivierung durch Lecithin verhindert.

Trotz dieser markanten Differenzen, welche zwischen der Aktivierung durch Lecithin und der Serumkomplettierung bei gewissen Modifikationen bestehen, hat sich übrigens KYES[30]) später für die Möglichkeit ausgesprochen, daß es sich in den Fällen augenscheinlicher Komplementwirkung doch um eine Lecithinaktivierung handelt. KYES nimmt nämlich an, daß gewisse Stoffe die Fähigkeit besitzen, eine Lockerung des in den Blutzellen vorhandenen Lecithins zu veranlassen, derart, daß dasselbe nunmehr auf das Kobragift aktivierend einwirken kann. Durch eine derartige Lecithinverschiebung würden also unempfindliche Blutarten eine Modifikation der Lecithinspeicherung erleiden, die sie den an und für sich dem Kobragift gegenüber empfindlichen Blutarten in dieser Hinsicht gleich stellen würde. KYES neigt daher zu der Anschauung, daß gewisse Sera, die eben nachweislich nicht durch ihren Lecithingehalt aktivierend wirken können, auf diese indirekte Weise die hämolytische Funktion des Kobragiftes herbeiführen. In diesem Sinne würde auch der begünstigende Einfluß gewisser indifferenter Substanzen auf die Hämolyse dnrch Kobragift aufgefaßt werden müssen. Man kann in der Tat die geringgradige Aktivierung, welche z. B. von Ölen und Fettsäuren ausgeübt wird, nicht mit der außerordentlichen Stärke der Lecithinaktivierung ohne weiteres in Parallele setzen. Andererseits ist es natürlich schwer, ein absolutes Kriterium

---

*) FLEXNER und NOGUCHI[17]) unterscheiden im Schlangengift isokomplementophile Amboceptoren (durch Schlangenserum aktivierbar) und heterokomplementophile Amboceptoren, die durch andersartige Sera zu komplettieren sind. Beide Ambozeptortypen sollen in der haptophoren Gruppe übereinstimmen. Im Schlangenserum sind nach diesen Autoren nur isokomplementophile Amboceptoren vorhanden.

**) Zur Demonstration der hemmenden Wirkung des Cholestearins wird nach KYES und SACHS[34]) 1 ccm einer heißgesättigten Lösung von Cholestearin in Methylalkohol heiß mit 9 ccm 0,85 % Kochsalzlösung verdünnt, so daß eine homogene Aufschwemmung entsteht. Was die Ursache der Hemmung durch Cholestearin (Bedeutung der freien Hydroxylgruppe) anlangt, die sich ja übrigens auch auf die Wirkung einer Reihe anderer Hämolysine (Saponin, Tetanolysin etc.) erstreckt, so sei auf die Arbeiten von HAUSMANN[24]) und ABDERHALDEN-LE COUNT[6]) verwiesen. — Bezüglich einer weiteren eigenartigen Versuchsanordnung (künstliche Lecithin-Cholestearinmembranen) zur Demonstration der antagonistischen Wirkung von Lecithin und Cholestearin bei der Hämolyse durch Kobragift sei auf die Arbeit von PASCUCCI[66]) verwiesen.

dafür anzugeben, was als direkte Aktivierung oder indirekte Lecithinverschiebung angesehen werden muß. Die schon erwähnten Substanzen, Öle und Fettsäuren, wirken schon an und für sich hämolytisch. Auch Lecithin übt in größeren Dosen eine hämolytische Wirkung aus, die je nach der Reinheit der Präparate variiert. Am besten für diese Zwecke, d. h. am geringsten hämolytisch wirkend, scheint nach den meisten Angaben das von der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation in Berlin hergestellte Lecithin „Agfa“ zu sein. Ferner ist zu berücksichtigen, daß die verschiedenen Blutarten sich gegenüber der hämolytischen Wirkung aktivierender Stoffe nicht ganz gleich verhalten. Was das Lecithin anlangt, so ist nach meinen Erfahrungen Ziegenblut die resistenteste Blutart. Man wird natürlich mit Vorteil solche Blutarten zur Untersuchung heranziehen*). Schließlich muß auch ein maximaler Kobragiftüberschuß zur Bestimmung des Aktivators verwandt werden. Diese Forderung ergibt sich aus der durch Kyes und Sachs[34]), sowie Noguchi[64]) bekannten Tatsache, daß der zur kompletten Hämolyse erforderliche Lecithinbedarf umso geringer ist, je mehr Kobragift zur Verfügung steht. Umgekehrt ist umso weniger Kobragift zur Hämolyse notwendig, je mehr Lecithin vorhanden ist. Zu einem Einblick in die wahren Verhältnisse der Aktivierung sind also erforderlich:

1. Möglichst reine Präparate,
2. Wahl der geeignetsten Blutart,
3. maximaler Kobragiftüberschuß.

Bei Berücksichtigung dieser Verhältnisse kann dann die aktivierende Wirkung durch diejenige Zahl ausgedrückt werden, welche das Multiplum angibt, um welche die an und für sich lösende Menge die Kobragift aktivierende Dosis übertrifft. Für das Lecithin entspricht die aktivierende Wirkung nach unseren Erfahrungen der Zahl 500—600. Noguchi[64]) fand das Triolein (22,5) stärker aktivierend als Lecithin, seine Versuche verlieren indes insofern als Beweiskraft, als er beim Lecithin nur eine Differenz von 16,6 beobachtete. Um eine Substanz in die Reihe der wirklichen Aktivatoren einzureihen, dürfte wohl, wenn sich die obigen Forderungen erfüllen lassen, eine weit höhere Differenz gefordert werden, wie wir sie beim Lecithin erwiesen haben. Im anderen Falle müßte der Nachweis durch die Darstellung des wirksamen Reaktionsproduktes, wie wir sie später für das aus Kobragift und Lecithin resultierende Reaktionsprodukt schildern werden, geführt werden.

Als Aktivatoren sind außer dem Lecithin noch bekannt das Kephalin (Dioxystearylmonomethyllecithin) durch Kyes und Sachs[34]) und das Jecorin, sowie Lecithinglukose durch P. Mayer[51]). Natürlich wirken außer dem Serum auch andere lecithinhaltige Körperflüssigkeiten aktivierend, so die Galle und die Milch. Zu bemerken ist dabei, daß die Milch erst nach dem Erhitzen auf 100° aktivierende Fähigkeiten annimmt (Kyes und Sachs[34])). Um das in den roten Blutkörperchen enthaltene Lecithin mittelst des Kobragifts zum Nachweis zu bringen, genügt es in folgender Weise zu verfahren (Kyes[29]), Kyes und Sachs[34])): Man zentrifugiert eine gewisse Menge Blut, wäscht das Sediment mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung und löst es in soviel Wasser auf, daß das Volumen je nach Bedarf dem Doppelten, Dreifachen bis Zehnfachen der ursprünglich vorhandenen Blutmenge entspricht. Durch Zufügen von Kochsalz wird dann die

*) Natürlich muß die Blutart zu denjenigen gehören, welche durch Kobragift allein nicht gelöst werden.

isotonische Salzkonzentration (0,85 %) hergestellt. Die aktivierende Wirkung solcher Blutlösungen schwankt nach der Tierart und individuell. Durch $1/2$ stündiges Erhitzen auf 62° werden die Blutlösungen inaktiviert, wodurch Kyes[29]) zu der irrtümlichen Annahme von „Endokomplementen" (Komplementen sensu strictiori) geführt wurde. Tatsächlich handelt es sich, wie Kyes und Sachs[34]) gezeigt haben, um einfache Lecithinwirkung. Die Thermolabilität ist nämlich sofort beseitigt, wenn man die Stromata der Blutzellen, welche das Lecithin enthalten, von der Hämoglobinlösung trennt. Die aktivierende Wirkung kommt dann der Stromataaufschwemmung zu und ist unter diesen Bedingungen thermostabil. Ein Gemisch von Lecithin und Hämoglobin ist also aktivierend, wird aber durch Erhitzen auf 62° — offenbar durch Kuppelung des Lecithins an das Hämoglobin — inaktiviert. Wir haben hier also in guter Übersicht solche Verhältnisse vor uns, wie wir sie oben zur Erklärung des verschiedenen Verhaltens nativer und erhitzter Sera diskutieren mußten. Bei allen Veränderungen der aktivierenden Funktion durch thermische Eingriffe wird auf die erörterten Faktoren das Augenmerk zu richten sein.

Für Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der Schlangengifte ist nach alledem das reine Lecithin der geeignetste Aktivator. Zu den Versuchen wird zweckmäßig eine 1 %ige Lösung von Lecithin in Methylalkohol hergestellt, die zum Gebrauch mit 9 Teilen physiologischer Kochsalzlösung zu verdünnen ist. Von dieser 0,1 %igen Lecithinlösung sind in der Regel 0,1—0,15 ccm die optimale Dosis, d. h. diejenige Menge, die einen beträchtlichen Lecithinüberschuß darstellt, aber an und für sich nicht mehr hämolytisch wirkt.

Es ist schon erwähnt worden, daß Lecithinmenge und Kobragift in umgekehrter Proportion stehen, in dem Sinne, daß um so weniger Lecithin zur kompletten Hämolyse benötigt wird, je mehr Kobragift vorhanden ist und umgekehrt. Man muß aber wissen, daß insofern eine Abweichung von der Regel stattfindet, daß bei einem sehr großen Kobragiftüberschuß wieder eine Steigerung des zur Hämolyse notwendigen Lecithinbedarfs stattfindet (Kyes und Sachs[34])). Ebenso kann die Hämolyse der empfindlichen Blutarten durch Kobragift allein bei einem Kobragiftüberschuß ausbleiben, wie Untersuchungen von Kyes[29]), sowie Kyes und Sachs[34]) gezeigt haben. Es kommen dabei individuelle Variationen von großer Breite vor, die sich vielleicht zum näheren Studium über den Einfluß von gewissen Faktoren auf das Verhalten der Blutzellen eignen dürften.

Nach Kyes-Sachs[34]) handelt es sich dabei um den Vorrat an disponiblem Lecithin in den Blutzellen. Der Vorgang wird von diesem Gesichtspunkt aus als eine Verteilung resp. Ablenkung des Lecithins durch einen Kobragiftüberschuß betrachtet. Noguchi[63]) macht allerdings für die Überschußhemmung das Vorhandensein einer zweiten Substanz im Kobragift, die erst bei größeren Giftmengen zur Wirkung gelangt, verantwortlich. Dieselbe soll durch Erhitzen der Giftlösung auf 95° niedergeschlagen werden, während das hämolytische Prinzip in Lösung bleibt. Die Wirkung dieses Hemmungsstoffes besteht nach Noguchi darin, daß er den Blutkörperchen einen erheblichen Schutz nicht nur gegenüber der hämolytischen Wirkung des Kobragiftes, sondern auch anderen Hämolysinen gegenüber verleiht. Dieser Auffassung widerspricht aber das außerordentlich weitgehende differente Verhalten des Blutes verschiedener Individuen einer und derselben Tierart, das eben auf eine in den Blutkörperchen selbst gelegene Ursache (jeweiliger Vorrat an disponiblem Lecithin) hinweist (cfr. Sachs[4])).

Was den Wirkungsmechanismus anlangt, so lehrt der Bindungsversuch, daß unempfindliche Blutkörperchen Kobragift allein, wenn ein geeigneter Aktivator (Lecithin) fehlt, nicht aufnehmen (Kyes[29]), Lamb[39])). Da

andererseits auch Lecithin allein von den Blutzellen nicht gebunden wird, so weisen schon diese Verhältnisse darauf hin, daß zwischen Kobragift und Lecithin direkte Beziehungen bestehen müssen, welche die hämolytische Wirkung bedingen. Wir wissen durch Kyes[30]), daß diese Beziehungen darin bestehen, daß sich Kobragift und Lecithin zu einem neuartigen Produkt, dem „Kobralecithid" vereinigen.

2. Die Lecithide des Schlangengiftes.

Das sich Kobragift und Lecithin miteinander vereinigen, ergibt sich bereits aus einem Versuch, den Kyes[29]) in seiner ersten Arbeit anführt. Schüttelt man eine wässerige (0,85 %/0 NaCl)-Lecithinlösung mit Äther und prüft dann einerseits die wässerige Schicht, andererseits die Ätherschicht, wobei der Äther verdunstet und der Rückstand mit physiologischer Kochsalzlösung auf das der wässerigen Schicht entsprechende Volumen aufgefüllt wird, so findet man, daß der Ätherextrakt bei weitem den Hauptanteil des Lecithins enthält. Das Lecithin wird dabei durch seine kobragiftaktivierende Funktion bestimmt. Setzt man aber zu der Lecithinlösung vor dem Ausschütteln eine geeignete Menge Kobragift hinzu und läßt das Gemisch vor dem Ätherzusatz eine Zeit lang ($^1/_2$ Stunde genügt) stehen, so ist in dem Ätherextrakt nur sehr wenig Lecithin nachzuweisen, die Hauptmenge ist in der wässerigen Schicht enthalten geblieben. Es muß also eine Reaktion zwischen Kobragift und Lecithin stattgefunden haben, und es ergibt sich zugleich, daß das resultierende Reaktionsprodukt im Gegensatz zum Lecithin unlöslich in Äther sein muß.

Das Prinzip der von Kyes[30]) aufgefundenen Methode der Lecithiddarstellung hat einen in gewisser Hinsicht gegensätzlichen Ausgangspunkt. Es wird nämlich zunächst die im Kobragift enthaltene Komponente mit dem Lecithin vereinigt und aus wässriger Lösung in ein Lösungsmittel ausgeschüttelt, in welchem das entstehende Lecithid leichter löslich ist, als in Wasser. Dieses Lösungsmittel ist das Chloroform. Um das Lecithid nun zu isolieren, wird dann die schon erwähnte Eigenschaft, die Unlöslichkeit in Äther, herangezogen: das Lecithid wird aus der Chloroformlösung durch Äther gefällt. Nach den früheren Angaben von Kyes[30]) wird folgendermaßen verfahren: Eine 1 $^0/_0$ige wässerige Lösung von Kobragift wird mit dem halben Volumen 20 $^0/_0$iger Lösung von Lecithin in Chloroform geschüttelt und dann zentrifugiert. Die klare Chloroformschicht wird mit einer Pipette entnommen und mit 5 Volumen reinem wasserfreien Äthers versetzt. Der entstehende Niederschlag, welcher das Kobralecithid darstellt, wird noch mehrmals mit Äther zur Befreiung von anhaftenden Spuren überschüssigen Lecithins gewaschen.

Neuerdings hat Kyes[33]) das Verfahren nicht unwesentlich modifiziert. Der Prozeß ist nur dann als vollständig gelungen zu betrachten, wenn das erhaltene Präparat die volle hämolytische Wirksamkeit des unter einem optimalen Lecithinszusatz geprüften nativen Kobragiftes aufweist, und in seiner hämolytischen Kraft durch Lecithin nicht verstärkt wird. Es wird also ein „komplettes Kobralecithid" gefordert. Es hatte sich aber gezeigt, daß die Ausbeute äußerst schwankend war. Um eine sichere quantitative Ausbeute zu erhalten, muß man der bei der Einwirkung des Kobragiftes auf Lecithin entstehenden Säurebildung be-

gegnen*). Der Gang des Verfahrens gestaltet sich nunmehr folgendermaßen:

Eine 0,5 %ige Lösung von Kobragift in Wasser wird mit dem gleichen Volumen 20 %iger Lösung von Lecithin in Chloroform durchgeschüttelt und sofort zur Hälfte neutralisiert.

Zu diesem Zweck werden 5 ccm der Emulsion entnommen und diesen 5 ccm Amylalkohol + 10 ccm Äthylalkohol + 3 Tropfen gesättigter alkoholischer Phenolphthaleinlösung zugefügt. Die Azidität dieses Gemisches wird durch Titrieren mit $^1/_{10}$ · n · -NaOH ermittelt. Zur Gesamtmenge der Emulsion wird dann die zu berechnende Menge n · NaOH zugesetzt, welche die vorhandene Azidität halb neutralisiert.

Die Emulsion wird nun 2 Stunden im Schüttelapparat geschüttelt und wiederum in der beschriebenen Weise die Azidität festgestellt. Die letztere nimmt zunächst zu. Es wird daher wieder zur Hälfte neutralisiert und wieder 2 Stunden geschüttelt. Die gleiche Prozedur hat so lange zu erfolgen, bis die Azidität keine Zunahme mehr aufweist. Dann wird die der Gesamtmenge der eingeführten Natronlauge äquivalente Menge Salzsäure zugefügt, daß Gemisch nochmals 2 Stunden geschüttelt und darauf scharf zentrifugiert. Die Chloroformschicht wird nun vorsichtig entnommen. Man kann, um sich Sicherheit über die erfolgreiche Ausschüttelung zu verschaffen, ihre hämolytische Wirksamkeit sofort bestimmen, indem man das Chloroform mit 9 Teilen Alkohol verdünnt und eine 10 %ige Verdünnung davon in physiologischer Kochsalzlösung zur Prüfung benutzt.

Der Chloroformteil wird nun durch wiederholtes (6-maliges) Trocknen mit Natriumsulfat von Wasser befreit.

Das Trocknen des Chloroforms empfiehlt sich deswegen, weil bei der Fällung des Lecithids aus Chloroform durch Äther auch lecithinartige Beimengungen mitgerissen werden. Da Lecithin selbst ätherlöslich ist, nimmt Kyes an, daß es sich bei diesen ätherunlöslichen Stoffen um Hydrate des Lecithins handelt, und sucht deren Bildung durch das Trocknen des Chloroforms zu vermeiden.

Die getrocknete Chloroformschicht bleibt mit 10 Volumen Äther drei Tage lang bei —10° bis —12° stehen. Der Niederschlag wird noch sechsmal mit Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure, Phosphorsäureanhydrid und Paraffin getrocknet. Das so erhaltene Präparat stellt eine, in ihrer Konsistenz noch wachsartige Masse dar. Zur weiteren Reinigung von anhaftendem Lecithin (resp. Lecithinhydraten) wird es 10 % in Äthylalkohol gelöst und bei —12° mit 10 Volumen Äther gefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Gewicht der Substanz hat durch die weitere Reinigung durch Alkohollösung und Ätherfällung ca. 14,5 % eingebüßt.

Diese Gewichtsreduktion bezieht Kyes ebenfalls auf die lecithinartigen Beimengungen, indem er annimmt, daß die fraglichen Stoffe aus alkoholischer Lösung durch Äther nicht mitgefällt werden.

Insgesamt werden bei dem Verfahren aus einem Gewichtsteile Kobragift ca. 5,6 Gewichtsteile Lecithid erhalten. Das gewonnene Lecithidpräparat ist schneeweiß und zeigt nicht mehr die wachsartige Konsistenz des Lecithins. Es ist analysenrein und entspricht, so weit es elementaranalytisch zugänglich ist, einem Monostearyllecithin (cfr. Lüdecke[47])). Die wässerige Lösung gibt keine Biuretreaktion. Die Löslichkeitsverhältnisse unterscheiden das komplette Kobralecithid einerseits vom Kobra-

---

*) Daß das Schlangengift auf Fette und Lecithin spaltend im Sinne der Säurebildung wirkt, ergibt sich auch aus den Arbeiten von Lüdecke[47]) sowie Neuberg und Rosenberg[58]).

gift, andererseits vom Lecithin. Das Verhalten den einzelnen Lösungsmitteln gegenüber ist aus der folgenden, der Arbeit von KYES entnommenen Tabelle zu ersehen.

Tabelle 2.

Lösungsmittel	Komplettes Lecithid	Lecithin	Kobragift
Wasser	bei 30° löslich	unlöslich	löslich
Aceton	unlöslich	„	unlöslich
Äther	„	löslich	„
Petroläther	„	„	„
Benzol	löslich	„	„
Toluol	„	„	„
Chloroform	„	„	„

Bei dem beschriebenen Verfahren der Lecithiddarstellung wird zugleich das hämolytische Prinzip des Kobragifts von dem eigentlich toxischen, dem Neurotoxin, isoliert. Das Neurotoxin bleibt nämlich bei dem Ausschütteln mit Chloroform in der wässrigen Schicht zurück. Auf das Neurotoxin wird in diesem Aufsatz nicht eingegangen. Es sei nur auf die Arbeit von JACOBY verwiesen, welche das von der hämolytischen Komponente befreite Neurotoxin behandelt.

Eine zweite, gleichfalls von KYES[30]) angegebene Methode der Lecithiddarstellung eignet sich besonders zur raschen Orientierung und bei Verfügung über nur geringe Mengen der Ausgangsmaterialien. Man fügt zu 1 ccm einer 4 % wässerigen Kobragiftlösung 1 ccm einer 20 % Lecithinlösung in Methylalkohol und läßt das Gemisch unter häufigem Umschütteln mehrere Stunden im Brutschrank (bei 37°) stehen. Sodann werden die Eiweißstoffe mit 10 Volumen absoluten Alkohols gefällt und abfiltriert. Das Filtrat wird mit 6—10 Volumen wasserfreien Äthers gefällt. Der Niederschlag stellt das komplete Kobralecithid dar.

Sehr interessant ist eine weitere Methode, die KYES[33]) verwandt hat, um die beim Einwirken einer geringen Lecithinmenge auf Kobragift sich bildenden Lecithide zu untersuchen. Das Verfahren besteht in folgendem: Schüttelt man 1 % Lösungen von Kobragift mit dem $^1/_5$ Volum 10 % Lösung von Lecithin in Chloroform in der oben beschriebenen Weise, so erhält man äußerst zähe Emulsionen, die sich beim Zentrifugieren äußerst schwer oder gar nicht trennen lassen. Die Scheidung erfolgt aber spontan im Scheidetrichter, wenn man zu dem Gemisch 1 Teil Äther und $^2/_5$ Teile Alkohol zufügt. Das Hämolysin ist aber im Gegensatz zu dem Verhalten bei der Darstellung des kompletten Lecithids quantitativ in der wässerigen Schicht geblieben, die durch ihre gelbe Färbung gleichzeitig erkennen läßt, daß ein wesentlicher Teil des Lecithins aus dem Chloroform in sie übergegagen ist. In der wässerigen Schicht entsteht gleichzeitig ein Niederschlag, der bei — 12° stärker wird. Er wird durch Dekantieren des Abgusses, resp. Zentrifugieren gesammelt, mit 30 % Alkohol bei — 12° gewaschen und getrocknet (Substanz I).

Der Abguß wird mit $^1/_2$ Volumen 5 % Phenollösung gut durchgeschüttelt und im Eise aufbewahrt. Es scheidet sich dabei ein dickflüssiges, bräunlichgelbes, ölartiges Sediment ab. Diese eigenartige ölige Schicht wird mit 15 Volum Alkohol bei — 12° digeriert. Der ausfallende Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Alkohol gewaschen und getrocknet (Substanz II).

Aus dem nach der Fällung der Ölschicht durch Alkohol verbleibenden Abguß wird mittels Ätherfällung eine weitere Substanz III erhalten.

Alle drei Substanzen wurden auf hämolytische Wirkung und elementaranalytisch untersucht, worüber die folgende Tabelle Auskunft gibt:

(s. Tabelle 3 pag. 262.)

Substanz II, die bei Lecithinzusatz 10mal so wirksam ist wie das native Kobragift, löst an und für sich auch in sehr großen Dosen fast gar nicht. Da sie außer-

Tabelle 3.

Substanz	Phosphorgehalt	Berechneter Gehalt an Monostearyllecithin	Hämolytische Kraft im Vergleich zur Wirkung des nativen Kobragiftes (Lecithinzusatz)	Ausbeute an Hämolysin
I	3,16 %	55,15 %	$^1/_{10}$	$^1/_{47}$
II	0,52 %	9,07 %	10	$^1/_3$
III	2,1 %	36,63 %	1	$^1/_5$

dem einen so geringgradigen Phosphorgehalt aufweist, neigt KYES dazu, diese Substanz für den gereinigten Hämolysinbestandteil des Krobragiftes in konzentriertem Zustande zu betrachten. Ein analoges Präparat erhielt KYES übrigens auch dadurch, daß er einen Teil der ursprünglichen wässerigen Schicht durch Zentrifugieren direkt vom Chloroform trennte, durch Aussalzen mit Ammonsulfat und Schütteln mit Chloroform das hämolytische Prinzip aus der wässerigen Schicht in Chloroform ausschüttelte und aus letzterem durch Alkohol fällte. Wenn das erhaltene Substanz II analoge Präparat das native Kobrahämolysin und nicht ein „inkomplettes Lecithid" darstellte, so würde man sich nach KYES vorstellen müssen, „daß das Kobrahämolysin durch gleichzeitig anwesende nicht hämolytische Lecithide im Chloroform in Lösung gehalten wird, während es im Alkohol im Gegensatz zu letzterem ausfällt." In obiger Tabelle zeigt sich übrigens im allgemeinen die „Gesetzmäßigkeit, daß mit steigender hämolytischer Wirksamkeit der Monostearyllecithingehalt abnimmt". Man wird daher zu der Annahme geleitet, daß im Kobragift neben dem eigentlichen Hämolysin noch eine Reihe anderer lecithidbildender Stoffe vorhanden sind, denen sogar eine größere Verwandtschaft zum Lecithin zukommt, als dem hämolytischen Amboceptor. Wenn daher zu dem Ausschüttelungsprozeß nur relativ wenig Lecithin verwandt wird, so werden naturgemäß zunächst die nicht hämolytischen Stoffe zur Lecithidbildung herangezogen werden, und erst, wenn noch ein Lecithinüberschuß bleibt, wird dieser mit dem eigentlichen hämolytischen Gift in Reaktion treten können. . . . . „Von diesem Gesichtspunkte aus betrachet, stellt aber das komplette Lecithid ein Gemisch von Lecithiden dar, unter denen das wirksame Produkt wahrscheinlich einen an Menge ziemlich bescheidenen Platz einnimmt." (KYES.) KYES nimmt aber andererseits an, daß ein Molekül der Kobrakomponente eine Vielheit von Monstearyllecithinresten bindet. Er hat auch Präparate in Händen gehabt, die sich teilweise dem nativen Kobragift, teilweise aber dem kompletten Lecithid konform verhielten. Er bezeichnet sie als „inkomplette Lecithide", d. h. Lecithide, in denen die Kobragiftkomponente mit Monostearyllecithinresten nicht gesättigt ist. Die Differenz dem nativen Kobragift gegenüber besteht dabei nur in dem Verhalten zum Antitoxin, durch welches das komplette Lecithid nicht mehr neutralisiert wird (KYES[30])). Ein gewisser Grad der Lecithinbesetzung kann aber bereits genügen, um die Reaktionsfähigkeit gegenüber dem Antitoxin aufzuheben. KYES[33]) unterscheidet danach vier Typen von Reaktionsprodukten, welche bei der gegenseitigen Einwirkung von Kobragift und Lecithin entstehen können:

1. „Die kompletten Lecithide, alkohollöslich, durch Lecithin nicht verstärkbar und dem Antitoxin gegenber nicht reaktionsfähig. Sie stellen ein Gemisch von Lecithiden dar, von denen das eine das hämolytische Prinzip ist.
2. Inkomplette Lecithide, alkoholunlöslich, durch Antivenin nicht neutralisierbar, aber verstärkbar durch Lecithin.
3. Inkomplette Lecithide, welche eine mehr oder weniger starke oder auch gar keine hämolytische Wirkung bei Lecithinzusatz besitzen (Substanzen I und III).
4. Das gereinigte hämolytische Prinzip (Substanz II), das vielleicht den nativen Kobraamboceptor darstellt, vielleicht aber auch ein extremes inkomplettes Lecithid, durch Lecithin verstärkbar, alkoholunlöslich und neutralisierbar durch das Antitoxin."

3. Eigenschaften des kompletten Kobralecithids.

Das komplette Kobralecithid ist in Wasser resp. physiologischer Kochsalzlösung bei gelindem Erwärmen leicht löslich. Die hämolytische Wirkung erstreckt sich auf alle Blutarten in gleicher Weise. Charakeristisch für sie ist die erheblich abgekürzte, oder bei größeren Dosen

überhaupt fehlende Inkubationszeit. Die Inkubationszeit bei der Hämolyse durch Schlangengift und Lecithin ist wesentlich der Ausdruck für die Zeit, welche für die Synthese zum Lecithid erforderlich ist. Man kann sich daher von dem Vorgang der Lecithidbildung bereits dadurch überzeugen, daß Gemische von Kobragift und Lecithin, welche vor dem Blutzusatz eine Zeit lang digeriert waren, erheblicher rascher hämolytisch wirken. als solche Gemische, zu denen sofort nach ihrer Herstellung Blut zugefügt wird.

Die hemmende Wirkung des Cholestearins kommt nach Kyes[30]) auch dem Kobralecithid gegenüber zur Geltung, wenn auch in geringerem Grade, als bei der kombinierten Wirkung von Kobragift und Lecithin.

Ferner ist die wäßrige Lösung des Kobralecithids koktostabil; sie verträgt sechs Stunden langes Erhitzen auf 100°, ohne an hämolytischer Kraft einzubüßen. Darin besteht ein wichtiger Unterschied gegenüber dem Verhalten des nativen Kobragiftes, dessen hämolytische Funktion bereits durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 100° zerstört wird.

Nach Beobachtungen Teruuchis[77]) ist das Lecithid auch der Einwirkung des Pankreassaftes gegenüber resistent, während letzterer das native Kobrahämolysin stark seiner hämolytischen, das Lecithin in geringem Grade seiner aktivierenden Wirkung beraubt.

4. Verhalten des Kobragiftes und des Kobralecithids zum Antitoxin.

Trotz der bemerkenswerten Thermostabilität des Kobralecithids und seiner an die Lipoide erinnernden Löslichkeitsverhältnisse gehört es doch zu den echten Toxinen. Kyes[31]) ist die Darstellung der Antitoxine des Kobralecithids gelungen. Er behandelte Kaninchen mit subkutanen Injektionen von steigenden Mengen des Kobralecithids vor und erhielt ein stark wirksames antitoxisches Serum (0,02 ccm hoben die hämolytische Wirkung von zwei komplet lösenden Dosen Kobralecithid vollständig auf). Da normales Kaninchenserum die Wirkung des Kobralecithids in gegeringem Maße hemmt, tut man gut, das Serum eine halbe Stunde lang auf 64° zu erhitzen. Dadurch wird die hemmende Wirkung des normalen Serums aufgehoben, während die spezifischen Antikörper intakt bleiben. Bei partieller Absättigung des Kobralecithids durch das Immunserum ergibt sich ein Neutralisationsbild, das der Neutralisation einer schwachen Base durch eine schwache Säure analog ist, indem die neutralisierte Giftmenge bei steigender Serummenge nicht letzterer proportional ist, sondern sukzessive relativ geringer wird. — Das Antitoxin des Kobralecithids neutralisiert auch die hämolytische Komponente des nativen Kobragiftes.

Das Umgekehrte ist aber nicht der Fall. Das sogenannte „Antivenin“, d. i. das von Calmette von Pferden durch Immunisieren mit dem nativen Kobragift gewonnene antitoxische Serum reagiert nicht mit dem Kobralecithid, wohl aber mit dem nativen Kobragift, wenn dem Gemisch erst nachträglich das zur Hämolyse notwendige Lecithin zugefügt wird. Diese von Kyes[30]) aufgefundene Tatsache, deren Bedeutung wir schon berührten, stellt also eine weitere markante Differenz zwischen Kobragift und Kobralecithid dar.

Andererseits reagiert aber die sich aus Kobragift und Antivenin bildende neutrale Verbindung noch mit dem Lecithin. Das kann man nach dem Vorgange von Kyes[31]) sehr einfach dadurch zeigen, daß der zur

kompleten Hämolyse notwendige Lecithinbedarf für eine reine Kobragiftlösung erheblich geringer ist, als für ein Gemisch von Kobragift und Antvenin, das, bei optimalem Lecithinzusatz geprüft, ebenso wirksam ist, als die zur Kontrole dienende reine Giftlösung.

Man kann auch durch ein besonderes Verfahren, das bei Kyes[31]) nachzulesen ist, die Toxin-Antitoxinkomplexe erst mit Lecithin absättigen. Der zur Hämolyse notwendige Lecithinbedarf ist dann wieder auf ein Minimum reduziert, weil die Lecithin ablenkenden Faktoren bereits gesättigt sind. Das Verfahren besteht im Prinzip darin, daß ein Gemisch von Kobragift und Antitoxin mit Lecithinchloroform ausgeschüttelt wird. Das freie Kobragift geht dann als Lecithid in das Chloroform. Die Verbindung „Kobragift-Antivenin“ aber bleibt in der wässerigen Schicht und bindet Lecithin. Der Komplex „Antivenin-Kobragift-Lecithin“ kann dann mit Alkohol gefällt und dadurch von freiem Lecithin befreit werden.

Kann man bei dem Kyesschen Verfahren nicht mit Sicherheit den Einwand ausschließen, daß die Bindung des Lecithins etwa nicht durch die Toxin-Antitoxinverbindung, sondern vielmehr durch andere Bestandteile des antitoxischen Serums erfolgt, so gibt eine weitere von Morgenroth[54]) angegebene Methode absolut übersichtliche und einwandsfreie Resultate. Zu deren Verständnis muß aber erst eine von Morgenroth besonders eingehend studierte Modifikation des nativen Kobragiftes erörtert werden.

5. Die Salzsäuremodifikation des Kobrahämolysins.

Kyes und Sachs[34]) haben festgestellt, daß Zusatz von Salzsäure zu einer Kobragiftlösung das in letzterer enthaltene Hämolysin gegen thermische Einflüsse erheblich schützt. Eine Lösung von Kobragift in Wasser verliert durch 20 minutenlanges Erhitzen auf 100° ihre hämolytische Wirkung. Setzt man der Lösung soviel Salzsäure zu, daß der Säuregehalt $^1/_{18}$ n · HCl entspricht, so tritt auch nach halbstündigem Erhitzen auf 100° keine Einbuße an hämolytischer Kraft ein; erst nach zwei stundenlangem Erhitzen ist das Hämolysin zerstört. Nach den Untersuchungen Morgenroths[53, 54]), dem wir die eingehende Analyse der Salzsäuremodifikation verdanken, hat dieselbe folgende Eigenschaften:

1. Die schon erwähnte erhöhte Thermostabilität;
2. Sie reagiert nicht mehr mit dem Antitoxin;
3. Ihre Bildung tritt auch dann ein, wenn das Hämolysin bereits an Antitoxin gebunden ist;
4. Ihre Bildung findet auch dann statt, wenn das Hämolysin bereits an Lecithin gebunden ist;
5. Sie ist vollkommen reversibel;
6. Sie bildet rascher mit Lecithin Lecithid, als das native Kobragift in neutraler Lösung.
7. Sie dialysiert im Gegensatz zu dem Verhalten des nativen Kobragiftes durch tierische Membranen.

Durch diese interessanten Eigentümlichkeiten der Salzsäuremodifikation ist es ermöglicht, eine Reihe von Fragen, die für die theoretische Immunitätslehre von Bedeutung sind, in einwandsfreier Methodik zu beantworten.

a) Spaltung der neutralen Toxin-Antitoxin-Verbindung.

Morgenroth[53]) hat nachgewiesen, daß es gelingt, aus einem lange (7 Tage) gelagerten neutralen resp. sogar überneutralisiertem Gemisch von Kobragift und Antivenin das Toxin durch Salzsäure quantitativ wieder zu gewinnen. Zwei Wege stehen für diesen Versuch zur Verfügung:

Der erste Weg besteht darin, daß neutralisierte Gemische von Kobragift und Antitoxin (in MORGENROTHS Versuchen doppelt bis vierfach überneutralisiert) kurze Zeit bei Zimmer- oder Brutschranktemperatur resp. längere Zeit im Eisschrank stehen gelassen werden. Sodann wird soviel n · HCl zugefügt, daß der Salzsäuregehalt $^1/_{20}$ n · HCl beträgt. Dadurch wird die Salzsäuremodifikation gebildet und HCl-Toxin und Antitoxin werden frei. Erhitzt man nun das Gemisch eine halbe Stunde lang im kochenden Wasserbad, so wird das Antitoxin zerstört, die Salzsäuremodifikation bleibt aber dank ihrer Stabilität erhalten, und nach dem nunmehrigen Neutralisieren mit NaOH (vorher abkühlen) kann das Kobrahämolysin in der gewöhnlichen Weise quantitativ aufgefunden werden.

Der andere Weg ist bis zum Zusatz der Salzsäure mit dem eben beschriebenen identisch: die resultierende Salzsäurekonzentration ist in MORGENROTHS Versuchen $^1/_{17}$ n · HCl. Gleichzeitig mit der Salzsäure wird aber jetzt eine starke alkoholische Lecithinlösung zugesetzt, u. zw. zu 5 ccm des Neutralgemisches, das $^1/_{200}$ % Kobragift enthält, 0,5 ccm einer 5 % Lecithinlösung. Das Gemisch bleibt einen Tag im Eisschrank. Es spielt sich darin folgender Vorgang ab: Das Toxin wird durch die Salzsäure frei und vereinigt sich mit dem Lecithin zum Lecithid, das nun überhaupt nicht mehr mit dem Antitoxin reagiert. Daher läßt sich nach dem Neutralisieren mit NaOH das Kobrahämolysin ohne weiteres als Lecithid quantitativ nachweisen. Notwendige Kontrollen:

a) Neutralgemisch + Lecithin, aber ohne Salzsäure;
b) Entsprechende native Giftlösung + Lecithin.

Ändert man den beschriebenen Versuch in der Weise ab, daß man statt der alkoholischen Lecithinlösung dieselbe Menge reinen Methylalkohols zusetzt und verfährt im übrigen in analoger Weise, nur daß man die hämolytische Wirksamkeit mit Lecithinzusatz prüft, so findet man das Gemisch neutral. Die beiden durch Salzsäure getrennten Komponenten haben sich also nach dem Neutralisieren wieder vereinigt — ein Beweis dafür, daß bei der Trennung das Antitoxin in funktionstüchtigem Zustande erhalten bleibt.

Wie TERUUCHI [77]) gefunden hat, kann man das Toxin aus dem neutralen Gemisch von Kobragift und Antivenin bis zu einem gewissen Grade auch durch Verdauung mittelst Pankreassaftes restituieren. Nach den Versuchen TERUUCHIS wirkt Pankreassaft zerstörend auf das Kobrahämolysin und auf das Antivenin ein, führt aber das Freiwerden eines Teiles des Hämolysins aus einem völlig neutralen Gemisch beider herbei.

β) Beziehung des Lecithins zur Kobrahämolysin-Antitoxin-Verbindung. (Nach MORGENROTH [54]).)

Ein überneutralisiertes Gemisch von Kobragift und Antitoxin wird mit $^1/_{10}$ Volumen 5 % alkoholischer Lecithinlösung versetzt, nach viertägigem Aufenthalt 30 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt. Das Gemisch ist nun völlig inaktiv geblieben. Eine ganz gleich behandelte Lösung von nativem Kobragift entsprechender Giftkonzentration hat seine hämolytische Wirksamkeit behalten. Die Frage ist nun, ob das Lecithin an das Toxin gebunden ist oder nicht. Im letzteren Falle muß das Toxin durch das Erhitzen zerstört sein, im ersteren bleibt es als Lecithid erhalten. Setzt man nun zu beiden Gemischen soviel Salzsäure zu, daß der Gehalt etwa $^1/_{20}$ n · HCl entspricht und kocht wiederum $^1/_2$ Stunde, neutralisiert dann, so erweisen sich beide Gemische in gleicher Weise

hämolytisch wirksam und repräsentieren quantitativ den Hämolysingehalt der enthaltenen Giftmengen. Das Lecithin war also an die Toxin-Antitoxinverbindung gebunden.

Der notwendige Kontrollversuch besteht darin, daß gezeigt wird, daß ein Gemisch von Kobragift und Antitoxin, in ganz gleicher Weise behandelt, aber unter Fortlassung des Lecithins, inaktiv ist, wenn es zum Schluß mit Lecithinzusatz auf hämolytische Wirksamkeit geprüft wird.

γ) Verhalten der neutralen Kobrahämolysin-Antitoxinverbindung zu den roten Blutzellen.

Morgenroth[54]) hat die Möglichkeit, durch die Salzsäurewirkung die neutrale Verbindung „Kobrahämolysin-Antitoxin" zu sprengen auch dazu benutzt, um über die Reaktionsfähigkeit des an Antitoxin gebundenen Toxins mit den Blutzellen Aufschluß zu erlangen. Es zeigte sich, daß das an Antitoxin gebundene Toxin mit den Blutzellen überhaupt nicht mehr reagiert. Dadurch ist einmal ausgeschlossen, daß etwa der Komplex Toxin-Antitoxin von den Zellrezeptoren gebunden wird, dann aber auch, daß durch die Zellrezeptoren eine Dissoziation des Toxins verursacht würde, wie man es erwarten müßte, wenn die von Arrhenius und Madsen postulierte Reversibilität der Toxin-Antitoxinreaktionen zu recht bestünde. Die technische Schwierigkeit, die zunächst darin gelegen scheint, daß ja das native Kobrahämolysin mit der Zelle nicht reagiert, sondern erst nach seiner Vereinigung mit dem Lecithin gebunden wird, läßt sich nun dadurch beseitigen, daß, wie schon erörtert, auch das an Antitoxin gebundene Kobrahämolysin das Lecithin bindet und dann durch Salzsäure als Lecithid quantitativ abgespalten werden kann. Man verfährt demnach methodisch folgendermaßen:

Ein völlig neutralisiertes oder überneutralisiertes Gemisch von Kobragift und Antitoxin wird in zwei gleiche Teile geteilt. Der eine Teil erhält Zusatz von Lecithin, der andere bleibt ohne Lecithin. Beide Gemische werden nun mit der gleichen Menge Blutsediment 3 Stunden bei 37^{0} digeriert, sodann abzentrifugiert. Derjenige Abguß, der das ohne Lecithin angesetzte Gemisch enthält, wird jetzt durch Zusatz der entsprechenden Lecithinmenge vervollständigt. Nun erfolgt Zusatz von Salzsäure zu beiden Gemischen bis zur $n/_{20}$-Konzentration, $^{1}/_{2}$ stündiges Erhitzen auf 100^{0} und Neutralisieren. Die Prüfung auf hämolytische Wirksamkeit ergibt in beiden Gemischen übereinstimmende hämolytische Wirksamkeit. Da aus dem zuerst ohne Lecithin angesetzten Gemisch nichts von den Blutzellen gebunden sein konnte, so ist aus einem solchen Versuch der Schluß gerechtfertigt, daß aus dem Gemisch von Kobragift-Antitoxin-Lecithin trotz der Reaktionsfähigkeit des Lecithids nichts von den Zellrezeptoren aufgenommen wird.

δ) Reversibilität der Salzsäuremodifikation.

Die Salzsäuremodifikation des Kobrahämolysins ist, wie schon erwähnt, unter den beschriebenen Versuchsbedingungen, d. h. Neutralisation nach $^{1}/_{2}$stündigem Erhitzen in siedendem Wasserbad, vollkommen reversibel. Aber es muß beachtet werden, daß nach den Untersuchungen von Morgenroth und Pane[56]) bei längerem Erhitzen eigentümliche Verhältnisse Platz greifen. Erhitzt man Kobragiftlösungen (0,1 $^{0}/_{0}$) bei einer $\frac{N}{20}$ · HCl-Konzentration 1—2 Stunden im siedenden Wasserbad, neutralisiert

und bestimmt sofort die hämolytische Wirksamkeit bei Lecithinzusatz, so findet man in der Regel einen mehr oder weniger starken Verlust an hämolytischer Kraft. Läßt man die vorbehandelte Giftlösung aber lagern, so tritt nach einigen Tagen eine Zunahme der hämolytischen Wirksamkeit auf. Das Phänomen hat eine große Variationsbreite. Im allgemeinen geben MORGENROTH und PANE an: „Wenn die Abschwächung weniger als $^9/_{10}$ betrug, so war die Rückverwandlung nach 2—3 Tagen mehr oder weniger vollständig erfolgt; war die Abschwächung stärker, so war die Rückverwandlung meist geringfügig, blieb auch häufig ganz aus.“ Es handelt sich also um eine nicht hämolytische Modifikation des Kobragiftes, die reversibel sein kann, aber auch bis zu einem mehr oder weniger irreversiblen Produkt übergeführt werden kann. Das Wesentliche ist das Stadium der Reversibilität. Um diese Bedingung gut zu erhalten, verfährt man nach MORGENROTH und PANE besser und schonender in der Weise, daß man die angesäuerten Giftlösungen mit Lecithinzusatz 6—9 Tage im Eisschrank stehen läßt, dann neutralisiert und sofort, sowie von Tag zu Tag die hämolytische Wirksamkeit bestimmt. Da die Hämolyse durch fertig gebildetes Kobralecithid sehr rasch eintritt, hat man dabei in der Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Hämolyse ein gutes Kriterium, um die allmähliche Rückverwandlung zu messen. Bei diesem Vorgehen haben MORGENROTH und PANE stets die Bildung irreversibler Produkte vermieden und die Entstehung und Rückverwandlung der reversiblen Modifikation klar zum Ausdruck kommen gesehen.

6. Toxin und Antitoxin.

Wie in dem vorligenden Beitrag überhaupt, so sollen auch in diesem Kapitel die Beziehungen des Schlangengiftes zum Antitoxin nur insoweit kurz behandelt werden, als sie sich auf die hämolytische Quote des Schlangensekretes beziehen. Es sei nur nochmals daran erinnert, daß außer dem Hämolysin eine Reihe anderer wirksamer Stoffe (Neurotoxin, Hämorrhagin, Cytotoxine [FLEXNER-NOGUCHI[18]), GOEBEL[23])], Bakteriolysine [NOC[60])]), proteolytisch wirkende Stoffe (FLEXNER-NOGUCHI[16]), DELEZENNE[11]), NOC[59]), LANNOY usw.) im Schlangengift enthalten sind. Sie werden an dieser Stelle nicht besonders besprochen, und es sei in dieser Hinsicht auf die speziellen Kapitel über Schlangengift und Schlangengiftserum verwiesen, die ja in diesem Handbuch von autoritativer Seite eine besondere Besprechung durch CALMETTE finden, dem wir einen so erheblichen Teil unserer Kenntnisse über das Schlangengift und besonders die Entdeckung der Schlangengiftantitoxine verdanken.

STEPHENS und MYERS[57]) haben zuerst gezeigt, daß die hämolytische Wirkung des Kobragiftes durch das Antitoxin in gleicher Weise, wie die neurotoxische aufgehoben wird. Was die durch Immunisierung mit verschiedenen Schlangengiften erhaltenen Antitoxine anlangt, so wird über eine mehr oder minder ausgesprochene Spezifität derselben, auch in antihämolytischer Hinsicht von den Autoren berichtet (vergl. die Arbeiten von LAMB[35—38]), KYES[32]), MARTIN[50]), NOGUCHI[62]), ROGERS[70]), TIDSWELL[78]) u. a.). Nach CALMETTE[10]) besteht ein Parallelismus zwischen antihämolytischer und antineurotoxischer Wirkung, so daß die Bestimmung der ersteren zugleich einen Maßstab für den Inhalt an Antineurotoxin abgibt. NOGUCHI[62]) bestreitet dies.

Für die Methodik der Antihämolysinbestimmung muß an erster Stelle der Umstand maßgebend sein, daß die Verbindung „Hämolysin-

Antivenin" Lecithin bindet. Einen richtigen Einblick in die Neutralisationsverhältnisse kann man daher nur erlangen, wenn man mit einem optimalen Lecithinüberschuß arbeitet. Frühere Untersuchungen über die partielle Absättigung von Schlangengifthämolysin und Antitoxin verlieren durch das Außerachtlassen dieser Fehlerquelle an Bedeutung. Wenn man nämlich die Toxin-Antitoxingemische auf empfindliche Blutarten ohne Lecithinzusatz oder auf unempfindliche Blutzellen mit einem geringen Lecithinzusatz wirken läßt, so kann durch die Bindung des Lecithins an die neutrale Verbindung dasselbe dem noch freien Toxin entzogen werden und dadurch die Neutralisation einer größeren Toxinmenge vorgetäuscht werden. Diese Einwände müssen gegenüber den von Myers[57]), Flexner-Noguchi[17]) und Madsen[48]) erhobenen Befunden geltend gemacht werden. Die von diesen Autoren erhaltenen Neutralisationskurven deuten auf eine komplizierte Zusammensetzung des Kobrahämolysins hin oder könnten auch im Sinne von Arrhenius und Madsen als der Ausdruck einer reversiblen Reaktion zwischen schwach aviden Substanzen aufgefaßt werden. Die tatsächlichen Verhältnisse ergeben sich aber aus den Untersuchungen von Kyes[31]), der eine große Lecithinmenge zur Aktivierung benutzte. Danach verläuft die Neutralisation von Kobrahämolysin und Antivenin geradlinig. Wenn man zu einer gegebenen Giftmenge verschiedene Multipla einer geringen Antivenindosis zusetzt und die Gemische dann mit viel Lecithin auf hämolytische Wirksamkeit prüft, so ist der durch den Antitoxinzusatz bedingte Verlust an hämolytischer Kraft proportional der zugesetzten Antitoxinmenge. Man muß daher das Kobrahämolysin als ein einheitliches Toxin auffassen, das mit starker Avidität zum Antitoxin ausgestattet ist. In Übereinstimmung damit steht es, daß mit Kobragift und Antitoxin das Danysz-Dungernsche Phänomen nicht zu erhalten ist (Sachs[73, 74])). Setzt man zu einer bestimmten Antitoxinmenge Toxin in zeitlich getrennten Fraktionen zu, so ist die hämolytische Wirksamkeit des Gemisches genau ebenso stark, wie in einem Gemisch, das dieselben Toxin- und Antitoxinmengen, aber auf einmal gemischt, enthält. Bei allen anderen daraufhin untersuchten Toxinen bedingt der fraktionierte Zusatz des Toxins zum Antitoxin eine erhebliche Steigerung der Giftigkeit. Neuerdings haben auch Madsen und Noguchi[49]) über partielle Absättigungen des Schlangengifthämolysins durch Antivenin berichtet, die zu dem Resultate führten, daß die Neutralisationskurve nicht wesentlich von der geraden Linie abweicht.

b) Die übrigen Lecithide.

Der eigenartige Wirkungsmechanismus der Aktivierung durch Lecithin, der zuerst bei den Schlangengiften erkannt wurde, stellt offenbar einen in der Natur weit verbreiteten Vorgang dar. Man darf wohl annehmen, daß die Rolle des Lecithins als Aktivators noch in vielen Fällen sich wird erweisen lassen, bisher ist sie bei der Wirkung der Hämolysine des Skorpionen- und Bienengiftes sicher gestellt.

1. Skorpionengift.

Das Skorpionengift, dessen nahe Verwandtschaft zu den Schlangengiften bereits durch die von Calmette[8]) entdeckte Tatsache, daß seine neurotoxische Komponente durch das Antivenin der Schlangengifte neutralisiert wird, bekannt war, zeigt auch in der Fähigkeit der Lecithidbildung mit den Schlangengiften Übereinstimmung. Kyes[30]) hat gefunden, daß das Skorpionengift nur Meerschweinchenblut in geringem Grade löst,

die anderen Blutarten aber unbeeinflußt läßt. Nach Zusatz von Lecithin löst es alle Blutarten in ziemlich gleicher Stärke auf. Die Methodik ist dieselbe wie diejenige der Schlangenhämolysine. KYES[30]) hat auch das Reaktionsprodukt, das hämolytische Lecithid des Skorpionengiftes dargestellt.

2. Bienengift.

Ob das Bienengift zu den echten Toxinen gehört, ist noch nicht mit Sicherheit festgestellt, da eine gelungene Antitoxinerzeugung noch aussteht. Die von LANGER[43, 44]) festgestellte Tatsache der Gewöhnung der Imker an das Bienengift dürfte dafür zu sprechen geeignet erscheinen. Durch LANGER[42]) ist die hämolytische Wirkung des Bienengiftes bekannt, sowie der Umstand, daß die Hämolyse durch normale Sera gehemmt wird. Die Feststellung, daß das Hämolysin des Bienengiftes zu den Lecithid bildenden Hämolysinen gehört, verdanken wir MORGENROTH und CARPI[55]). Die Untersuchung der hämolytischen Wirkung des Bienengiftes gestaltet sich nach MORGENROTH und CARPI folgendermaßen:

100 Stacheln und Giftblasen von Bienen werden mit 10 ccm Kochsalzlösung und Glyzerin 24 Stunden lang im Eisschrank extrahiert. Die Lösung wirkt hämolytisch (Kaninchen-, Meerschweinchen- und Ziegenblut). Durch Zusatz von Lecithin wird eine 50—500 fache Verstärkung der hämolytischen Wirksamkeit erzielt. Die neutrale Lösung des Bienengiftes ist weit weniger stabil als diejenige des Schlangengiftes. Bereits 2—3 stündiger Aufenthalt bei 37° schwächt die hämolytische Wirkung erheblich ab. Einstündiges Erhitzen auf 100° bewirkt vollständige Inaktivierung. Normales Pferdeserum, ebenso wie Cholestearin bewirkt Hemmung der Hämolyse durch Bienengift und Lecithin; das durch CALMETTE dargestellte Antivenin des Schlangengiftes bewirkt keinen größeren Schutz als normales Pferdeserum.

Das Lecithid des Bienengiftes wird in folgender Weise gewonnen: Gleiche Teile der Bienengiftlösung und 5%ige Lecithinlösung in Methylalkohol werden 24 Stunden lang bei 37° digeriert. Dann werden 7 Volumen Alkohol absolut. zugesetzt, von dem Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wird mit ca. 7 Volumen Äther versetzt. Der entstehende Niederschlag wird mit Äther gewaschen und getrocknet. Er löst sich leicht in physiologischer Kochsalzlösung und enthält das gesamte Hämolysin der verarbeiteten Bienengiftmenge. Das so gewonnene Lecithid des Bienengiftes besitzt einen ziemlich hohen Grad von Thermostabilität; die Hälyse tritt bei größeren Dosen fast momentan ein.

3. Trachinusgift.

Noch nicht streng bewiesen, aber doch sehr wahrscheinlich ist die Lecithid bildende Natur bei dem Hämolysin des Trachinusgiftes (Trachinus drako, Petermännchen). BRIOT[7]) stellte die hämolytische Wirkung des Trachinusgiftes fest. Es löst weder an und für sich, noch nach Zusatz von aktivem Pferdeserum, wohl aber bei Zufügen von erhitztem Pferdeserum. Es liegen also analoge Verhältnisse vor, wie sie bei den Schlangengiften bestehen, und die weitere Untersuchung dürfte sich in der gleichen Richtung zu bewegen haben. Durch Immunisieren mit dem Trachinusgift gelang es BRIOT ein antitoxisches Serum herzustellen.

4. Charakteristik der Lecithidbildung und formale Analogien.

Der eigenartige Vorgang der Lecithidbildung hat natürlich zu zahlreichen Versuchen in analoger Richtung Anlaß gegeben. Es empfiehlt

sich aber, um voreilige Analogiebeschlüsse zu vermeiden, das Charakteristische der Lecithidbildung, wie sie bei den Schlangengiften typisch ist, zu präzisieren. In biologischer Hinsicht ist der Umstand charakteristisch, daß aus zwei völlig unwirksamen Komponenten ein giftiges Produkt entsteht, dieses Produkt, das Lecithid, in seinen Wirkungen erheblich von der nativen Giftkomponente differiert und im Gegensatz zu letzterer thermostabil ist. In physikalisch-chemischer Hinsicht sind die Löslichkeitsverhältnisse eigentümlich, die sowohl von denjenigen des nativen Giftes, als auch denjenigen des Lecithins abweichen. Insbesondere ist die Fällung des Lecithids aus Chloroform oder alkoholischer Lösung zu bemerken.

Keine von den übrigen, seither mit der Bildung der toxischen Lecithide in Zusammenhang gebrachten Erscheinungen stimmt mit dem erörterten Komplex von Eigenschaften vollkommen überein. Es handelt sich um mehr oder weniger unvollständige Analogien formaler Art. Zu erwähnen ist in dieser Hinsicht die Angabe von Reiss[69]), nach welcher Lösungen von Lecithin in Chloroform Lab und Trypsin aufzunehmen im stande sind; die nach Kyes charakteristische Fällung durch Äther gelang aber nicht*). Zu erwähnen sind hier ferner die Untersuchungen Koberts[26]) über die Saponinsubstanzen. Nach Kobert geht das an und für sich stark hämolytische Saponin sowohl mit dem Lecithin als auch mit dem Cholestearin Verbindungen ein. Erstere ist hämolytisch, letztere nicht. Pascucci[67]) gibt an, daß die ursprünglich agglutinierende Wirkung des Ricins durch Lecithin zu einer hämolytischen wird, was von Neuberg und Rosenberg[58]) in dieser Form nicht bestätigt werden konnte. Nach Landsteiner und Jagič[40, 41]) wirkt kolloidale Kieselsäure auf Blutkörperchen agglutinierend, nach Zusatz von Lecithin (oder Blutserum) hämolytisch. Der Uuterschied gegenüber der Hämolyse durch Kobragift und Lecithin besteht aber darin, daß die Hämolyse nur bei vorhergehendem Digerieren der Blutkörperchen mit Kieselsäure und nachfolgendem Lecithinzusatz eintritt. Beim Mischen von kolloidal gelöstem Eisenhydroxyd und Lecithin entsteht ferner, wie Landsteiner und Jacič zeigten, ein Niederschlag, der in Chloroform löslich ist und aus dieser Lösung durch Äther gefällt wird. Angaben von Detre und Sellei[13—15]), nach denen Sublimatlösungen durch Ausschütteln mit Lecithinchloroform an hämolytischer Wirksamkeit verlieren sollen, bedürfen weiterer Aufklärung. Nach Detre und Sellei[15]) soll die hämolytische Wirkung des Sublimats durch Lecithin gehemmt werden, was aber Sachs[75, 76]) nicht bestätigen konnte. Alle erwähnten Befunde dürften also nur in Teilerscheinungen zu der typischen Bildung toxischer Lecithide gewisse Analogien aufweisen. Die letztere ist vorläufig strikt erwiesen nur für die Schlangengifte, das Skorpionen- und Bienengift, für das Trachinusgift ist sie mit Wahrscheinlichkeit anzunehmen.

Neuere Beobachtungen von Friedemann[19]) weisen darauf hin, auch in den Sekreten höherer Tiere nach Hämolysinen vom Lecithidcharakter zu suchen. Friedemann[19]) fand im Pankreasfistelsaft vom Hund ein durch Lecithin stark aktivierbares Hämolysin**). Im Pankreasextrakt (erhalten durch Behandeln von Pankreaspreßsäften mit Alkohol und Äther) stellte er

---

*) Vgl. dazu auch die neueren Arbeiten von Küttner[28]), sowie Michaelis und Róna[52]).

**) Bereits Delezenne[12]) stellte fest, daß Pankreas- und Darmsaft vom Hunde, ohne an und für sich hämolytisch zu wirken, vereint die Hämolyse bedingen.

gleichfalls die Anwesenheit eines Hämolysins fest, das sich thermolabil erwies und durch die alkohol-ätherlöslichen Bestandteile des Blutserums, aber nicht durch Lecithin aktiviert wurde. FRIEDEMANN ist geneigt, die von KORSCHUN und MORGENROTH[27]) entdeckten alkohol-ätherlöslichen hämolytischen Stoffe der Organe, auch des Pankreas, für die Lipoidverbindungen der von ihm im Pankreas festgestellten komplexen Hämolysine zu halten.

Literatur.

Zusammenfassende Darstellungen über tierische Toxine:

1) OPPENHEIMER, C., Toxine und Antitoxine. Jena 1904.
2) CALMETTE, A., Vergiftungen durch tierische Gifte. Menses Handbuch der Tropenkrankheiten. Leipzig 1905, Bd. I.
3) Ders., Les Venins, les animaux venimeux et la sérothérapie antivenimeuse. Paris 1907.
4) SACHS, H., Tierische Toxine als hämolytische Gifte. Biochemisches Centralbl. 1906, Bd. V.
5) ST. FAUST, E., Die tierischen Gifte. Braunschweig 1906.

Originalarbeiten:

6) ABDERHALDEN, E., und LE COUNT, E. R., Die Beziehungen zwischen Cholestearin, Lecithin und Cobragift, Tetanustoxin, Saponin und Solanin. Zeitschr. f. exper. Path. u. Ther., 1905, Bd. II, H. 2.
7) BRIOT, Etudes sur le venin de la vive (Trachinus Draco). Journ. de physiol., 1903.
8) CALMETTE, A., Contribution à l'étude des venins des toxines et des sérums antitoxiques. Annal. Pasteur, 1895, Bd. IX.
9) Ders., Sur l'action hémolytique du venin de cobra. C. R. de l'Acad. des Sciences, 1902, Tome CXXXIV, No. 24.
10) Ders., Les Sérums antivenineux polyvalents. Mesure de leur activité. Ebenda, 1904, Tome CXXXVIII.
11) DELEZENNE, C., Über das Vorkommen einer Kinase im Schlangengift. Compt. rend. de l'académie des Sciences, 1902, Tome CXXXV.
12) Ders., Action du suc pancréatique et du suc intestinal sur les hématies. Compt, rend. de la Soc. de Biol. 1903, Tome LV.
13) DETRE, L., und SELLEI, J., Die hämolytische Wirkung des Sublimats. Berl. klin. Wochenschr. 1904, Nr. 30 und Wiener klin. Wochenschr. 1904, No. 45 u. 46.
14) Dies., Heilversuche an sublimatvergifteten roten Blutkörperchen. Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der Sublimathämolyse. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 49.
15) Dies., Welche Rolle spielen die Lipoide bei der Sublimathämolyse? Ebenda 1905, Nr. 42.
16) FLEXNER, S., und NOGUCHI, H. Snake venom in relation to hämolysis, Bakteriolysis and Toxicity. Journ. of exper. Med., 1902, Vol. VI, No. 3.
17) Dies., The constitution of snake venom and snake sera. Univ. of Penna. Med. Bull., 1902, November.
18) Dies., On the Plurality of Cytolysins in Snake Venom. Journ. of Path. and Bact., 1903, Bd. X, Univ. of Penna. Med. Bull., 1903, Juli-August.
19) FRIEDEMANN, U., Über ein komplexes Hämolysin der Bauchspeicheldrüse. Deutsche med. Wochenschr., 1907, Nr. 15.
20) GENGOU, O., Etude de l'action empêchaute du citrate de soude sur l'hémolyse par le venin de cobra. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1907, Tome LXII, Heft 9.
21) GOEBEL, O., Contribution à l'étude de l'agglutination par le venin de cobra. C. R. de la Soc. de Biol., 1905, Tome I, pag. 58.
22) Ders., Contribution à l'étude de l'hémolyse par le venin de cobra. Ebenda, 1905.
23) Ders., Action du venin de cobra sur les trypanosomes. Annal. de la Soc. de Méd. de Gand, 1905.
24) HAUSMANN, W., Über die Entgiftung des Saponins durch Cholestearin. Hofmeisters Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol., 1906, Bd. VI. Cf. auch Wiener klin. Wochenschr. 1905.
25) KOBERT, R., Beiträge zur Kenntnis der Giftspinnen. Stuttgart 1901.
26) Ders., Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen für Naturforscher, Ärzte und Medizinalbeamte. Stuttgart 1904.

27) Korschun, S., und Morgenroth, J., Über die hämolytischen Eigenschaften von Organextrakten. Berl. klin. Wochenschr. 1902, Nr. 37.
28) Küttner, S., Über den Einfluß des Lecithins auf die Wirkung der Verdauungsfermente. Zeitschr. für physiol. Chem. 1907, Bd. L.
29) Kyes, P., Über die Wirkungsweise des Cobragiftes. Berl. klin. Wochenschr. 1902, Nr. 38 u. 39.
30) Ders., Über die Isolierung von Schlangengift-Lecithiden. Ebenda, 1903, Nr. 42 u. 43.
31) Ders., Cobragift und Antitoxin Ebenda, 1904, Nr. 19.
32) Ders., Lecithin und Schlangengifte. Zeitschr. für. physiol. Chem., 1904, Bd. XLI, Heft 4.
33) Ders., Über die Lecithide des Schlangengiftes. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, Heft 2.
34) Kyes, P., und Sachs, H., Zur Kenntnis der Cobragift aktivierenden Substanzen. Berl. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 2—4.
35) Lamb, G., On the action of the venoms of the Cobra and of the Daboia on the red blood corpuscles and the blood plasma. Scientific memoirs by officers of the Medical and Sanitary Departments of the government of India. New Series, 1903, No. 4.
36) Ders., Specificity of antivenomous sera. Ebenda, 1903, No. 5.
37) Ders., Specificity of antivenomous sera II. Ebenda, 1904, No. 10.
38) Ders., The Specificity of antivenomous sera with special reference to a serum prepared with the venom of Daboia Russelli. — Ebenda, 1905, No. 16.
39) Ders., Snake-venoms in relation to Hämolysis. Ebenda, 1905, No. 17.
40) Landsteiner, K. und Jagic, N., Über Analogien der Wirkung kolloidaler Kieselsäure mit den Reaktionen der Immunkörper und verwandter Stoffe. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 3.
41) Dies., Über Reaktionen anorganischer Kolloide und Immunkörperreaktionen. Münch. med. Wochenschr. 1904, No. 27.
42) Langer, J., Untersuchungen über das Bienengift. Arch. internat. de Pharmocodynamie. 1899, Tome VI.
43) Ders., Bienengift und Bienenstich. Bienenvater 1901, Jahrg. 33, Nr. 10.
44) Ders., Der Aculeatenstich. Festschrift für F. J. Pick. 1898.
45) Levaditi, C., Sur les hémolysines cellulaires. Annal. de l'Inst. Pasteur 1903.
46) Ders., Sur les hémolysines thermostabiles du sérum sanguin. C. r. de la Soc. de Biol. 1905, Tome LVIII.
47) Lüdecke, Zur Kenntnis des Lecithins und der Glyzerin-Phosphorsäure. Inaug.-Diss. München 1905.
48) Madsen, Th., Toxins and Antitoxins. Brit. Med. Journ., 1904, pag. 567.
49) Madsen, Th. und Noguchi, H., Toxins und Antitoxins-Snake venoms and Antivenins. The Journ. of exper. med. 1907, Vol. IX, No. 1.
50) Martin, C. J., Discussion on immunity. Brit. Med. Journ. 1904, pag. 567.
51) Mayer, P., Über Lecithinzucker und Jecorin sowie über das physikalisch-chemische Verhalten des Zuckers im Blut. Biochem. Zeitschr. 1906, Bd. I.
52) Michaelis, L., und Róna, P., Über dis Löslichkeitsverhältnisse von Albumosen und Fermenten mit Hinblick auf ihre Beziehungen zu Lecithin und Mastix. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV.
53) Morgenroth, J., Über die Wiedergewinnung von Toxin aus seiner Antitoxinverbindung. Berl. klin. Wochenschr., 1905, Nr. 50.
54) Ders., Weitere Beiträge zur Kenntnis der Schlangengifte und ihrer Antitoxine. Arbeiten aus dem Pathol. Inst. Berlin 1906.
55) Morgenroth, J., und Carpi, U., Über ein Toxolecithid des Bienengiftes. Berl. klin. Wochenschr. 1906, Nr. 44.
56) Morgenroth, J., und Pane, D., Über Beobachtungen reversibler Veränderungen an Toxinen. Biochem. Zeitschr. 1906, Bd. I, Heft 4.
57) Myers, W., On the interaktion of toxin and antitoxin, illustrated by the reaktion between cobralysin and its antitoxin. Journ. of Path. and Bakteriol. (Path. Soc. of London), 1900, Vol. VI.
58) Neuberg, C., und Rosenberg, E., Lipolyse, Agglutination und Hämolyse. Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 2.
59) Noc, F., Sur quelques propriétés physiologiques des différents venins de serpents. Annal. Pasteur, 1904, Tome XVIII.
60) Ders., Propriétés bactériolytiques et anticytasiques du venin de cobra. Annal. Pasteur, 1905, Tome XIX.
61) Noguchi, H., The effects of venom upon the blood corpuscles of coldblooded animals. Univ. of Penna. Med Bull. 1903, Juli-August.

62) Noguchi, Discussion on Immunity. Brit. Med. Journ., 1904, pag. 580.
63) Ders., A study of the protective action of snake venom upon blood corpuscles. Journ. of exper. Med. 1905, Vol. VII, No. 2. (Siehe auch: Proc. of the Soc. for exper. Biol. and Med.)
64) Ders., On certain thermostabile venom activators. Ebenda, 1906, Vol. VIII, No. 1.
65) Otto, R., und Sachs, H., Über Dissociationserscheinungen bei der Toxin-Antitoxin-Verbindung. Zeitschr. für exper. Path. und Ther. 1906, Bd. III.
66) Pascucci, O., Die Zusammensetzung des Blutscheibenstromas und die Hämolyse. II. Mittlg. Die Wirkung von Blutgiften auf Membranen aus Lecithin und Cholesterin. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 1905, Bd. VI.
67) Ders., Über die Wirkung des Ricins auf Lecithin. Ebenda, 1905, Bd. VII.
68) Pröscher, F., Zur Kenntnis des Krötengiftes. Hofmeisters Beitr., 1902, Bd. I.
69) Reiss, E., Eine Beziehung des Lecithins zu Fermenten. Berl. klin. Wochenschr. 1904, Nr. 45.
70) Rogers, L., The physiological action and antidotes of Colubrine and Viperine snake venoms. Philosophical Transactious of the Royal Soc. of London, 1904, Series B, Vol. CIIIC.
71) Sachs, H., Zur Kenntnis des Kreuzspinnengiftes. Hofmeisters Beitr. 1902, Bd. II.
72) Ders., Über Differenzen der Blutbeschaffenheit in verschiedenen Lebensaltern. Centralbl. für Bakt., I. Abt. Originale, 1903, Bd. XXXIV.
73) Ders., Über die Konstitution des Tetanolysins. Berl. klin. Wochenschr. 1904.
74) Ders., Über die Bedeutung des Danysz-Dungerschen Kriteriums nebst Bemerkungen über Prototoxoide. Centralbl. für Bakt., I. Abt. Originale, 1904, Bd. XXXVII.
75) Ders., Welche Rolle spielt das Lecithin bei der Sublimathämolyse? Wien. klin. Wochenschr. 1905, Nr. 35.
76) Ders., Die Hämolysine und die cytotoxischen Sera. Lubarsch-Ostertag, Ergebnisse XI. Jahrgg. Bergmann, Wiesbaden 1907.
77) Teruuchi, Y., Die Wirkung des Pankreassaftes auf das Hämolysin des Cobragiftes und seine Verbindungen mit dem Antitoxin und Lecithin. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1907, Bd. LI.
78) Tidswell, Fr., Australian med. gazette, 1902, April (zitiert nach Lamb (36)).
79) Wendelstadt, Über die Wirkung von Glykogen auf hämolytische Vorgänge. Centralbl. für Bakteriol. I. Abt. 1903, Bd. XXXIV.
80) Woelfel, A., Identification of alcohol-soluble hemolysine in bloodserum. Journ. of inf. Diseases. 1905.

B. Die Wirkung tierischer Toxine in vivo.

Über die Untersuchung der Wirkungen tierischer Toxine in vivo ist nichts Besonderes zu sagen. Die Technik und Methodik des Vorgehens stimmt im wesentlichen mit allgemein toxikologischen Prinzipien, resp. mit den Verfahren für die Analyse der Toxine bakteriellen Ursprungs überein. Bezüglich der näheren Details kann auf die zusammenfassenden Darstellungen, welche in No. 1—5 des vorangehenden Literaturverzeichnisses zitiert sind, verwiesen werden. Es ist wohl anzunehmen, daß unter den zahlreichen giftigen Tieren sich noch manche Giftstoffe werden auffinden lassen, welche sich durch die Fähigkeit der Antikörperauslösung als echte Toxine erweisen lassen. Vorläufig ist außer denjenigen Toxinen, deren hämolytische Wirkung bereits besprochen wurde, noch für das Salamandergift die antigenartige Natur erwiesen. Phisalix[15, 16]) fand ein antitoxinbildendes Gift in der Rückenhaut des japanischen Salamanders (Sieboldia maxima). Das Gift ist leicht in Wasser und Glyzerin löslich und wird bereits durch Alkohol oder 20 Minuten langes Erhitzen

auf 60° zerstört. Durch Erhitzen auf 50° wird es abgeschwächt, wirkt aber immunisierend. Das Serum der so vorbehandelten Tiere wirkt antitoxisch, aber nicht nur gegen Salamandergift, sondern auch gegen Viper- und Aalgift.

Zu den echten tierischen Toxinen wäre schließlich noch das Gift des Aalblutes (Ichthyotoxin) zu rechnen. Dies Hämolysin des Aalserums teilt zwar im allgemeinen die Eigenschaften der Serumhämolysine höherer Tiere. Hingegen nimmt die von Mosso[9]) entdeckte Giftigkeit des Aalserums durch ihren hohen Grad doch eine exzeptionelle Stellung ein. Die Darstellung besteht in der Gewinnung des Serums aus Aalblut. Das giftige Prinzip verhält sich gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen ebenso wie die Toxine im allgemeinen (U. Mosso[10])). Die Toxinnatur ist zudem durch die zuerst H. Kossel[8]), sowie Camus und Gley[5, 6]), gelungene Erzeugung des Antitoxins erwiesen (cf. auch Tchistovitch[19])).

Im übrigen ist auch von dem Blutserum höherer Tiere eine allgemein-toxische und nekrotisierende Wirkung bekannt, und es sei in dieser Hinsicht auf die Arbeiten von Uhlenhuth[20]), Moxter[21]), sowie H. Pfeiffer[13, 14]) verwiesen. Bekanntlich tritt nach wiederholten Seruminjektionen eine ausgesprochene Überempfindlichkeit gegenüber den Wirkungen des Serums ein, derart, daß normale Blutsera, welche an und für sich unwirksam sind, bei wiederholten Injektionen starke Gifte darstellen. Das Wesen dieser zuerst von Arthus[1]), sowie v. Pirquet und Schick[17]) beobachteten Erscheinung (Überempfindlichkeit, Anaphylaxie, Serumkrankheit) ist noch wenig geklärt. In der Regel wird Pferdeserum verwandt, als Versuchstiere dienen meist Meerschweinchen oder Kaninchen. Bezüglich der näheren Details dürfte ein Hinweis auf die Arbeiten von Arthus[1]), Besredka und Steinhardt[3, 4]), Nicolle[11]), Otto[12]), v. Pirquet und Schick[17]), Rosenau und Anderson[18]), Wolff[22, 23]) genügen.

Zu erinnern wäre auch an die Vergiftungserscheinungen, welche bei Injektionen artfremden Zellmateriales beschrieben werden. Was insbesondere die Giftwirkungen artfremder Blutzellen anlangt, so wirken bei intravenöser Injektion nach Battelli[2]) nur solche Blutarten toxisch, welche von dem Serum des Empfängers gelöst werden. Nach neueren Angaben von Gottlieb und Lefmann[7]) kann man die giftigen Bestandteile durch Äther extrahieren. Die Ätherextrakte erwiesen sich als thermostabil und wirkten auch bei solchen Tierarten giftig, welche keine Hämolysine für die betreffenden Blutarten besitzen.

Schließlich seien noch die ausführlichen Studien Weichardts[25—28]) über Ermüdungstoxine erwähnt. Sie werden gewonnen aus Muskeln hochgradig ermüdeter Tiere. Das Ermüdungstoxin ist nicht dialysabel und kann durch Dialyse von den chemisch bekannten Muskelabbauprodukten getrennt werden. Durch Immunisieren entsteht das Antitoxin. Ermüdungstoxin und -antitoxin können nach Weichardt aber auch in vitro aus Eiweiß mittels physikalischer und chemischer Einflüsse erhalten werden, und zwar bei Erschütterung der Eiweißmoleküle bei gewöhnlicher Temperatur Toxin, bei höherer Temperatur Antitoxin. Letzteres wird als dialysabel und acetonlöslich beschrieben. Bei Nachprüfung und weiterem Studium werden die Arbeiten Weichardts im Original heranzuziehen sein, der die erforderlichen Methoden und Versuchsanordnungen eigens ausgearbeitet hat. Eine zusammenfassende Übersicht und Bestätigung der Versuchsergebnisse gibt Wolff-Eisner[24]).

Was noch die vielleicht hierher gehörigen Studien über Eklampsie und die supponierten Eklampsiegifte anlangt, so ist die einschlägige Literatur (Liepmann, Opitz, Veit und Scholten, Weichardt, Wormser u. a.) bei Weichardt[26]) zu ersehen.

Literatur.

1) Arthus, M., Injections répétées de sérum de cheval chez le lapin. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1904, Tome LV, pag. 817.
2) Battelli, F., Toxicité des globules rouges de différentes espèces-animales chez le lapin. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1904, Tome LVI.
3) Besrdka, A. et Steinhardt, E., De l'anaphylaxie et de l'anti-anaphylaxie vis-à-vis du sérum de cheval. Ann. de l'Inst. Pasteur 1907, Tome XXI, Nr. 2.
4) Dies., Du mécanisme de l'anti-anaphylaxie. Ann. de l'Inst. Pasteur 1907, Tome XXI, Nr. 5.
5) Camus, L. et Gley, E., Recherches sur l'action physiologique du sérum d'anguille. Arch. intern. de Pharmacodynamie 1898, Tome V.
6) Dies., Nouvelles recherches sur l'immunité contre le sérum d'anguille. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII.
7) Gottlieb, R. und Lefmann, G., Über die Giftstoffe des artfremden Blutes. Med. Klinik 1907, Nr. 15.
8) Kossel, H., Zur Kenntnis der Antitoxinwirkung. Berliner klin. Wochenschr. 1898.
9) Mosso, A., Die giftige Wirkung des Serums der Mureniden. Arch. für experim. Pathologie 1889, Bd. XXV.
10) Mosso, U., Recherches sur la nature du venin, qui se trouve dans le sang de l'anguille. Arch. ital. di Biol. 1889, Tome XII.
11) Nicolle, M., Contribution à l'étude du „phénomène d'Arthus". Ann. de l'Inst. Pasteur 1907, Tome XXI, Nr. 2.
12) Otto, R., Das Theobald Smithsche Phänomen der Serum - Überempfindlichkeit v. Leuthold-Gedenkschrift 1906, Bd. I.
13) Pfeiffer, H., Über die nekrotisierende Wirkung normaler Sera. Wiener klin Wochenschr. 1905.
14) Ders., Experimentelle Studien zur Lehre von den Autointoxikationen. Zeitschr. für Hyg. und Inf. 1906, Bd. LIV.
15) Phisalix, C., Action physiologique du venin du Salamandre. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1897, Tome IL, pag. 723.
16) Ders., Propriétés immunisantes du venin du Salamandre. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1897, Bd. XLIX, pag. 823.
17) Pirquet, C. von, und Schick, B., Die Serumkrankheit. Leipzig 1905.
18) Rosenau, J. and Anderson, F., A study of the cause of sudden death following the injektion of horse serum. Public Health and Marine-Hospital service of the United States. Hygienic Laboratory Bulletin 1906, Nr. 29. April.
19) Tchistovitch, Th., Études sur l'immunisation contre le sérum d'anguille. Ann de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII.
20) Uhlenhuth, Zur Kenntnis der giftigen Eigenschaften des Blutserums. Zeitschr. für Hyg. und Inf. 1897, Bd. XXVI.
21) Uhlenhuth und Moxter, Fortschritte der Medizin 1898.
22) Wolff, A., Untersuchungen über einige Immunittätsfragen. Berliner klinische Wochenschr. 1904, Nr. 42—44.
23) Ders., Über Eiweißimmunität und ihre Beziehung zur Serumkrankheit. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XL.
24) Wolff-Eisner, A., Über Ermüdungs- und Reduktionstoxine. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XL, Heft 5.
25) Weichardt, W., Über Ermüdungstoxine und deren Antitoxine. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 1 und 48; 1905 Nr. 26; 1906 Nr. 1 und 35.
26) Ders., Serologische Studien auf dem Gebiete der experimentellen Therapie. Habilitationsschrift, Stuttgart 1905.
27) Ders., Über Ermüdungstoxin und dessen Hemmungskörper. Med. Klinik 1906, Nr. 44.
28) Ders., Über das Eiweißabspaltungsantigen von Ermüdungstoxincharakter und dessen Antitoxin. Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLIII, Nr. 4.

Anhang.

Fermente und Antifermente.

Bei der Besprechung der Antigene tierischen Ursprungs muß auch der Fermente gedacht werden, und der Umstand, daß sie wenn auch nicht giftig im eigentlichen Sinne, so doch eine charakterisierte Wirkung ausüben, mag es rechtfertigen, sie im Anschluß an die tierischen Toxine kurz zu erwähnen. Allerdings würde eine eingehende Besprechung hier zu weit führen, da sich eine solche schließlich mit einer lehrbuchartigen Darstellung der Lehre von den Fermenten decken würde. Es sei daher auf die bekannten Werke von Oppenheimer[17]) und Effront[7]), sowie auf die Lehrbücher der physiologischen Chemie verwiesen. Die Beziehungen der Fermente zu den Toxinen betreffen einerseits die Konstitution, andererseits die Fähigkeit der Antikörperbildung. Man kann sich vorstellen, daß auch die Fermente ebenso wie die Toxine (und Komplemente) eine haptophore und eine zymophore Gruppe besitzen. Dafür sprechen Befunde, nach denen unwirksam gewordene Ferment-Modifikationen (Analoga der Toxoide) nicht nur nicht wirken, sondern sogar die Wirkung des aktiven Ferments hemmen sollen. (Korschun[13]), Bearn und Cramer[2]).) Eine weitere Analogie besteht mit der Konstitution der zytotoxischen Stoffe des Blutserums und der Lecithid bildenden Toxine. Seit Pawlows[18]) Arbeiten über Trypsin und Enterokinase sind eine Reihe von weiteren Befunden bekannt geworden, welche darauf hinweisen, daß auch Fermentwirkungen vielfach durch die Synergie zweier Komponenten zustande kommen (vgl. hierzu auch das Kapitel „die Fermente und Antifermente“ bei Jacoby[11])). Die größte Berechtigung für die Auffassung der Fermente als Antigene bietet aber die bereits in vielen Fällen gelungene Erzeugung von Antifermenten durch künstliche Immunisierung. Nach den ersten Angaben von Hildebrand[10]) und v. Dungern[6]) in dieser Richtung waren es insbesondere die Arbeiten von Morgenroth[15, 16]) und Briot[5]), welche die Frage in systematischer Weise in Angriff nahmen. Diese Autoren haben gezeigt, daß man durch systematisches Vorbehandeln von Tieren mit dem Labferment Antilab erzeugen kann*). Die besonderen Eigentümlichkeiten der Bildung von Antilab werden bei Morgenroth eingehend besprochen. Insbesondere ist zu bemerken, daß man den Antikörpergehalt des Serums nicht in der Weise wie bei der Immunisierung mit bakteriellen Toxinen hochtreiben kann. Es ist für dieses Verhalten, das sich übrigens allgemein in der Schwierigkeit der Antifermenterzeugung dokumentiert, wohl der Umstand verantwortlich zu machen, daß ein großer Teil der Fermente, wie z. B. Pepsin, Trypsin, Lab, Diastase usw. normale Produkte des tierischen Organismus darstellen und daher rasch hindernde Regulationsvorgänge in Betracht kommen, welche die Hochtreibung der Immunisierung oder letztere überhaupt vereiteln, (cfr. Morgenroth[15]), Sachs[19])). Da aber anzunehmen ist, daß die Fermente verschiedener Tierspezies gewisse Differenzen aufweisen und diese um so größer werden, je weiter der Abstand in der Tierreihe ist, so kann man im allgemeinen eine um so größere Aussicht auf das Gelingen der Immunisierung haben, je weniger die zur Immunisierung benutzte Tierart mit derjenigen verwandt

---

*) Auch normale Sera besitzen bereits Antilab. Mit dem Antilab des Pferdeserums beschäftigt sich eingehend eine Arbeit von Korschun[12]).

ist, von welcher das Ferment stammt. So gelang SACHS[19]) die Erzeugung von Antipepsin bei Gänsen, während sie bei Hunden und Ziegen fehlschlug. Die Wahl der Tierart wird also bei der Immunisierung mit Fermenten unter Umständen von besonderer Bedeutung sein. Von den immunisatorisch gewonnenen Antifermenten seien außer den schon erwähnten Arbeiten noch einige angeführt: Antityrosinase GESSARDT[8])) Antiurease, (MOLL[14])), Antitrypsin (ACHALME[1]), Antifibrinferment (BORDET und GEUGOU[4])), Antilaktase (SCHÜTZE[21])), Antisteapsin (SCHÜTZE[20])), Antilakkase (GESSARD[9])) und viele andere. Auch über Antiantifermente (WENDELSTADT[22]), KORSCHUN[12])) ist berichtet worden. Von einer ausführlichen Behandlung soll hier abgesehen werden. Es sei nur noch auf die Beobachtungen von BEITZKE und NEUBERG[3]) hingewiesen, nach denen die Antifermente, welche im Serum des Kaninchens nach Vorbehandeln mit Emulsin auftreten, die Fähigkeit besitzen, die Spaltungsprodukte (Glukose und Galaktose), welche durch das Ferment aus Laktose gebildet werden, wieder zu dem Ausgangsprodukt zu vereinigen. Es würde danach also das Antiferment umgekehrt (synthetisch) wirken, wie das Ferment.

Literatur.

1) ACHALME, P., Recherches sur les propriétés pathogénes de la trypsine et le pouvoir antitryptique du sérum des cobayes neufs et immunisés. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV.
2) BEARN, A. R. and CRAMER, W., On Zymoids. Biochemical Journal 1907, Vol. II, Nr. 4.
3) BEITZKE und NEUBERG, Zur Kenntnis der Antifermente. Verhandlungen der Deutschen patholog. Gesellschaft 1905. Ref. im Chem. Centralbl. 1905, Bd. I, pag. 943, cf. auch Virchows Archiv 1906, Bd. CLXXXIII.
4) BORDET, J. et GENGOU, O., Recherches sur la coagulation du sang et les sérums anticoagulants. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV.
5) BRIOT, Thèse de Paris 1900.
6) DUNGERN, E. VON, Centralblatt für Bakteriologie 1898. I. Abteilung. Bd. XXIV. (Autoreferat.)
7) EFFRONT, Les enzymes et leurs applications. Paris 1899.
8) GESSARD, C., Études sur la tyrosynase. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV.
9) Ders., Antilaccase. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1903, Tome LV, pag. 227.
10) HILDEBRANDT, H., Weiteres über hydrolytische Fermente, deren Schicksal und Wirkungen, sowie über Fermentfestigkeit und Hemmung der Fermentationen im Organismus. Virchows Archiv 1893, Bd. CXXXI.
11) JAKOBY, M., Immunität und Disposition und ihre experimentellen Grundlagen. Wiesbaden 1906.
12) KORSCHUN, Über Lab und Antilab. Zeitschr. für physiol. Chemie 1902, Bd. XXXVI, Heft 2/3.
13) Ders., Sind im Labmolekül mehrere funktionierende Gruppen anzunehmen. Ebenda 1903. Bd. XXXVII, Heft 4.
14) MOLL, L., Über die Antiurease. Hofmeisters Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 1902, Bd. II.
15) MORGENROTH, J., Über den Antikörper des Labenzyms. Centralbl. für Bakt. 1899, Bd. XXVI, I. Abt.
16) Ders., Zur Kenntnis der Labenzyme und ihre Antikörper. Ebenda 1900, Bd. XXVII.
17) OPPENHEIMER, C., Die Fermente und ihre Wirkungen, II. Auflage. Leipzig 1903.
18) PAWLOW, J. P., Das Experiment als zeitgemäße und einheitliche Methode medizinischer Forschung. Dargestellt am Beispiel der Verdauungslehre. Wiesbaden 1900.
19) SACHS, H., Über Antipepsin. Fortschritte der Medizin 1902, Bd. XX.
20) SCHÜTZE, A., Über einen Antikörper gegen Steapsinsolution. Deutsche med. Wochenschr. 1904.
21) Ders., Über Antilaktase. Zeitschr. für Hyg. 1905, Bd. XLVIII.
22) WENDELSTADT, Über einen Antikörper gegen Blutegelextrakt. Arch. internat. de Pharmacodynamie et de Therapie, Vol. IX.

II. Tierische Zellen als Antigene.

Alle Zellen wirken als Antigene, d. h. sie bewirken im fremdartigen Organismus die Bildung von Antikörpern, cytotropen Stoffen, welche bisher als Agglutinine, Amboceptoren oder Opsonine (cytotrope Stoffe sensu striktiori) bekannt sind. Unter den Zellen tierischen Ursprungs beanspruchen die roten Blutkörperchen das Hauptinteresse. Sie werden am meisten in der Immunitätsforschung herangezogen, weil sie ein Zellmaterial darstellen, das einerseits leicht zu gewinnen ist und ein exaktes quantitatives Arbeiten gestattet, andererseits die Einwirkung der Antikörper im Falle der cytotoxischen Wirkung durch den Vorgang der Hämolyse besonders leicht zu beurteilen erlaubt.

Was die Blutentnahme anlangt, so ist es bei größeren Tieren (Pferd, Ziege, Hammel etc.) äußerst einfach, durch Einstechen einer Kanüle in die Jugularvene hinreichende Blutmengen zu erhalten, ohne die Tiere zu schädigen. Bei kleineren Tieren muß man zur Gewinnung größerer Blutmengen zur Entblutung schreiten, die im Frankfurter Institut für experimentelle Therapie*) in der Weise ausgeführt wird, daß nach Abpräparieren der Haut der Schenkelbeuge die Femoralgefäße gleichzeitig scharf durchschnitten werden. Bei noch kleineren Tieren (Mäusen etc.) kommt auch Blutentnahme durch Dekapitieren in Betracht. Für geringere Blutmengen genügt bei Kaninchen die Entnahme aus der Randvene des Ohres, welche durch einen kleinen Einschnitt mit der Scheere geöffnet wird (dabei wird zweckmäßig vorher eine Hyperämie des Ohres erzeugt). Bei Vögeln werden geringere Blutmengen aus der großen Flügelvene, bei Gänsen und Enten auch durch einen Einschnitt in die Schwimmhaut erhalten. Bei kleineren Tieren kann man geringere Blutmengen, ohne die Tiere zu töten, auch aus dem Herzen gewinnen. Das Verfahren besteht in dem Einstechen einer Kanüle durch die Brustwand an der Stelle des stärksten Herzstoßes in einen Ventrikel und ist zuerst von Raybaud und Hawthorn[38]), Camus[6]), Nicolle und Ducloux[36]) beschrieben worden (cf. auch Morgenroth[31]). Natürlich kann auch die Blutentnahme aus der Karotis geübt werden; man braucht aber zu diesem immerhin etwas umständlichen Verfahren nur dann zu schreiten, wenn besondere Gründe (Asepsis, maximale Ausbeute) vorliegen.

Nach der Blutentnahme muß das Blut zwecks Gewinnung der Erythrocyten sofort defibriniert werden. Dies geschieht entweder durch Schlagen des Blutes mit einem Holzstäbchen von rauher Oberfläche oder durch Schütteln des Blutes in Flaschen, in denen sich Glasperlen oder Eisendrehspäne befinden. Das defibrinierte Blut wird zentrifugiert, das Serum mit einer Pipette abgehoben und das Blutsediment mehrmals mit 0,85 % Kochsalzlösung gewaschen und schließlich auf das ursprüngliche Blutvolumen aufgefüllt. Benutzt man das Blut für hämolytische Versuche, in denen man meist mit 5 % Aufschwemmungen arbeitet, und wird nicht beabsichtigt, gleichzeitig auch das Serum zu erhalten, so kann man das defibrinierte Blut direkt mit Kochsalzlösung 10—20fach verdünnen. Es genügt dann nochmaliges Waschen des abzentrifugierten Sediments, um hinreichend serumfreie Aufschwemmungen zu erhalten. Das unverdünnte Blut, resp. die Aufschwemmungen können bei sorgfältigem Aufbewahren auf Eis 3—4 Tage lang verwandt werden.

---

*) Vergl. die Beschreibung der Methodik bei Morgenroth[30]).

Da die Antikörper auslösenden Bestandteile der roten Blutkörperchen, die Rezeptoren, in den Stromata gelegen sind, so ist die Darstellung der Stromata von Bedeutung. Besonders ist man auf die Benutzung der Stromata in vielen Fällen bei Bindungsversuchen angewiesen, wenn man die Hämolyse vermeiden will. Ohne hier auf die bei physiologisch-chemischen Arbeiten üblichen Methoden der Stromata-Gewinnung näher einzugehen, sei nur auf einige Verfahren verwiesen, welche speziell für Untersuchungen, welche Fragen der Immunitätsforschung betreffen, angegeben wurden.

Sachs[41]) ist folgendermaßen vorgegangen: Das Blut (serumfrei und auf das ursprüngliche Volumen mit 0,85 %iger Kochsalzlösung aufgefüllt) wird im Wasserbade bei 50—60° (Rinderblut bei 60°, Kaninchen- und Meerschweinchenblut bei ca. 54°) eine halbe Stunde lang erhitzt, bis bei dunkelrotbrauner Farbe eben das Lackfarbenwerden beginnt. Nun wird mit Wasser 6—10fach verdünnt, gut durchgeschüttelt und so viel Kochsalz zugefügt, daß der Gesamtgehalt 1 % beträgt. Die Stromata werden als gelblich-weiße Masse erhalten und durch Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung von anhaftendem Hämoglobin gereinigt.

Bulloch[5]) gibt folgende Methoden an: Die serumfrei gewaschenen Blutkörperchensedimente werden mit 8—10 Teilen Wasser versetzt und $^1/_5$ — $^1/_6$ des Gesamtvolumens Äther hinzugefügt. Die Mischung wird im Scheidetrichter gut durchgeschüttelt, worauf die Stromata mit dem Äther in die Höhe gehen. Die untenstehende Hämoglobinlösung wird abgelassen und die obere Stromataätherschicht mit Kochsalzlösung gemischt und zentrifugiert. Die Stromata sinken dabei als gelblich-weiße Masse zu Boden und werden durch Waschen mit 0,85 %iger Kochsalzlösung gereinigt.

Dautwitz und Landsteiner[7]) schütteln das Blut zur Stromatagewinnung mit ca. $^1/_3$ Volumen Toluol und lassen die Mischung 1 bis 3 Tage lang im Scheidetrichter. Sodann wird die unten abgesetzte dunkelrote Schicht abgelassen und das obere rosarote Magma durch wiederholtes Schütteln mit Wasser vom Hämoglobin gereinigt. Nun wird mit einem Gemisch von 2 Teilen Äther und 1 Teil Alkohol durchgeschüttelt, wobei die Stromata als braune Flocken zu Boden sinken.

Die nach diesen Verfahren gewonnenen Stromata haben die antigenen Eigenschaften bewahrt; sie binden die Amboceptoren und bewirken, in den fremdartigen Organismus eingeführt, die Bildung von Amboceptoren. Daß die Stromata den Amboceptor auslösenden Bestandteil der roten Blutzellen darstellen, ist übrigens zuerst von Bordet[4]) und Noef[37]) festgestellt worden. Die Stromata wurden von ihnen erhalten durch Auflösen des Blutes in Wasser und Zentrifugieren nach dem Besalzen der lackfarbenen Lösung. Indes scheint ein Teil der Receptoren doch in den lackfarbenen Lösungen zurückzubleiben; dafür sprechen wenigstens die Befunde von Muir und Fergusson[33]), welche die Bindung der Amboceptoren betreffen, und die Immunisierungsversuche von Klein[19]). Ob dabei etwa die technische Schwierigkeit, die Stromata vollständig zu entfernen, verantwortlich zu machen ist, muß dahingestellt bleiben. Jedenfalls werden aber auch die Receptoren unter Umständen leicht frei werden können. So kann man durch Immunisierung auch in den tierischen Flüssigkeiten des Organismus dieselben Receptoren, welche in den roten Blutkörperchen vorhanden sind, nachweisen. Von Dungern[11]), Tchistovitch[47]), Morgenroth[29]) gelang

es, mit zellenfreiem Blutserum, Schattenfroh[46]) mit Harn, v. Dungern[10]) mit Milch hämolytische Amboceptoren zu erzeugen. Andererseits scheinen aber die Receptoren doch ziemlich fest an den Stromata zu haften. So berichtet Jacoby[18]), daß es ihm weder durch Auspressen nach dem Buchnerschen Verfahren noch durch die Einwirkung verschiedener Fermente gelang, aus dem Stroma gelöste Receptoren zu gewinnen.

Die detaillierte Besprechung des Nachweises der Receptoren soll der Darstellung der Hämolysine und Cytotoxine des Blutserums vorbehalten bleiben. Denn der Rezeptor der Zellen übt keine direkt wahrnehmbare Wirkung aus; seine Anwesenheit kann nur mittelst Antikörperreaktionen erkannt werden, der Nachweis wird also stets indirekt durch die Funktion des Antikörpers (Hämolysin, Agglutinin) geführt. Prinzipiell handelt es sich stets um zwei Methoden:

1. Den Nachweis des Receptors durch seine immunisatorische Fähigkeit.

2. Den Nachweis des Receptors durch seine Antikörper bindende Funktion.

Die erstere Methode ist die feinere, und es kann daher nicht wunder nehmen, wenn man gelegentlich ein Material findet, welches zwar immunisierend wirkt, aber nicht imstande ist, den entsprechenden Antikörper zu binden. Besonders sei auf die Untersuchungen von Friedberger und Dorner[13]) verwiesen, aus denen hervorgeht, daß bereits die minimalsten Blutmengen Hämolysin auslösend wirken können, welche beim Bindungsversuch wohl sicherlich dem Nachweis entgehen. Für die Identität der hämolysinbindenden und bildenden Receptoren spricht jedenfalls das durch von Dungern[12]) eingeführte Verfahren. Digeriert man Blut mit einem reichlichen Überschuß von Amboceptor, so daß die Bindungsaffinität der Erythrocyten gesättigt ist, so hat es auch die Fähigkeit, Amboceptoren zu erzeugen, eingebüßt. Ferner hat sich übereinstimmend zwischen Empfindlichkeit und Bindungsvermögen der roten Blutkörperchen gegenüber Toxinen und Antikörpern ein enger Parallelismus ergeben (cf. hierzu Sachs[41, 43]) und Jacory[17, 18]).

Was die Resistenz der Blutkörperchenreceptoren anlangt, so benutzten Muir und Fergusson[33]) mit Wasser lackfarben gemachte Blutlösungen und stellten durch Bindungsversuche fest, daß durch Erhitzen auf 65° nur ein geringer Teil der amboceptorbindenden Funktion verloren geht und auch nach dem Erhitzen auf 100° noch eine erhebliche Quote dieser Funktion erhalten bleibt. Andererseits geben Bang und Forssmann[2]) an, daß durch 2 Minuten langes Erhitzen auf 100° die Blutkörperchenstromata bereits ihre amboceptorbindende Funktion ganz und gar einbüßen. In der Versuchsanordnung besteht aber insofern ein Unterschied, als Muir und Fergusson die durch Vermittelung des Amboceptors gebundene Komplementmenge bestimmten, während in den Versuchen von Bang und Forssmann die Bindung des Amboceptors an sich ermittelt wurde. Vielleicht ist diese Differenz im Vorgehen nicht gleichgiltig, worauf wir bei Besprechung der Hämolysine werden zurückkommen müssen (cf. die Ausführungen von Sachs[44]). Die Schädigung der amboceptorauslösenden Fähigkeit der roten Blutkörperchen durch Hitze hat Doepner[8]) an getrocknetem Blut geprüft. Nach seinen Befunden verursacht einstündiges Erhitzen auf 60° eine Schädigung der Blutkörperchenantigene, Erhitzen auf 120° eine erhebliche Einbuße an antigener Funktion. Bang und Forssmann geben an, daß die 2 Minuten lang gekochten Stromataaufschwemmungen noch die Auslösung von Am-

boceptoren bedingen, obwohl sie, wie schon erwähnt, nicht Amboceptor bindend wirken. Es erscheint aber verfrüht, daraus einen Schluß auf die Verschiedenheit der immunisierenden und bindenden Zellbestandteile zu ziehen. Einmal ist die Antikörperbildung eine feinere Reaktion, als der Bindungsversuch, dann aber können durch das Erhitzen der Stromata eine Verminderung der Receptorenaffinität oder Veränderungen physikalischer Art bedingt sein, welche dem Amboceptor das Erreichen des Receptors erschweren. Gleichwohl könnten aber die Receptoren im Organismus geeignetere Bedingungen finden, um ihre antigene Funktion ausüben zu können. Nach Dubois [9]) sind Blutkörperchen (Hühnerblut), welche auf 115° erhitzt sind, nicht mehr imstande Hämolysine zu erzeugen, bewirken aber noch die Bildung von Agglutininen. Das würde für eine Verschiedenheit der agglutinogenen und lysinogenen Substanz in den roten Blutzellen sprechen. Frouin [14]) gibt an, daß Hundeblut, welches mit Aceton gewaschen und getrocknet ist, ausschließlich Agglutinine erzeugt, während der Acetonextrakt nach dem Verdampfen im Vakuum einen Rückstand liefert, welcher nur Hämolysine erzeugt.

Eine Frage von hohem theoretischen Interesse ist es, welcher Art die antigene Substanz der Zellen ist. Eine einwandsfreie Methode, dieselbe aus dem Stroma zu isolieren und quantitativ zu gewinnen, ist aber nicht bekannt. Wohl aber existieren in der Literatur eine Reihe von Angaben über die Extraktion des Receptors, die der Nachprüfung und weiterer Analyse wert erscheinen. Levene [24]) gibt an, mit den Produkten der tryptischen Verdauung, sowie mit Natriumkarbonatextrakten aus Hundeblutstroma Hämolysine erzeugt zu haben. Nach Guerrini [15]) erhält man sogar bei Verwendung der nach Hammersten aus Hundeblut dargestellten Nuclenproteide leichter Hämolysine, als bei Verwendung von nativem Blut. Auch Bierry und Pettit [3]) haben Cytotoxine durch Injektion von Nukleoproteiden aus Leber und Nieren erzeugt.

Die vielfach hervortretende Neigung, den Lipoiden der roten Blutkörperchen eine wesentliche Rolle bei der Hämolyse zuzusprechen, hat zu zahlreichen Versuchen geführt, welche den Nachweis bezwecken, daß die Zellipoide diejenigen Stoffe sind, welche Antikörper bildend und bindend wirken. Methodisch sind dabei im wesentlichen die fettlösenden Solventien zur Extraktion benutzt worden. Landsteiner und v. Eisler [21]) stellten Extrakte aus roten Blutkörperchen durch Behandeln mit Äther und Petroläther her. Die nach Verdampfen der Extrakte verbleibenden Rückstände wurden auf antihämolytische Wirkung gegenüber normalen Hämolysinen geprüft. Landsteiner und v. Eisler beziehen die beobachteten Hemmungswirkungen auf eine Bindung des Amboceptors. Die Spezifität war allerdings nur beschränkt wahrzunehmen, und da die bindende Fähigkeit der Extrakte, verglichen mit entsprechenden Mengen intakter Zellen, nur gering war, neigen die Autoren zu der Auffassung, daß die bindenden Substanzen Verbindungen der fettähnlichen Stoffe mit den Proteinen sind*). Nach Landsteiner und von Eisler binden auch Stromata, welche durch Auflösen des Blutes mittels Äther hergestellt sind, weniger Hämolysin als solche, welche durch Wasserhämolyse erhalten werden. Muir und Fergusson [33]) geben an, daß Äther das Bindungsvermögen der roten Blutkörperchen nicht schädigt; allerdings wurde in ihren Versuchen Hämolyse durch Äther bewirkt und

*) Verwiesen sei auch in dieser Hinsicht auf die Versuche von Lazar [22, 23]), welche den Sitz der Agglutinin bindenden Stoffe des Taubenblutes betreffen.

sodann letzterer allein durch Verdampfen entfernt. Bulloch [5]) extrahierte Stromata 6 Stunden lang im Soxhlet und fand, daß weder das so behandelte Stroma noch der Ätherextrakt imstande war, Hämolysine zu erzeugen. Bulloch schließt daraus, daß die Receptoren durch längere Einwirkung des Äthers zerstört werden. Im Gegensatz dazu stehen die Angaben von Bang und Forssmann [2]). Diese Autoren geben an, daß der Ätherextrakt aus roten Blutkörperchen die immunisierende Substanz enthält. Allerdings ist die immunisierende Wirkung des Ätherextraktes, wenn man die Protokolle übersieht, doch so gering, daß man mit Berücksichtigung der Tatsache, daß die mit Äther extrahierten roten Blutkörperchen nicht mehr immunisierend (übrigens auch nicht bindend) wirkten, auch aus den Versuchen von Bang und Forssmann auf eine erhebliche Zerstörung der Receptoren durch den Äther schließen darf. Die Methodik, welche Bang und Forssmann übten, ist folgende: 1 Teil Blutkörperchenbrei (serumfrei gewaschen) wird mit 2 Teilen Äther im Schüttelapparat 2 Stunden geschüttelt, der Äther entfernt, durch neuen ersetzt und der Vorgang 4—6mal wiederholt. Die vereinigten Ätherextrakte (ca. 8 l) werden auf 2 l eingeengt. Zur Injektion verwenden die Autoren 50—100 ccm des konzentrierten Ätherextraktes, deren Rückstand in 10—15 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen wurde. Das Blut soll von eben geschlachteten Tieren stammen und das Ätherextrakt frisch sein. Wurde der Rückstand des Ätherextraktes mit Aceton extrahiert, so erwies sich nur der acetonunlösliche Teil zur Hämolysinbildung geeignet. Übrigens war der in Aceton unlösliche Teil nunmehr in Äther sehr wenig löslich, und die antigene Quote war ausschließlich im Acetonrückstand zurückgeblieben. Weiter wird angegeben, daß die antigene Substanz aus dem Acetonrückstand durch kochendes, aber nicht durch kaltes Benzol extrahiert wird. Aus dem Rückstand der Benzollösung war die antigene Substanz in Alkohol, auch im kochenden nicht löslich. Nach Bang und Forssmann bewirken die Ätherextrakte aus den roten Blutkörperchen ferner eine Bindung des Hämolysins, wobei aber nicht der Amboceptor, sondern das Komplement gebunden wird. Diese neutralisierende Wirkung ging bei Extraktion mit Benzol und Aceton in diese Lösungsmittel über, verhielt sich also different von der antigenen Wirkung. Ein Schluß auf eine Differenz zwischen Antikörper bildender und bindender Substanz kann daraus natürlich nicht gezogen werden, da in den Versuchen von Bang und Forssmann der Antikörper (Amboceptor) von dem Ätherextrakt gar nicht gebunden wurde. Da aber andererseits eine Amboceptorbindung weder durch das Ätherextrakt noch durch die extrahierten Blutzellen, resp. Stromata nachzuweisen war, nehmen die Autoren an, daß die amboceptorbindende Substanz bei der Ätherextraktion zerstört oder doch derartig verändert wird, daß sie nicht mehr den Amboceptor zu fixieren vermag. Sie schließen daher, daß immunisierende und bindende Substanz different sind. So interessant die von Bang und Forssmann aufgeworfenen Fragen sind, so dürfte doch eine derartige Schlußfolgerung, wie ich an anderer Stelle ausgeführt habe [44]), mit großer Vorsicht aufzunehmen sein. Ähnliche Bedenken sind auch von Dautwitz und Landsteiner [7]) geäußert worden, deren Untersuchungen zu einem gewissen Teil die mannigfach vorhandenen Widersprüche aufklären. Auch diese Autoren haben mit Ätherextrakten aus roten Blutkörperchen Hämolysine erzeugen können und bestätigen auch die Fällbarkeit der lysinogenen Substanz durch Aceton. Trotzdem warnen Dautwitz und Landsteiner selbst, daraus Schlüsse auf die

Lipoidnatur der antigenen Stoffe zu ziehen. Einerseits scheinen ihnen die Löslichkeitsverhältnisse nicht dazu zu berechtigen, andererseits weisen auch sie daraufhin, daß bei den minimalen Blutmengen, welche zur Hämolysinerzeugung bereits genügen, die Frage, ob eine echte Ätherlöslichkeit vorliegt, recht schwer zu entscheiden ist. Die Versuchsergebnisse von Dautwitz und Landsteiner stehen insofern zu denjenigen von Bang und Forssmann im Widerspruch, als die Ätherextrakte immunisierend schwächer oder nicht stärker wirkten, als die extrahierten Stromata resp. Blutzellen.

Dautwitz und Landsteiner bestätigen ferner die früher von Landsteiner und v. Eisler erhobenen Befunde, daß der Ätherextrakt aus Blutkörperchen Amboceptor bindend wirkt. Die Spezifität ist aber nicht immer deutlich. Der durch Aceton fällbare Teil des Extraktes übt eine stärkere Wirkung aus, als die Acetonlösung. Der Widerspruch zu den Angaben von Bang und Forssmann wird darauf zurückgeführt, daß die Amboceptor bindende Wirkung des Extraktes nur dann in Erscheinung tritt, wenn es sich um normale Hämolysine handelt. Wurden dagegen Immunhämolysine herangezogen, so erstreckte sich die hemmende Wirkung des Ätherextraktes nicht auf den Amboceptor, sondern auf das Komplement. Die das Komplement neutralisierende Substanz war nun ebenso, wie es Bang und Forssmann angeben, in Aceton löslich.

Nach alledem dürfte es heute nicht tunlich sein, über die Natur der Receptoren der roten Blutkörperchen etwas Endgültiges auszusagen. Mögen auch die Zelllipoide bei der Hämolysinbildung und -Bindung beteiligt sein, so scheint doch aus den Versuchsergebnissen hervorzugehen, daß sie nicht das alleinige Moment darstellen, und man wird bei dem methodischen Vorgehen die mehrfach erwähnten Schwierigkeiten der Beurteilung berücksichtigen müssen. Für die Gewinnung hämolytischer Sera kommt natürlich als einfachste und zuverlässigste Methode nur die Verwendung der nativen serumfrei gewaschenen Blutzellen als Antigen in Betracht.

Es erübrigt noch, auf die übrigen tierischen Zellen, welche alle durch die Fähigkeit der Cytotoxinauslösung als Antigene charakterisiert sind, kurz einzugehen. Im allgemeinen gelten hier dieselben Prinzipien, wie sie bei Besprechung der roten Blutkörperchen erörtert wurden. Nur ist die Gewinnung des Materials und das Kriterium der Intaktheit komplizierter. Am einfachsten liegen die Verhältnisse bei denjenigen Zellen, welche eine Eigenbewegung aufweisen. So benutzte v. Dungern[11], der als erster mit Epithelzellen immunisierte, Flimmerepithel als Antigen. Die Epithelzellen werden von der Trachea des Rindes ohne Beimengung von Blut herausgeschabt und in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Solche Suspensionen werden zur Immunisierung und zur Prüfung der Immunsera (Epitheliotoxine) benutzt. Die Prüfung geschieht entweder in vitro oder in vivo (analog der Pfeifferschen Reaktion bei Cholera). Die Veränderungen, resp. die Abtötung der Epithelzellen werden im hängenden Tropfen mikroskopisch beobachtet und äußern sich im Stillstand der Wimperbewegung, Formveränderungen, Vakuolenbildung und schließlichem Zerfall. In entsprechender Weise werden Spermatozoen als Antigene benutzt. Man gewinnt sie leicht aus dem Nebenhoden und untersucht die Einwirkung der Immunkörper (Spermotoxine) entweder in vivo, wie es zuerst von Seiten Landsteiners[20] geschehen ist, oder durch Mischen der Suspension mit dem Serum in vitro (Metchnikoff[28]). Die Beobachtung geschieht im hängenden Tropfen. Auch die Anfertigung

fixierter und gefärbter mikroskopischer Präparate kann von Nutzen sein. So gibt London[25]) an, daß die Spermatozoen unter dem Einfluß inaktivierten spermatoxischen Serums derart verändert werden, daß die normalerweise sich stark färbende Haube ihre Affinität zu Farbstoffen einbüßt, während sich der sonst nur schwach färbende Spermakopt mit entsprechenden Farbstoffen (Safranin) besonders intensiv färbt.

Allgemein ist zu bemerken, daß die Receptoren der Zellen keine Differenzierung im morphologischen Sinne aufweisen. Die gleichen Receptoren können sich also an mehreren oder allen Zelltypen ein und derselben Tierart vorfinden. Die ersten diesbezüglichen Angaben hat v. Dungern[10]) gemacht, der eine Receptorengemeinschaft zwischen Epithelzellen und Blutzellen feststellte. Receptoren der Epithelzellen finden sich nach v. Dungern auch in der Milch. Moxter[32]) hat Receptorengemeinschaft zwischen Spermatozoen und roten Blutkörperchen beobachtet. Auch Netzhautelemente können nach Hess und Römer[16]) leicht in geeigneter Form verwandt werden. Die Netzhäute werden schonend von der Unterlage präpariert und vorsichtig in physiologischer Kochsalzlösung oder Ringerscher Lösung aufgeschüttelt. Die Aufschwemmungen dienen zu Injektionen, resp. zur mikroskopischen Untersuchung im hängenden Tropfen.

Was die übrigen tierischen Zellen anlangt, so können die Leukocyten aus dem Blute als Zwischenschicht zwischen roten Blutkörperchen und Plasma beim Zentrifugieren oder durch Injektion von Aleuronat etc. in Exsudaten isoliert erhalten werden. Zur Gewinnung leukotoxischer Sera werden auch vielfach Emulsionen von Milz, Lymphdrüsen, Knochenmark verwandt. Auf das Verfahren der Herstellung von Organemulsionen ist man auch bei den übrigen tierischen Zellen angewiesen. Die frisch entnommenen Organe werden zerkleinert und in physiologischer Kochsalzlösung zu möglichst feinen Emulsionen verrieben. Die gröberen Partikel werden dann zweckmäßig durch Drahtnetzsiebe zurückgehalten. Verwiesen sei auch auf die von Wiechowski[49]) angegebene Methode, die sich auch für Untersuchungen auf dem Immunitätsgebiete eignen dürfte. Die mit physiologischer Kochsalzlösung blutfrei gespülten Organe werden durch Stampfen und Reiben (ev. auch Fleischhackmaschine oder Kosselscher Apparat) verkleinert und durch Kupferdrahtnetze gesiebt. Der Zellbrei wird sodann, mit etwas Toluol versetzt, in dünner Schicht auf Glasplatten ausgestrichen und bei nicht zu hoher Temperatur (30 bis 37°) und guter Ventilation getrocknet. Die getrockneten Organe dürften sich gut konservieren lassen. Auf die weitere Zertrümmerung dieses getrockneten Materials werden wir im nächsten Abschnitte (Tierisches Eiweiß als Antigen) zurückkommen müssen.

Es kann hier nicht auf die tierischen Zellen als Antigene der Cytotoxine im einzelnen eingegangen werden; es mag genügen, auf die auch in literarischer Hinsicht gut orientierenden Arbeiten von London[26]), Lüdke[27]), Römer[40]), Sachs[42]), Sata[45]), Théohari und Babes[48]) zu verweisen. Was die Verwendung von Karzinomzellen zu Immunitätsstudien anlangt, so kommen im allgemeinen die gleichen Prinzipien, wie sie für die Verarbeitung von Organen gelten, in Betracht. Das Karzinommaterial wird zu einer möglichst feinen Suspension zerstampft. Betreffs der näheren Details bei der experimentellen Erforschung der Geschwülste sei auf die zusammenfassende Darstellung von Apolant[1]) verwiesen.

Was nun den Nachweis der Zellen und ihrer Schädigungen durch Antikörper (Cytotoxine) anlangt, so ist man in allen den Fällen, in denen

eine makroskopische oder mikroskopische Untersuchung der isolierten Zellen nicht angängig ist, auf die Analyse etwaiger pathologisch-anatomischer Veräederungen der entsprechenden Organe unter dem Einfluß der Zellnoxe angewiesen. Ist diese Möglichkeit der Beobachtung, welche zudem in bezug auf die Schlußfolgerungen oft recht unzuverlässig erscheint, gleichfalls ausgeschlossen, so können indirekte Kriterien für das Vorhandensein von Zell- oder Organ-Schädigungen in Frage kommen. Als solche kommen zunächst die klinischen Erscheinungen in Betracht. Dann aber gibt es auch einige Methoden, welche den Reagenzglasversuch gestatten.

An erster Stelle sei hier die von M. Neisser und Wechsberg[34, 35]) angegebene „bioskopische" Methode erwähnt. Das Verfahren gründet sich auf die zuerst von Ehrlich beobachtete Erscheinung, daß lebende Zellen Methylenblau reduzieren: Neisser und Wechsberg, welche zunächst mit Leukocyten arbeiteten, haben den Beweis erbracht, daß die Reduktion abhängig ist von der Anwesenheit lebender Leukocyten. Sind die Leukocyten geschädigt, resp. abgetötet, so bleibt die Reduktion aus. Man verfährt nach Neisser und Wechsberg folgendermaßen: Als Indikator dienen 2 Tropfen einer dünnen Methylenblaulösung. Dieselbe wird jedesmal frisch aus einer Stammlösung (1,0 Methylenblau, 20,0 Alkohol absol., 29,0 Aqua destillata) durch Verdünnen mit 49 Teilen physiologischer Kochsalzlösung bereitet. Zunächst wird die Dosis minima reducens der Zellemulsion bestimmt. Absteigende Mengen der letzteren (Gesamtvolumen 2,0) werden mit 2 Tropfen Methylenblaulösung versetzt, die Röhrchen durch Überschichten mit Paraffinum liquidum von der Luft abgeschlossen und 2 Stunden im Thermostaten belassen. Sodann werden zu der doppelten Menge der Dosis minima reducens absteigende Mengen des auf cytotoxischen Charakter zu untersuchenden Agens (cytotoxisches Serum etc.) zugefügt, überall auf 2 ccm aufgefüllt und die Gemische $1^1/_2$ Stunde im Thermostaten gelassen. Dann folgt Zusatz von 2 Tropfen Methylenblaulösung, Überschichten mit Paraffin und zweistündiger Aufenthalt im Brutschrank. Neisser und Wechsberg haben die Methode mit Erfolg auch für die Untersuchung überlebender Spermatozoen, Nieren- und Pankreaszellen erprobt. Sie weisen gleichzeitig auch auf die Grenzen der Methode hin, die dadurch gegeben sind, „daß gewisse Zellen Stoffe enthalten können, welche an sich reduzierend wirken, ohne Rücksicht darauf, ob die Zellen als solche noch leben oder nicht". Die notwendigen Kontrollen sind also niemals zu unterlassen.

So gibt Ricketts[39]) an, daß bei der Reduktion des Methylenblaus durch Nervengewebe die lebende Zelle nicht wesentlich ist. Seine Versuche, die Schädigung von Nervengewebe durch neurotoxische Immunisera mittels der bioskopischen Methode zu erkennen, scheiterten überdies an dem Umstande, daß bereits durch Zusatz von normalem Serum die reduzierende Wirkung des Nervengewebes gesteigert wurde. Betreffs der weiteren Versuche Ricketts, nach denen die Reduktion durch die Gewebsemulsion durch das Zusammenwirken zweier Substanzen erfolgt, sei auf die Originalarbeit verwiesen.

Schließlich kommt zum Nachweis von Zellen, resp. Zellreceptoren vermittels ihrer Antikörper (Amboceptoren) noch die indirekte Methode der Komplementablenkung in Betracht. Ebenso, wie man Amboceptoren, wenn das entsprechende Antigen gegeben ist, nachweisen kann, indem der Amboceptor nach seiner Vereinigung mit dem Antigen Komplemente bindet, kann man auch die Fragestellung umkehren und mittels eines

Amboceptors, dessen Herkunft man kennt, den entsprechenden Receptor resp. die entsprechende Zelle identifizieren. Das Verfahren wird von mir bei der Besprechung der Hämolysine im II. Hauptteile dieses Handbuches eingehend erörtert werden.

Literatur.

1) Apolant, H., Die experimentelle Erforschung der Geschwülste. Kolle-Wassermanns Handbuch der pathogenen Mikroorganismen 1906, I. Ergänzungsbd. Heft 2.
2) Bang, J. und Forssmann, J., Untersuchungen über die Hämolysinbildung. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1906, Bd. VIII.
3) Bierry et Pettit, Sur le pouvoir cytotoxique de certains sérums consécutif à l'injection de nucléo - protéides. Compt. rend. de la Soc. de Biologie 1904, Tome LVI.
4) Bordet, J., Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, Tome XIV.
5) Bulloch, W., The influence of salts on the action of immune haemolysins. Transactions of the Pathological Society of London 1903, Vol. LIV.
6) Camus, L., A propos de la ponction capillaire du cœur chez le cobaye. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1903, Tome LV, pag. 825.
7) Dautwitz, F. und Landsteiner, K., Über Beziehungen der Lipoide zur Serumhämolyse. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1907, Bd. IX.
8) Doepner, H., Über die Widerstandsfähigkeit der Antigene der roten Blutkörperchen gegen hohe Temperaturen. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XL.
9) Dubois, A., Sur la dissociation des propriétés agglutinante et sensibilisatrice. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Tome XVI.
10) Dungern, E. v., Spezifisches Immunserum gegen Epithel. Münchener med. Wochenschr. 1899.
11) Ders., Globulizide Wirkungen des tierischen Organismus. Münchener med. Wochenschr. 1899.
12) Ders., Beiträge zur Immunitätslehre. Ebenda 1900, Nr. 20 und 28.
13) Friedberger, E. und Dorner, Über die Hämolysinbildung durch Injektion kleinster Mengen von Blutkörperchen und über den Einfluß des Aderlasses auf die Intensität der Bildung hämolytischer Amboceptoren beim Kaninchen. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII.
14) Frouin, A., Sur la formation de sérums exclusivement agglutinants ou hémolytiques. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1907, Tome LXII, Nr. 3.
15) Guerrini, G., Di un siero emolitico ed emotossico ottenuto per iniezioni di nucleoproteide. Rivista critica di clinica medica 1903.
16) Hess, C. und Römer, P., Experimentelle Untersuchungen über Antikörper gegen Netzhautelemente. Arch. für Augenheilk. 1906, Bd. LIV.
17) Jacoby, M., Über Krotin-Immunität. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1903, Bd. IV.
18) Ders., Über die Empfindlichkeit und das Rezeptionsvermögen der Zellen bei normalen und immunisierten Tieren. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1904, Bd. VI.
19) Klein, A., Über Erythropräzipitin und andere Immunprodukte einzelner Bestandteile des Blutes. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXLIX.
20) Landsteiner, K., Zur Kenntnis der spezifisch auf Blutkörperchen wirkender Sera. Centralbl. für Bakt. 1899, Bd. XXV.
21) Landsteiner, K. und Eisler, M. v., Über Agglutinin- und Lysinwirkung. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXIX. S. auch: Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 24.
22) Lazar, E., Über die Bedeutung der lipoiden Stoffe der roten Blutkörperchen für den Mechanismus der Agglutination. Wiener klinische Wochenschr. 1905, Nr. 39.
23) Ders, Weitere Studien über lipoide Substanzen als Schutzkörper. Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 19.
24) Levene, P. A., On the production of the hemolytic serum by injecting animals with different constituents of erythrocytes. Journal of med. research 1904, Vol. XII.
25) London, E. S., Contributions à l'étude des spermolysines I et II. Arch. des Sciences biologiques (St. Pétersbourg) 1902, Tome IX.

26) London, E. S., Der gegenwärtige Stand der Lehre von den Cytolysinen und die cytolytische Theorie der Immunität. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII, I. Abt.
27) Lüdke, H., Über Cytotoxine mit besonderer Berücksichtigung der Ovariotoxine und Thyreotoxine. Münchener med. Wochenschr. 1905.
28) Metschnikoff, E., Sur la spermotoxine et l'antispermotoxine. Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, Tome XIV.
29) Morgenroth, J., Über die Erzeugung hämolytischer Amboceptoren durch Seruminjektion. Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 25.
30) Ders., Methodik der Hämolysinuntersuchung. Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung. Berlin 1904.
31) Ders., Untersuchungen über die Bindung von Diphtherietoxin und -Antitoxin, zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Konstitution des Diphtheriegiftes. Zeitschrift für Hyg. 1904, Bd XLVIII, pag. 195; siehe auch Berliner klin. Wochenschrift 1904, Nr. 20.
32) Moxter, Über ein spezifisches Immunserum gegen Spermatozoen. Deutsche med. Wochenschr. 1900.
33) Muir, R. and Fergusson, On the haemolytic receptors of the red corpuscles. The Journal of Pathol. and Bacteriol. 1906.
34) Neisser, M. und Wechsberg, F., Über eine neue einfache Methode zur Beobachtung von Schädigungen lebender Zellen und Organismen (Bioskopie). Münch. med. Wochenschr. 1900.
35) Dies., Über das Staphylotoxin. Zeitschr. für Hyg. 1901, Bd. XXXVI.
36) Nicolle, C. et Ducloux, Technique de la ponction cardiaque chez le lapin. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1903, Tome LV, pag. 904.
37) Nolf, P., Contribution à l'étude des sérums antihématiques und Le mécanisme de la globulolyse. Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, Tome XIV.
38) Raybaud, A. et Hawthorn, E., De la ponction capillaire du cœur chez le cobaye. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1903, Tome LV, pag. 815.
39) Ricketts, H. T., The reduction of methylene Blue by nervous tissue. Journal of infections diseases 1904, Vol. I.
40) Römer, P., Die Ehrlichsche Seitenkettentheorie und ihre Bedeutung für die medizinischen Wissenschaften. Wien 1904.
41) Sachs, H., Zur Kenntnis des Kreuzspinnengiftes. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1902, Bd. II.
42) Ders., Die Cytotoxine des Blutserums. Biochem. Centralbl. 1903, Bd. 1.
43) Ders., Über Differenzen der Blutbeschaffenheit in verschiedenen Lebensaltern. Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV.
44) Ders., Die Hämolysine und die cytotoxischen Sera. Lubarsch-Ostertags Ergebnisse. Wiesbaden 1907, Jahrgang 11.
45) Sata, A., Über die Wirkung und die Spezifizität der Cytotoxine im Organimus. Zieglers Beiträge 1906, Bd. XXLIX.
46) Schattenfroh, A., Über spezifische Blutveränderungen nach Harninjektionen. Münchener med. Wochenschr. 1901.
47) Tschistovitch, Th., Études sur l'immunisation contre le sérum d'anguilles. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899. Tome XIII.
48) Théohari und Babes, Über ein gastrotoxisches Serum mit einem Studium des Chemismus des Magens und der von diesem Gastrotoxin veranlaßten histologischen Veränderungen. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd XXXVIII u. XXXIX.
49) Wiechowski, W., Eine Methode zur chemischen und biologischen Untersuchung überlebender Organe. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1907, Bd. IX, Heft 5/7.

III. Tierisches Eiweiß als Antigen.

Alle eiweißhaltigen zellfreien Flüssigkeiten und Gewebsextrakte des tierischen Organismus wirken ebenso wie die Zellen als Antigene. Ihre Antikörper sind als Präzipitine oder Amboceptoren bekannt. Ohne hier auf die Frage, ob diese beiden Antikörper identisch sind oder nicht, näher einzugehen, sei hier nur bemerkt, daß die Eiweißantigene nur mittels der Antikörperwirkungen nachgewiesen werden können, die sich einerseits in dem Phänomen der Präzipitation, andererseits in der durch das Zusammenwirken von Antigen und Antikörper (Ambocepter) bedingten

Komplementbindung äußern. Die Methoden des Antigennachweises sind also hier mit denjenigen des Antikörpernachweises vollkommen identisch, und es sei daher auf die entsprechenden Kapitel im II. Hauptteile des Handbuches (Zoopräzipitine-Hämolysine) ganz besonders verwiesen. Als Eiweißantigene kommen zunächst von Flüssigkeiten außer Blutserum (Tchistovitch[40])), noch in Betracht Milch (Bordet[1]), Ehrlich und Morgenroth[3]), Fish[5]), Wassermann[45])[46]) und Schütze[38])), Eiereiweiß (Wassermann[45])[46]), Myers[28]), Uhlenhuht[41]), eiweißhaltiger Harn*) (Leclainche und Vallée[15]), Mertens[18]), Stern[39]), Zülzer[50]), Ascites, Pleuraexsudat (Dieudonné[2])), Hydrozelenflüssigkeit usw. Blutserum wird, wenn man nicht gleichzeitig auch die Erythrocyten verwenden will, besser in der Weise genommen, daß man das Blut der spontanen Gerinnung überläßt. Man läßt das Blut in zylindrische Gefäße fließen, die in den Eisschrank gestellt werden. Zweckmäßig wird der Blutkuchen nach erfolgter Gerinnung von den Wänden des Gefäßes abgelöst. Kleinere Blutmengen legt man in Reagenzgläsern oder sonstigen Behältern schräg in den Eisschrank. Nach der Gerinnung stellt man das Gefäß aufrecht. Am nächsten Tage wird das ausgeschiedene Serum abgegossen und, wenn erforderlich, von Erythrocytenbeimengungen durch Zentrifugieren befreit.

Eiereiweiß wird nach Uhlenhuht[41]) nach Reinigen und vorsichtigem Aufschlagen des Eis in ein Becherglas gegossen, das physiologische Kochsalzlösung enthält und darin mit einem sterilen Glasstabe geschlagen, bis die Lösung dünnflüssig und zur Injektion geeignet ist.

Umständlicher ist natürlich der Vorgang, wenn man mit Organeiweiß arbeiten will. Um Material für die Immunisierung zu gewinnen, wird man zwar mit Emulsionen des sorgfältig verriebenen Organbreis in physiologischer Kochsalzlösung auskommnn können. Vorzuziehen dürften aber klare Extrakte aus den Organen sein**), zumal wenn es sich um intravenöse Injektionen handelt. Für die Anstellung der biologischen Reaktionen, besonders der Präzipitinreaktion ist zudem die Verwendung klarer Lösungen als Testobjekt ein notwendiges Erfordernis. Man stellt die Extrakte der Organe in einfachster Weise durch Verreiben in physiologischer Kochsalzlösung dar. Korschun und Morgenroth[12]), welche die hämolytische Wirkung der Organextrakte untersuchten, verfuhren in folgender Weise: Die Organe wurden mit Seesand möglichst fein zerrieben, dann mit dem 5—10fachen ihres Gewichts physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zwei Stunden im Schüttelapparat geschüttelt. Hierauf wird zentrifugiert. Es empfiehlt sich dabei, um möglichst klare Lösungen zu erhalten, von dem entstandenen Sediment abzugießen, den Abguß wieder zu zentrifugieren und den Vorgang nach Bedarf zu wiederholen***). Im Prinzip handelt es sich bei allen Ex-

---

*) Die Angaben Landsteiner und Eislers[14]), sowie Friedenthals[8]), daß man auch durch Injektion eiweißfreien Harnes Präzipitine erzeugen kann, konnte durch Michaelis und Fleischmann[22]) nicht bestätigt werden.

**) Will man das Organmaterial erst von den anhaftenden Serumbestandteilen befreien, so wäscht man den Organbrei wiederholt mit physiologischer Kochsalzlösung und zentrifugiert die Zellen ab. Das schließlich erhaltene Sediment dient dann als Ausgangsmaterial. Man kann auch zu gleichem Zwecke das Organ von dem zuführenden Gefäße aus durchspülen, bis das Waschwasser klar abfließt (cfr. H. Pfeiffer[37])).

***) Was die hämolytische Wirkung der Organextrakte anlangt, so unterscheidet Levaditi[16]) zwischen „extrait rapide“ und „extrait tardif“, von denen sich letzterer von dem ersteren durch eine prolongierte Extraktion bei höherer Temperatur vor dem Zentrifugieren unterscheidet.

traktionen um das gleiche Verfahren, jedoch sind von den einzelnen Autoren mannigfache Modifikationen geübt worden. Die Organe können auch im gefrorenen Zustande aufbewahrt und mittels des Kosselschen Schneideapparats zerkleinert werden.

Forssner[6]) verwandte zur Extraktion einen Zusatz von $^1/_2$% Ammoniak.

Grund[10]) bediente sich mit Vorteil der Organpreßsäfte. Nach Verreiben der Organe mit Kieselgur wurden die Preßsäfte bei einem Druck von 300 Atmosphären in der Buchnerschen Presse gewonnen. Pfeiffer[36]) extrahierte getrocknete Organmasse mit physiologischer Kochsalzlösung, der 0,5% Phenol zugesetzt war. Auch Wassernann und Plaut[48]) bedienen sich zur Gewinnung von Organextrakten physiologischer Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 0,5% Phenol. Ihre Vorschrift, die sich auf den Nachweis von Antigenen mittels der Komplementablenkung bezieht, ist folgende: Die Organe werden möglichst schnell steril mittels Schere zerkleinert und sodann 24 Stunden lang im Schüttelapparat mit der Karbolkochsalzlösung (4—5 ccm auf 1 g Organ) geschüttelt. Danach wird bis zur völligen Klärung der Flüssigkeit zentrifugiert und das klare Extrakt im Eisschrank aufbewahrt.

Verwiesen sei endlich auch an dieser Stelle auf die von Wiechowski[49]) angegebene Methode, „die Organproteine (und Fermente) in ihrer Gesamtheit frei von allen Begleitstoffen darzustellen". Nachdem das Organmaterial, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, getrocknet ist, wird es in einem nach dem Typus der Farbenreibmühlen konstruierten Apparat zusammen mit Toluol zermahlen. Die derart erhaltenen äußerst feinen Suspensionen werden auf einer Nutsche filtriert und mit Toluol gewaschen, bis letzteres farblos abläuft. Durch Verdampfen der letzten Spuren des Lösungsmittels bei 37° erhält man feine, hellgelbe Organpulver. Dieselben können weiter mit Alkohol oder Aceton extrahiert werden. Bezüglich der näheren Details sei auf die Originalarbeit verwiesen.

Eine besondere Aufgabe ist es noch, die Flüssigkeiten, welche im Reagenzglasversuch als Antigene dienen wollen, vollständig zu klären. Es ist dies für die Anstellung der Präzipitinreaktion unbedingt erforderlich und bei der Methode der Komplementablenkung zum mindesten sehr empfehlenswert, zumal da die Untersuchungen Wassermanns und seiner Mitarbeiter gezeigt haben, daß feinste Trübungen oder suspendierte Partikelchen dadurch störend interferieren können, daß sie an und für sich Komplement absorbierend wirken*). Zur Klärung der Extrakte, resp. Flüssigkeiten dient die Zentrifuge oder Filtrieren. Vielfach werden Berkefeldfilter usw. benutzt. Ich verwende mit Vorteil, speziell auch für die Klärung der aus alten Blutflecken dargestellten Lösungen, das von Schleicher und Schüll (Düren) in den Handel gebrachte Filtrierpapier „Nr. 602 und 605, extra hart". Nach meiner Erfahrung erhält man damit, wenn einfaches Zentrifugieren nicht zum Ziele führt, stets absolut klare Filtrate.

Was die Spezifität der Eiweißantigene anlangt, so erscheint die Besprechung dieser Frage an dieser Stelle überflüssig, da es sich bei

---

*) Nach Wassermann und Plaut[48]) ändern sich die Organextrakte beim Lagern in der Weise, daß ihre Komplement absorbierende Funktion zunimmt. Auch treten in manchen Extrakten beim Lagern Ausfällungen auf. Aus beiden Gründen empfiehlt es sich, stets mit frisch hergestellten Organextrakten zu arbeiten.

der Differenzierung lediglich um die indirekten Methoden des Antikörpernachweises handelt und daher auf den II. Teil des Handbuches zu verweisen ist. Die Spezifität ist auch hier lediglich eine Receptorenspezifität, und da die Receptoren weder zoologisch, noch morphologisch streng differenziert sind, nur eine quantitative. Bei Berücksichtigung dieser quantitativen Verhältnisse gelingt aber, wie bekannt, die Differenzierung des Eiweißes verschiedener Tierarten, wenn es sich nicht grade um äußerst nahe stehende handelt, ohne Schwierigkeit. Im letzteren Falle kommt die Methode der elektiven Absorption (Kister und Weichardt [11]), oder diejenige der kreuzweisen Immunisierung verwandter Tierarten (Uhlenhuth [44]) in Betracht. Viel weniger markant als die Artspezifität tritt eine spezifische Differenzierung der genuinen Eiweißstoffe der Organe in Erscheinung. Eine Ausnahmestellung nimmt allerdings das Eiweiß der Kristallinse des Auges ein, indem, wie Uhlenhuth [42]) zeigte, das Linseneiweiß biologisch markant vom Bluteiweiß differenziert ist, hingegen in der Säugetierreihe keine markanten die einzelnen Spezies charakterisierenden Differenzen aufweist. Bezüglich der einzelnen Untersuchungen über die Spezifität und die Differenzierung der verschiedenen Eiweißantigene sei auf die Arbeiten und zusammenfassenden Darstellungen von Grund [10]), Kraus [13]), Michaelis [21]), Nuttall [30]), Pfeiffer [37]), Uhlenhuth [43]) verwiesen.

Es ist nun noch die Frage zu erörtern, wie sich die Eiweißantigene gegenüber physikalischen und thermischen Einflüssen verhalten. Man kann sich von stattgehabten Alterationen auf zweierlei Weise überzeugen, entweder durch die Immunisierung oder durch den Reagensglasversuch. In beiden Fällen kommen zwei Möglichkeiten der Prüfung in Betracht, die Präzipitinreaktionen und die Komplementablenkungsmethode. Ob die Antigene (Receptoren), welche diese Reaktionen bedingen, identisch sind oder nicht, ist eine Frage, die noch nicht spruchreif erscheint. Jedenfalls kann man sagen, daß Eiweißlösungen so beschaffen oder künstlich verändert sein können, daß sie sich durch Komplementablenkung, aber nicht durch die Präzipitation nachweisen lassen. Das kann man zunächst durch einfaches Verdünnen der Eiweißlösung erreichen, indem minimale Mengen, die mit den Präzipitinen nicht mehr reagieren, noch das Ablenkungsphänomen geben [Neisser und Sachs [29]), Friedberger [7]), Liefmann [17]), Muir und Martin [25]). Ferner wäre als zweites Verfahren das Lagern der Eiweißlösungen zu nennen, das allerdings bisher nur bei bakteriellen Antigenen zu einem differenzierenden Ergebnis geführt hat Wassermann und Bruck [47]) haben nämlich bei Verwendung frischer Bakterienextrakte Präzipitation und Komplementablenkung erhalten, bei Verwendung gelagerter aber nur letztere. Endlich kann man, wie Liefmann [17]) mitteilte, durch Erhitzen der Eiweißlösung dieselbe derart modifizieren, daß sie mit dem entsprechenden Immunserum nicht mehr Präzipitate ergibt*), wohl aber noch Komplement bindende Komplexe bildet.

Freilich lassen alle diese Methoden keinen sicheren Schluß auf eine Differenz der beiden in Frage stehenden Antigene zu. Denn, wie wir durch die Untersuchungen Eisenbergs [4]) wissen, verlieren Eiweißlösungen durch Erhitzen auf 78° ihre Fällbarkeit, sind aber noch imstande Präzipitine zu binden. Man hätte danach zwischen einer thermolabilen fällbaren und einer thermostabilen bindenden Gruppe zu unterscheiden, von

---

*) Daß Blutserum durch Erhitzen (auf 80°) die Fähigkeit, durch Präzipitine präzipitiert zu werden, verliert, hat bereits Tchistovitch [40]) beschrieben.

denen die letztere mit der bei der Komplementablenkung reagierenden identisch sein könnte. Differenzen im Verhalten gegenüber der Wirkung der präzipitierenden Antikörper einerseits, der komplementabsorbierenden Antikörper andererseits lassen also an und für sich noch keinen bindenden Schluß auf die Verschiedenheit der bindenden Gruppen zu.

Die weiteren bisherigen Untersuchungen über die Wirkung physikalischer und chemischer Einflüsse auf die Funktion der Antigene beziehen sich lediglich auf die Präzipitinreaktion. Daß Erhitzen der Eiweißlösungen über 60° die Präzipitierbarkeit vernichtet (angetrocknetes Eiweiß verträgt übrigens hohe Temperaturen — bis zu 130°), ist bereits erwähnt. Fäulnis kann die Reaktionsfähigkeit vernichten; es hängt aber von dem Grade der Fäulnis ab (Uhlenhuth)[43]). Was die Hemmung gewisser Faktoren auf die Reaktion anlangt, so sei auf die besonders in Hinsicht auf die forensische Anwendung wichtigen Darstellungen von Uhlenhuth[43]), Schur-Kraus[13]), sowie auf die die einschlägigen Verhältnisse behandelnde Arbeit von Graham-Smith und Sanger[9]) verwiesen.

Während auf 60—70° erhitzte Eiweißlösungen nicht mehr auf ein durch genuines Eiweiß erzeugtes Immunserum reagieren, erzeugen sie ihrerseits, wie Obermayer und Pick[31, 32]) gefunden haben, ein Immunserum, das genuines und erhitztes Eiweiß präzipitiert. Milch wird hingegen in ihren antigenen Funktionen durch Kochen nicht verändert (Moro[24]), Müller[26]), Schütze[38])).

Was den Einfluß peptischer und tryptischer Fermente anlangt, so stimmen die Angaben der Autoren (Obermayer und Pick[32]), Michaelis[19, 20]), Müller[26])) darin überein, daß die Produkte der peptischen Verdauung nicht imstande sind, präzipitiert zu werden oder Präzipitine zu erzeugen. Myers[28]) will mit Pepton (Witte) Präzipitine erhalten haben. Michaelis[20]) beschreibt eine Zwischenstufe bei der peptischen Verdauung, in welcher das „peptisch angedaute Eiweiß" die Präzipitierbarkeit eingebüßt hat, aber noch Präzipitine erzeugt.

Etwas widersprechend sind die Angaben über die Wirkung der tryptischen Verdauung. Während Obermayer und Pick[32, 33]) angeben, daß die Präzipitinogene dem Trypsin gegenüber resistent sind, wird von Michaelis[20, 23]) und Oppenheimer[23, 35]) das Gegenteil behauptet. Nach letzteren Autoren besteht zwischen peptischer und tryptischer Verdauung kein Unterschied. Nach Müller[27]) vernichtet Pepsin und Trypsin die antigene Funktion des Kaseins; mit kalkfreiem und mit jodiertem Kasein wurden Präzipitine erzeugt.

Obermayer und Pick[34]) berichten, daß koaguliertes Serumeiweiß oder Eiereiweiß unter dem Einfluß der Trypsinverdauung so verändert wird, daß die biuretfreien Spaltungsprodukte ein Immunserum erzeugen, welches aber nur auf die tryptischen Spaltungsprodukte einwirkt; die Artspezifität ist dabei erhalten. Auch durch oxydativen Abbau der Eiweißkörper haben Obermayer und Pick[32]) charakteristische Veränderungen der präzipitogenen Funktionen erhalten. Behandelten sie Eiweiß mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung, so erhielten sie Produkte, welche mit dem durch Injektion von genuinem Eiweiß erzeugten Präzipitin nicht reagierten, aber die Bildung von Präzipitinen veranlaßten, die vorwiegend auf die Oxydationsprodukte reagierten; auch hierbei war die Artspezifität erhalten. Aus allen diesen Befunden ergibt sich also, daß die Artspezifität der Eiweißantigene auch bei tiefgreifenden Einwirkungen erhalten bleibt. Obermayer und Pick[33]) unterscheiden von dieser „ori-

ginären" Artspezifität die „konstitutive oder Zustandsspezifität" der Antigene, welche als Folge gewisser Eingriffe zutage tritt. Von besonderem Interesse ist es nun, daß es nach den Angaben von Obermayer und Pick[34]) gelingt, die Artspezifität doch aufzuheben durch die Einführung der Jod-, Nitro- oder Diazogruppe in das Eiweiß. Injizierten die Autoren nämlich jodiertes Serum (nach Hofmeister oder Blum), nitriertes Serum (nach v. Fürth) oder diazotiertes Serum (nach Obermayer), so erhielten sie Präzipitine, welche ausschließlich auf Substitutionsprodukte der Art, wie sie zur Immunisierung gedient hatten, wirkten; es war aber gleichgültig, von welcher Tierart das Ausgangsmaterial stammte. Zur Anstellung der Reaktion ist nach Angabe der Autoren vollständige Frische der Präparate erforderlich. Es ergibt sich also, daß eine durchgehende Unabhängigkeit zwischen „originärer" und „konstitutiver" Gruppierung besteht. Da nun bei den erwähnten drei Prozessen die Substitution übereinstimmend in der Weise erfolgt, daß die substituierende Gruppe in den aromatischen Kern eintritt, halten es Obermayer und Pick für wahrscheinlich, „daß die artspezifische Gruppierung im Eiweißmolekül in der Hauptsache von Gruppen beeinflußt wird, welche mit den aromatischen Kernen des Eiweißes zusammenhängen".

Literatur.

1) Bordet, J., Le mécanisme de l'agglutination. Annales de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII.
2) Dieudonné, Beiträge zum biologischen Nachweis von Menschenblut. Münchener med. Wochenschr. 1901.
3) Ehrlich, P., On immunity with special reference to cell life. Procedings of the Royal Society 1900, Vol LXVI.
4) Eisenberg, Ph., Beiträge zur Kenntnis der spezifischen Präzipitationsvorgänge. Centralbl. für Bakt. und Bull. Acad. de Scienc de Cracovie 1902.
5) Fish, C., Studies on Lactoserum and on other cellsera. St. Louis Cour. of Med. 1900.
6) Forssner, G., Über die Möglichkeit isolierte Eiweißkörper, bezw. eiweißhaltige Flüssigkeiten, welche aus einem und demselben Organismus stammen, durch die Präzipitinreaktion zu differenzieren. Münchener med. Wochenschr. 1905.
7) Friedberger, E., Zur forensischen Eiweißdifferenzierung auf Grund der hämolytischen Methode mittels Komplementablenkung usw. Deutsche med. Wochenschrift 1906.
8) Friedenthal, Berliner klin.-therap. Wochenschr. 1904 und Archiv für Anatomie und Physiol. 1905, zitiert nach L. Michaelis, Biochem. Centralbl., Bd. III, pag. 694.
9) Graham-Smith, G. S. et Sanger, F., The biological or precipitin test for blood considered mainly from its medico-legal aspect. Journ. of Hyg. 1903, Vol. III.
10) Grund, G., Über organspezifische Präzipitine und ihre Bedeutung. Deutsches Archiv für klin. Med. 1906, Bd. LXXXVII.
11) Kister, J. und Weichardt, W., Weiterer Beitrag zu der Frage des biologischen Blutnachweises. Zeitschr. für Medizinalbeamte 1902.
12) Korschun, S. und Morgenroth, J., Über die hämolytischen Eigenschaften von Organextrakten. Berliner klin. Wochenschr. 1902.
13) Kraus, R., Über spezifische Niederschläge (Präzipitine). Handbuch der pathog. Mikroorganismen (Kolle-Wassermann) 1904, Bd. IV.
14) Landsteiner, K. und von Eisler, M., Über Präzipitinreaktionen des menschlichen Harns. Wiener klin. Rundschau 1903.
15) Leclainche, E. et Vallée, H., Sur les anticorps albumineux. La Semaine Médicale 1901.
16) Levaditi, C., Sur les hémolysines cellulaires. Annal. de l'Inst. Pasteur 1904.
17) Liefmann, H., Über die Komplementablenkung bei Präzipitationsvorgängen. Berliner klin. Wochenschr. 1906.
18) Mertens, V., Ein biologischer Nachweis für die Herkunft des Albumen im Nephritisharn aus dem Blute. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 11.

19) Michaelis, L., Untersuchungen über Eiweißpräzipitine, zugleich ein Beitrag zur Lehre von der Eiweißverdauung. Deutsche med. Wochenschr. 1902.
20) Ders., Weitere Untersuchungen über Eiweißpräzipitine. Deutsche med. Wochenschrift 1904.
21) Ders., Die Eiweißpräzipitine. Biochem. Centralbl. 1905, Bd. III.
22) Ders. und Fleischmann, Über die angebliche präzipitogene Eigenschaft des Harnes. Fortschritte der Medizin 1904.
23) Ders. und Oppenheimer, C., Über Immunität gegen Eiweißkörper. Archiv für Anatomie und Physiologie, physiol. Abt., Supplement 1902.
24) Moro, E., Biologische Beziehungen zwischen Milch und Serum. Wiener klin. Wochenschr. 1901.
25) Muir, R. and Martin, W. B. M., On the deviation of complement by a serum and its antiserum and its relations to the precipitin test. The journ. of hyg. 1906, Vol. VI.
26) Müller, P. Th., Vergleichende Studien über die Gerinnung des Kaseins durch Lab und Lactoserum. Münch. med. Wochenschr. und Arch. für Hyg. 1902, Bd. XLIV.
27) Ders., Weitere Studien über die Fällung des Kaseins durch Lab und Lactoserum. Centralbl. für Bakt., Abt. 1, 1902, Bd. XXXII.
28) Myers, W., Über Immunität gegen Proteide. Centralbl. für Bakt. 1900, Bd. XXVIII.
29) Neisser, M. und Sachs, H., Ein Verfahren zum forensischen Nachweis der Herkunft des Blutes. Berliner klin. Wochenschr. 1905 und 1906.
30) Nuttall, G. H. F., Blood immunity and Bloodrelationship etc. Cambrigde 1904.
31) Obermayer, F. und Pick, E. P., Biologisch-chemische Studie über das Eiklar. Wiener klin. Rundschau 1902.
32) Dies., Über den Einfluß physikalischer und chemischer Zustandsänderungen präzipitogener Substanzen auf die Bildung von Immunpräzipitinen. K. K. Gesellschaft der Ärzte Wien. Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 22.
33) Dies., Beiträge zur Kenntnis der Präzipitinbildung. Wiener klin. Wochenschr. 1904.
34) Dies., Über die chemischen Grundlagen der Arteigenschaften der Eiweißkörper. (Bildung von Immunpräzipitinen durch chemisch veränderte Eiweißkörper.) Wiener klin. Wochenschrift 1906.
35) Oppenheimer, C., Über die Einwirkung der Trypsinverdauung auf die Präzipitinreaktion. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1903, Bd. IV.
36) Pfeiffer, H., Beiträge zur Lösung des biologisch-forensischen Problems der Unterscheidung von Spermaeiweiß gegenüber den anderen Eiweißarten derselben Spezies durch die Präzipitinmethode. Wiener klin. Wochenschr. 1905.
37) Ders., Über den Entwicklungsgang, über neue Ergebnisse und Bestrebungen der Präzipitinforschung. Arch. für Kriminal-Anthropologie 1906, Bd. XXII.
38) Schütze, A., Über ein biologisches Verfahren zur Differenzierung der Eiweißstoffe verschiedener Milcharten. Zeitschr. für Hyg. 1901, Bd. XXXVI, siehe auch Bd. XXXVIII.
39) Stern, R., Über den Nachweis menschlichen Blutes durch ein Antiserum. Deutsche med. Wochenschr. 1901.
40) Tchistovitch, Th., Études sur l'immunisation contre le sérum d'anguilles. Annales de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII.
41) Uhlenhuth, Neuer Beitrag zum spezifischen Nachweis von Eiereiweiß auf biologischem Wege. Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 46.
42) Ders., Zur Lehre von der Unterscheidung verschiedener Eiweißarten mit Hilfe spezifischer Sera. Koch-Festschrift. Jena 1903.
43) Ders., Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen- und Tierblut, sowie anderer Eiweißsubstanzen und seine Anwendung in der forensischen Praxis. Jena 1905.
44) Ders., Ein Verfahren zur biologischen Unterscheidung von Blut verwandter Tiere. Deutsche med. Wochenschr. 1905.
45) Wassermann, A., Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 29, Vereinsbeilage.
46) Ders., Verhandlungen des Kongresses für innere Medizin 1900.
47) Ders. und Bruck, C., Ist die Komplementbindung beim Entstehen spezifischer Niederschläge eine mit der Präzipitierung zusammenhängende Erscheinung oder Ambozeptorwirkung? Med. Klinik 1905, Nr. 55.
48) Ders. und Plaut, F., Über das Vorhandensein syphilitischer Antistoffe in der Cerebrospinalflüssigkeit von Paralytikern. Deutsche med. Wochenschr. 1906.
49) Wiechowski, W., Eine neue Methode zur chemischen und biologischen Untersuchung überlebender Organe. Hofmeisters Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 1907, Bd. IX.
50) Zuelzer, G., Zur Frage der biologischen Reaktion auf Eiweiß in Blut und Harn. Deutsche med. Wochenschr. 1901.

XIII.

Schlangengifte.

Von

M. Calmette,

in Lille.

I.

Allgemeines über giftige Tiere.

Giftige Tiere im weiteren Sinne, d. h Organismen, die als solche oder aber durch ihre Ex- und Sekrete toxisch auf andere Organismen wirken, gibt es eine große Anzahl. Eigentümliche Drüsenapparate liefern, dauernd oder nur unter bestimmten Voraussetzungen, toxische Substanzen, die bald einfach nach außen in die Umgebung entleert werden, etwa um einen lästigen Gegner in Schach zu halten (z. B. tun das Salamander, Kröten usw.); bald den Körper — speziell den Verdauungssäften sich beimischen und eine wichtige Rolle im Stoffwechsel ihrer Produzenten spielen; schließlich in einzelnen Fällen durch ad hoc vorhandene Vorrichtungen, wie Zähne, Stacheln, Hacken, auf bezw. in andere Organismen übertragen werden können. (Schlangen, Spinnen, Skorpione, Bienen usw.).

Man versteht unter giftigen Tieren im engeren Sinne nur solche der letzteren Art — diejenigen also, die ihr Gift aktiv auf andere Tiere übertragen.

Ihre Vertreter finden sich in fast allen Klassen des Tierreichs, besonders unter den niederen Tieren (Protozoen, Coelenteraten, Arthropoden, Mollusken). Von den Wirbeltieren sind als giftig nur Arten der drei Klassen der Fische, Amphibien und Reptilien bekannt.

Letztere beanspruchen das allermeiste Interesse, denn gerade unter ihnen finden sich die für den Menschen und überhaupt für Säugetiere gefährlichsten Arten.

II.

Die wichtigsten Giftschlangen.

Die Zoologie teilt die Giftschlangen in zwei große Familien, Colubriden und Viperiden ein. Sie unterscheiden sich voneinander durch bestimmte anatomische Besonderheiten, vorzüglich durch die Anlage des Gebisses.

A. Die **Colubriden** zerfallen ihrerseits in zwei Unterabteilungen:

1. Opistoglyphen, bei denen die Giftzähne in der Tiefe der Mundhöhle, hinter dem Oberkiefer liegen; infolgedessen ist diese Schlangenart weniger gefährlich, als die

2. Proteroglyphen; diese tragen am Vorderende der Oberkiefer eine Art Haken mit tiefer Rinne, in die an der Basis die Ausführungsgänge der Giftdrüsen münden. In diese Abteilung gehören z. B. die im Golf von Bengalen so überaus häufig vorkommende Seeschlange mit ruderförmig abgeplattetem Schwanz (Hydrophis), und vor allem die Naja oder Cobra (Fig. 1) in Indien und Indochina.

Fig. 1. Naja tripudians (Cobra capel.) nach FAYRER.

B. **Viperiden** (Fig. 3) zeichnen sich durch einen zugespitzten fast dreieckigen Kopf aus, der Leib ist meist kurz und dick und endigt in einem kurzen Schwanz. Hierher gehören mehrere besonders gefährliche Arten, so unsere einheimische Viper, die fast über die ganze alte Welt verbreitet ist und die Klapperschlange, deren Ausbreitung sich auf Nord- und Südamerika beschränkt.

III.

Chemie der Schlangengifte.

Das frische Sekret einer Giftdrüse sieht aus wie zäher dicker Speichel von mehr oder minder gelblicher Färbung. Es löst sich gut in Wasser, das dadurch etwas opalescent wird und reagiert unter diesen Umständen auf Lackmus sauer. Diese Reaktion ist durch die Anwesenheit geringer Mengen einer flüchtigen noch nicht näher bekannten Säure bedingt. Beim Austrocknen geht sie verloren, so daß Lösungen von eingetrocknetem Schlangengift neutral reagieren.

Mehrere Giftarten, besonders das Cobragift, schmecken intensiv bitter.

Das spezifische Gewicht ist etwas höher, als das des Wassers, es schwankt schwischen 1,03° und 1,05°.

Konstitutionell bestehen die Schlangengifte aus einem Gemenge von Proteinkörpern, Schleim, Epitheldetritus, Fett und Salzen (Calcium —

Ammonium — und Magnesiumphosphat und -chlorat) und 64 %—80 % Wasser.

Die Elementaranalyse des Cobragiftes ergibt nach K. ARMSTRONG[1])

Kohlenstoff	43,04
Wasserstoff	7,00
Stickstoff	12,45
Schwefel	2,05
Asche	geringe Mengen.

Diese Zahlen besagen nicht allzuviel. Es wäre ungleich wichtiger Aufschluß über die Konstitution der im Schlangengift enthaltenen und seine physiologische Wirkung bestimmenden Eiweißkörper zu erhalten. Leider ist dies bei dem heutigen Stande unseres Wissens von der Konstitution der Proteine im allgemeinen in exakter Weise nicht möglich.

Fig. 2. Indischer Schlangenbeschwörer in Colombo.

Im Jahre 1843 wies LUCIEN BONAPARTE[2]) als erster darauf hin, daß der wirksame Bestandteil des Viperngiftes ein Eiweißköper ist, den er Viperin oder Echidinin nannte und den Fermenten an die gleich stellte. Den Beweis für die komplexe Konstitution des Schlangengiftes erbrachten später WEIR, MITCHELL und REICHERT[16]), MORRIS WOLFENDEN[23]), PEDLER[20]), WALL, KANTHACK[12]), D. J. MARTIN und McGARVIE SMITH[17]). Ihre Untersuchungen zeigen, daß absoluter Alkohol alle Toxinstoffe aus einer Schlangengiftlösung ausfällt; die wässrige Lösung des Präzipitats entfaltet im Tierversuch die volle Wirkung des frischen Giftes.

Recht verschieden ist der Einfluß der Temperatur auf die verschiedenen Giftarten. Das Gift von Colubridenarten (Naja, Bungarus, Hoplocephalus und Pseudechis) vertragen ohne weiteres Temperaturerhöhungen bis zu 100°, ja sogar kurzes Kochen, ohne Änderung des Gifttiters. Durch längeres Kochen oder Erhitzen über 100° verringert sich die Toxizität, um schließlich ganz zu verschwinden. Bei 120° ist dies regelmäßig in kürzester Zeit der Fall.

Dagegen ist das Gift der Viperiden (Bothrops, Crotalus, Vipera) viel fragiler. Schon die bloße Erhitzung auf etwa 70° schwächt ihre Wirksamkeit ganz bedeutend ab. Zwischen 80—85° wird das Gift gänzlich zerstört.

Fig. 3. Lachesis trigonocephalus (Viperidae) (Ceylon).

Fig. 4. Gewinnung von Kobragift in Pondichery.

Erhitzt man Colubridengifte bis zur Fällung der Albumine (72°) und filtriert sie durch Papier, so erhält man ein glasklares Filtrat, das sich beim Kochen nicht mehr trübt und das toxische Prinzip in Lösung

enthält: das gefällte, als Filterrückstand gewonnene Eiweiß ist ganz ungiftig. Dagegen läßt sich die wirksame Substanz durch absoluten Alkohol aus dem klaren Filtrat niederschlagen. Eine Lösung dieses Präzipitats in Wasser zu gleichen Teilen wirkt genau so giftig, wie das Filtrat selbst.

Das durch Ausfällen bei 72 ° und Filtrieren gewonnene analoge Präparat von Vipernarten ist fast ganz unwirksam. Auch der coagulierte Bestandteil erweist sich als ganz harmlos, selbst für die empfänglichsten Versuchstiere.

Die Dialyse deckt weitere Unterschiede in der Natur der beiden Giftarten auf. Während Colubridengift Pflanzenmembranen und, etwas weniger gut, auch tierische Membranen langsam passiert, ist Viperngift überhaupt nicht dialysierbar.

Passage durch Porzellanfilter (Chamberlandkerze F oder Berkefeld) verändert das Colubridengift in merklicher Weise nicht; dagegen verliert dar Viperidengift auf diese Weise fast die Hälfte seiner Toxicität.

C. J. Martin ist es mit einem besonderen Hochdruckfilter von 50 Atm. gelungen, aus dem Gift von Pseudechis (Australien) zwei wirksame Substanzen zu isolieren: 1. ein nicht dialysierbares, bei 82 ° gerinnendes Albuminoid; 2. eine nicht coagulable, aber diffusionsfähige Albumose. Ersteres erzeugt Hämorrhagien; die zweite greift an den Nervenzellen des Atmungszentrums an.

Die Schlangengifte geben die allermeisten der bekannten Proteinkörperreaktionen: die Millonsche und die Biuret-Reaktion; Fällung durch Alkohol, durch schwefelsaure Magnesia und schwefelsaures Ammonium in gesättigter Lösung.

Nach C. J. Martin und Mac Garvie Smith sind die aktiven Stoffe des Schlangengiftes Proto- und Heteroalbumosen; die in ihnen enthaltenen Albumine dagegen sind ganz ungiftig.

Gewisse Chemikalien üben auf jene aktiven Stoffe eine energische sehr abschwächende oder sogar zerstörende Wirkung aus; sie können daher — wenigstens einige davon — mit Vorteil angewandt werden, wo es gilt, eventuell noch nicht resorbiertes Gift in einer frischen Bißwunde unschädlich zu machen. In erster Linie gehören dazu: Kaliumpermanganat in 1 %iger Lösung (Lacerda); 1 % Chromsäure (Kaufmann); gesättigtes Bromwasser und schließlich 1 % Jodtrichlorid.

Alle diese Körper beeinflussen, wie bekannt, in durchaus analoger Weise bakterielle Toxine, mit denen also die Schlangengifte eine sehr weitgehende Ähnlichkeit haben; nur daß diese weniger empfindlich gegen hohe Temperaturen sind. Den Schlangengiften kommt außerdem wie den normalen Sekretionsprodukten sonstiger Drüsen, eine überaus manifeste Enzymwirkung zu, die ihren toxikologischen Effekt in eigenartiger Weise kompliziert.

Der Einfluß des Lichtes ist ein verschiedener: im trockenen Zustand konserviertes Gift kann ohne Bedenken dem Tageslicht ausgesetzt werden. Eine Lösung (resp. frisches Gift) ist dagegen äußerst empfindlich. Giftlösungen, die einige Tage alt sind, müssen daher vor dem Gebrauch jedesmal wieder geprüft werden. Abgesehen von bakteriellen Verunreinigungen die sehr bald entstehen, wenn man nicht für strengste Keimfreiheit sorgt, ist der ungehinderte Luftzutritt ein sehr stark abschwächender Faktor. Man tut daher am besten, die Lösungen erst durch ein Berkefeldfilter keimfrei zu machen und dann in geschlossenen

Gefäßen, bei völligem Lichtabschluß im Eisschrank aufzubewahren. Sie halten sich dann jedenfalls mehrere Monate lang.

Der Zusatz von reinem Glyzerin zu gleichen Mengen einer konzentrierten Giftlösung ist gleichfalls ein vorzügliches Konservierungsmittel.

IV.

Die physiologische Wirkung des Schlangengiftes.

Der physiologische Effekt, den der Biß einer Giftschlange nach sich zieht, ist ganz unterschiedlich, je nach der Eigenart der betreffenden Schlange, der zoologischen Stellung des Opfers und dem Sitz des Bisses.

Im allgemeinen kann man sagen, daß, wenn das durch den Biß ins Gewebe eingebrachte Giftquantum genügend groß ist, um den Tod herbeizuführen, dieser unter zweierlei Art von Symptomen erfolgt: einmal Lokalerscheinungen, die auf die Wunde und ihre nächste Umgebung sich beschränken, zweitens Allgemeinerscheinungen die hauptsächlich Zirkulation und Nervensystem betreffen.

Bemerkenswert ist dabei der Umstand, daß die lokalen Störungen einen sehr breiten Raum im klinischen Bilde der Vergiftung einnehmen, wenn es sich um den Biß einer Vipernart handelt, während sie im anderen Fall, bei den Colubriden gänzlich in den Hintergrund treten. Dafür sind im letzteren Falle die Allgemeinerscheinungen sehr viel heftiger.

Der Biß einer Kobra, selbst wenn es ein großes Exemplar ist, tut nicht sehr weh. Charakteristisch ist ein Gefühl von Steifigkeit und Schwäche, die sich von der Bißstelle rasch über den ganzen Körper ausbreitet und bald in einen collapsartigen Zustand überführt. Der Gebissene empfindet große Mattigkeit und unüberwindliche Schläfrigkeit, er kann sich kaum auf den Beinen halten. Die Atmung ist erschwert und nähert sich allmählich dem Typus der reinen Zwerchfellatmung. Benommenheit und Atemnot steigern sich rasch, das Gesicht wird verzerrt, Schaum tritt vor den Mund, der Puls wird nach und nach langsamer, Singultus tritt ein, häufig auch Erbrechen des Mageninhaltes und unfreiwilliger Abgang von Stuhl und Harn. Im tiefsten Coma erfolgt dann der Tod. Die Pupillen reagieren bis zum letzten Moment auf Lichtreize.

Der ganze Vorgang spielt sich im Laufe weniger Stunden ab, meistens zwei bis fünf Stunden, selten mehr.

Handelt es sich um den Biß einer Vipernart, so wird die Umgebung der verwundeten Stelle sofort äußerst schmerzhaft, rötet sich stark und geht dann langsam in einen mehr violetten Ton hinüber. Im angrenzenden Gewebe entsteht eine sanguinolente Infiltration. Das betroffene Glied ist von heftigsten krampfartigen Schmerzen befallen, die nach dem Rumpfe hin ausstrahlen. Der Verletzte klagt über unerträgliche Trockenheit in Mund und Hals und quälenden Durst. Es tritt allmählich eine immer stärker werdende Cyanose der sichtbaren Schleimhäute auf.

Diese Erscheinungen können mitunter eine geraume Zeit andauern: 24 Stunden und mehr. Oft treten noch conjunctivale resp. buccale Magen-, Darm- oder Blasenblutungen hinzu; der Kranke verfällt in mehr oder weniger heftige Delirien.

Wenn die Dosis des resorbierten Giftes an sich genügt den Tod herbeizuführen, stellt sich mehrere Stunden nach dem Biß Stupor, Empfindungslosigkeit, dann Somnolenz ein; die Atmung ist stark behindert

und wird schließlich stertorös. Das Bewußtsein erlischt wahrscheinlich schon lange vor Eintritt des Comas. Der Exitus letalis erfolgt unter dem Bilde der Asphyxie, das Herz schlägt gewöhnlich noch ca. $^1/_4$ Stunde nach völligem Atemstillstand fort.

In selteneren Ausnahmefällen tritt der Tod sehr rasch ein: unter stürmischen Allgemeinerscheinungen und innerhalb weniger Minuten, noch ehe von einer örtlichen Reaktion die Rede sein kann. Dies bedeutet dann, daß das Gift direkt in den Kreislauf gelangt war und so eine fast augenblickliche Gerinnung der Gesamtblutmenge, resp. zahllose Embolien lebenswichtiger Organe verursachte.

Wenn der Biß einer Giftschlange an einer gefäßreichen Stelle oder überhaupt so erfolgt, daß das Gift etwa direkt in eine Vene gelangt, so ist der letale Ausgang in allen Fällen unvermeidlich. Ist dagegen die Haut nur oberflächlich geritzt oder ging der Biß zwar tiefer, aber durch Kleidungsstücke hindurch, die in solchem Fall einen großen Teil des Giftes auffangen, so ist die Resorption und damit die Lebensgefahr sehr gering. Die Schwere des einzelnen Falles von Schlangenbiß wird durch die gleichen Faktoren bestimmt und beeinflußt, wie Bißverletzungen von Menschen durch tollwütige Tiere.

Alle Säugetiere verhalten sich Schlangengiften in der gleichen geschilderten Weise; ebenso die Vögel. Nur ist bei letzteren die Periode der Asphyxie viel ausgedehnter, vermutlich wegen des in ihren Luftsäcken und Hohlknochen aufgespeicherten immerhin nicht unbeträchtlichen Luftvorrats. Mit der Spitze des Schnabels stützen sie sich auf den Boden und begleiten die unausgesetzten Krämpfe der Schlingmuskulatur mit heftigem Flügelschlagen.

Frösche sterben dank ihrer Hautatmung nur sehr langsam an Schlangengift. Wir haben Tiere noch 30 Stunden nach Injektion einer Dosis leben sehen, die ein Kaninchen in 10 Minuten getötet hätte.

Eidechsen und Chamäleons gehen sehr rasch zugrunde.

Blindschleichen und ungiftige Schlangenarten im allgemeinen vertragen im Verhältnis zu ihrem Eigengewicht recht beträchtliche Giftmengen, sind jedoch keineswegs wirklich immun.

Nur die Giftschlangen selbst sind auch gegen riesige Dosen ihres eigenen Giftes vollständig umpfindlich, wie schon Fontana, Weir Mitchell und Viaud Grand Marais festgestellt haben.

Dagegen können sie sehr wohl einer Vergiftung durch sehr entfernte Giftarten erliegen. Starke Dosen von Crotalus- oder Bothropsgift z. B. sind für Kobra und Bungarus direkt tödlich, und wenn man verschiedene Giftschlangen in denselben Käfig sperrt, erlebt man nicht selten, daß sie sich durch wiederholte Bisse gegenseitig umbringen.

Ähnlich verhalten sich viele Avertebratenarten z. B. Blutegel Krebse und Gastropoden (wie z. B. die Schnecke).

Es ist auch innerhalb weiter Grenzen sehr schwierig, die für einen Menschen tödliche Dosis Schlangengift zu bestimmen. Das Giftquantum, das von einer Bißwunde aus zur Resorption gelangt ist eben, wie wir schon oben gesehen haben, von einer Fülle von Momenten abhängig und glücklicherweise nicht immer und unter allen Umständen groß genug, um den Tod herbeizuführen. So beträgt beispielsweise in Indien, der klassischen Heimat der meisten und gefährlichsten Schlangenarten, die Mortalität ca. 35 %, soweit sich dies nach offiziellen statistischen Angaben beurteilen läßt.

Für die verschiedenen Tierarten dagegen können durch entsprechende Versuche die kleinsten eben tödlichen Giftmengen pro Kilogramm Körpergewicht exakt berechnet werden. Als Virus dient getrocknetes Gift, das in immer gleichen Mengen physiologischer Kochsalzlösung oder destillierten Wassers gelöst zur Injektion gelangt.

Die Versuchsresultate der Forscher, die sich mit dieser Frage näher beschäftigt haben, zeigen, daß die respektiven letalen Minimaldosen eines bestimmten Schlangengiftes für Hund, Kaninchen und Meerschweinchen z. B. keineswegs in direktem Verhältnis zu deren Körpergewicht stehen. Auf gleiches lebendes Gewicht berechnet ist die Resistenz gegen das Gift durchaus verschieden. Von anderen Tierarten (z. B. Affe, Schwein, Esel, Pferd) gilt das gleiche: in der Tat erweisen sich Affen viel empfindlicher als entsprechend große Hunde; Esel sind äußerst wenig resistent, während das Pferd es in hohem Grade ist, und schließlich das Schwein von allen diesen Tieren eine tödliche Intoxikation am wenigsten zu fürchten hat.

Ein und dasselbe Quantum (trockenes) Kobragift (1 g) würde ausreichen um 1000 kg Kaninchen
oder 150 kg Hunde
oder 5000 kg Meerschweinchen
oder 1500 kg Ratten
oder 500 kg Mäuse

zu töten. Diese Tatsache, daß die verschiedenen Tierarten verschieden empfindlich gegen ein bestimmtes Schlagengift sind, ist für uns von größter Wichtigkeit. Wir werden sie bei Aufstellung der Gesichtspunkte für die Serumtherapie der Schlangenvergiftung im Auge zu behalten haben.

Ein anderer gleichfalls wichtiger Umstand ist, daß Gifte von verschiedenen Exemplaren derselben Gattung oder aber Giftproben desselben Tieres, die jedoch zu verschiedenen Zeiten gewonnen sind, nicht selten sehr beträchtliche Unterschiede in ihrer Toxicität aufweisen. So fand ich z. B. bei Kobras und Bothrops die in meinem Laboratorium gehalten wurden, daß ihr Gift je nach der Dauer einer etwa voraufgegangenen Hungerperiode oder je nachdem sich die Tiere vor oder nach der Häutung befanden, ganz verschieden virulent war und beim Eindampfen verschieden große Mengen Trockenrückstand gab. In einzelnen Fällen erreichte die Giftigkeit nach längerem Hungern und unmittelbar nach der Häutung den zehnfachen Titer, wie nach einer kräftigen Mahlzeit oder vor der Häutung.

Für das Kobragift läßt sich ganz allgemein folgende Skala der mittleren letalen Dosen aufstellen:

Maus	0,00005 g
Ratte	0,0001 g
Meerschweinchen	0,0002 g
Kaninchen (pro 1000 g Körpergewicht)	0,0005 g
Hund	0,0008 g

Für das Gift der europäischen Vipern (Kreuzotter) sind die entsprechenden Mengen ungefähr sechsmal so groß.

Immerhin ist es unumgänglich notwendig, jedesmal den Giftigkeitskoeffizienten für jedes einzelne gegebene Gift festzustellen, wenn es sich z. B. darum handelt die Schutzwirkung eines Immunserums gegen dieses betreffende Gift zu bestimmen oder exakte physiologische Versuche auszuführen.

Das geeignetste Tier für derartige Bestimmungen ist die weiße Maus, sie ist gegen alle Schlangengifte ungemein empfindlich.

V.

Die Wirkung des Schlangengiftes auf die verschiedenen Organe und Gewebe des Körpers.

Die physiologische Wirkung des Schlangengiftes ist von der im vorausgegangenen geschilderten grundverschieden, wenn das Virus nicht subkutan, sondern auf einem anderen Wege in den Organismus gelangt. Bei direktem Einbringen in den Kreislauf, sei es nun durch den Biß einer Giftschlange selbst oder durch intravenöse Injektion beim Tierversuch, treten die Vergiftungserscheinungen überaus rasch auf. Viperidengift bewirkt fast im Augenblick Blutgerinnung in ausgedehntestem Maße, während im Gegensatz dazu Colubridengift die Blutgerinnung hemmt, so daß im letzteren Falle der Prozeß nicht so rapide verläuft. Aber schon nach wenigen Minuten tritt Atemlähmung ein und die Agone ist ganz kurz.

Die Resorption von den serösen Häuten aus kommt nicht ganz so rasch zustande, ist aber immer noch beträchtlich rascher als vom Unterhautzellgewebe aus. Die Injektion einer letalen Dosis Kobragift in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens oder Kaninchens bewirkt fast gar keine örtlichen Erscheinungen. Der Tod tritt ein, ehe eine Leukocytenanschwemmung zustande kommen kann.

Dagegen bewirkt Viperidengift unmittelbar im Anschluß an die Injektion Austritt sanguinolenter seröser Flüssigkeit in die Peritonealhöhle. Die Blutkapillaren der Serosa werden durch das Gift direkt gelähmt und auf diese Weise durchlässig. Das Tier geht im Laufe von wenigen Minuten bis einigen Stunden ein, je nach der applizierten Dosis. Bei der Sektion findet man dann enorme Blutergüsse in der Bauchhöhle.

Auf Schleimhäuten (Konjunktiven, Vaginal- und Urethralschleimhaut) rufen sowohl Colubriden- wie Viperidengifte — letztere jedoch in höherem Maße — starke entzündliche Erscheinungen hervor, ähnlich wie die Jequirity. Die Kapillaren sind strotzend gefüllt, reichliche Diapedese von Leukocyten hat statt, und beim Kaninchen speziell tritt rasch eitrige Ophthalmie ein.

Gewisse Naja-Arten, die an der Westküste Afrikas heimisch sind, besonders in Senegambien und im Hinterland von Dahomey, sind unter dem Namen hustende Schlangen bekannt geworden. Sie zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, kleinste Tröpfchen ihres Giftes auf weite Entfernungen zu verspritzen, indem sie die Luft aus den Lungen heftig ausstoßen. Die Eingeborenen erklären, daß diese Gifttröpfchen, wenn sie ins Auge gelangen, Erblindung herbeiführen. Diese Angabe stimmt nur insofern, als, wie gesagt, derartige Stoffe Blennorrhöe verursachen, die manchmal sehr schwer sein mögen, aber ebenso wie die experimentell bei Tieren erzeugten Ophthalmien unter sorgfältiger Behandlung in wenigen Tagen abheilen können.

Bei der Resorption vom Magendarmkanal aus macht das Gift der Colubriden perniciöse Erscheinungen nur bei ganz jungen, noch säugenden Tieren. Ausgewachsene können große Mengen ungestraft einführen. Nicht das gleiche gilt für Viperidengifte. Das Gift von Bothrops z. B. bewirkt in genügend großen Quantitäten heftige Entzündungen der Magenschleimhaut und die Tiere gehen an intestinalen Hämorrhagien zugrunde, noch bevor die Symptome der Intoxikation des Zentralnervensystems deutlich in die Erscheinung treten. Dieser Umstand erklärt in vieler Hinsicht die Widersprüche, denen wir auf diesem Gebiet in den

Arbeiten verschiedener Forscher begegnen. Die einen versichern auf das bestimmteste, daß Schlangengift innerlich genommen, völlig unschädlich sei und raten sogar die vergifteten Bißwunden auszusaugen, um so die Resorption zu vereiteln. Andere wieder, unter ihnen Fayrer, Richards, Weir Mitchell konnten bei Tauben und Hühnern durch Verabreichung von Kobra- und Krotalussekret in der Nahrung letale Vergiftungen erzeugen. C. T. Martin, der mit dem Gift von Pseudechis (australische Colubridenart) an Ratten experimentierte, konnte seine Tiere eine ganze Woche lang mit Brot und Milch füttern, welcher pro Mahlzeit und Tag das 100fache der bei subkutaner Injektion tödlichen Dosis beigemengt war. Diese Unschädlichkeit des Colubridengiftes für ausgewachsene Tiere erklärt sich daraus, daß Speichel und Pankreassaft die Proteinkörper, an die das toxische Prinzip gebunden ist, sehr rasch verändern und zerstören. In den Fäces findet sich davon nicht mehr die Spur.

Die Drüsenabsonderungen gebissener Menschen oder solcher Laboratoriumstiere, deren Vergiftung erst in einigen Stunden zum Tode führt, sind sehr häufig deutlich toxisch. Vom Harn z. B. ist dies verschiedentlich nachgewiesen worden. C. Francis[10]) und Sir James Fayrer teilen nach dieser Richtung hin Beobachtungen über die Ausscheidung resorbierten Giftes durch die Brustdrüse mit. Im Jahre 1893 starb in Madras eine arme Frau am Biß einer Kobra. Ihr Kind, das sie stillte, starb wenige Stunden später unter deutlichen Symptomen von Schlangenvergiftung, obgleich es selbst nicht gebissen worden war und nach der Verletzung der Mutter nur einmal die Brust bekommen hatte.

Die histologischen Veränderungen bei Schlangenvergiftung sind in erster Linie von Hindale[11]), Karlinski[13]), Nowack[18]) und L. Vaillant-Hovius[22]), eingehend studiert worden.

a) Leber. Die Leber ist das am meisten betroffene Organ. Die Veränderungen am Parenchym sind die gleichen, mag es sich um Viperiden- oder um Colubridengift handeln; die Stärke hängt im wesentlichen von dem Grade und der Gesamtdauer der Vergiftung ab. „Wenn der Tod sehr rasch nach der Injektion eintritt, findet man das Protoplasma nur etwas getrübt und gekörnt. Die Granulationen färben sich sehr deutlich am Rande, die Mitte bleibt farblos. Dauert dagegen der Prozeß länger, verläuft die Vergiftung langsam, so zieht sich das Protoplasma an gewissen Stellen zusammen; so entstehen undeutlich abgegrenzte Vakuolen in der Zelle. Schließlich wird der Zellinhalt zum Teil nekrotisch und zerfällt. In diesem Falle sind auch die Kerne bereits in Mitleidenschaft gezogen: ihr Umriß ist zwar noch scharf und deutlich; aber sie enthalten nur sehr wenig Chromatin in Gestalt kleiner Körnchen. Der Kernsaft färbt sich bei der Darstellung mit basischen Farbstoffen leicht mit, weil die Chromatinsubstanz eben zum Teil in Lösung gegangen ist. Je stärker die protoplasmatischen Veränderungen ausgesprochen sind, desto intensiver leiden auch die Zellkerne; je nach dem Grade der Nekrose des Protoplasmas nimmt das Kernchromatin ab und büßt seine Färbbarkeit ein, und schließlich bleibt von der Leberzelle nichts als ein wenig körniges Protoplasma ohne Kern übrig“ (Nowack).

Bei Tieren, die die Vergiftung längere Zeit überleben, findet man fettige Degeneration und Veränderungen an den Gallenwegen. Mitunter ist das Epithel der Gallengangkapillaren gequollen, trübe geschwellt und vakuolisiert.

b) Niere. In der Niere finden sich gleichfalls ausgebreitete Veränderungen. In den Glomeruli erstrecken sie sich meist auf alle Bestandteile: die Gefäße der Malpighischen Knäuel sind erweitert, die Gefäßwand manchmal geborsten, so daß Blut frei in den Kapselraum austritt. Letzterer ist im übrigen mit körnigem Exsudat erfüllt, das um so reichlicher ist, je langsamer die Vergiftung verlief. Das Epithel der Bowmanschen Kapseln zeigt trübe Schwellung, die Kerne färben sich schlecht (Vaillant-Hovius).

In den Tubuli contorti zeigen die Veränderungen eine weitgehende Analogie mit den in der Leber beschriebenen: Körnchenbildung, Vakuolisation, Degeneration der Kerne. Das Lumen der Kanälchen wird durch nekrotische abgestoßene Zellen verlegt. Das gleiche Bild bieten die Henleschen Schleifen dar. In den geraden und den Sammelkanälen stößt sich das Epithel mitunter in größeren Verbänden ab. Granulierte Zylinder und epithelialer Detritus verschließen das Lumen. Die Gefäße sind im allgemeinen maximal erweitert, manchmal eingerissen, so daß kleine interstitielle Hämorrhagien entstehen, die ihrerseits weitere Parenchymläsionen herbeiführen können.

c) Milz, Herz und Lungen. In der Milz fand Nowack lediglich geringe fettige Degeneration; ebenso an den Muskelfasern des Herzens. Letzteres zeigt als Organ vor allem hämorrhagische Infiltration in den Randpartien, die große Masse ist frei. Stärker sind die Veränderungen in den Lungen. Sie enthalten eine Menge kleiner Infarkte, in deren Nachbarschaft die Kapillaren überaus weit, die Lungenbläschen sehr klein und eng sind.

Die soeben geschilderten Veränderungen an den sog. visceralen Organen zeigen eine frappante Ähnlichkeit mit dem path.-anatomischen Befunde an Personen, die dem gelben Fieber erlegen sind. Diese Analogie ist von mehreren Forschern, u. a. von Sanarelli ganz besonders hervorgehoben worden und sie ist vermutlich auch die Mutter der therapeutischen Idee, das gelbe Fieber mit Schlangengiftimmunserum zu behandeln (Dyer).

d) Nervenzentren. Es ist überaus schwierig, die durch das Schlangengift am Nervensystem verursachten Störungen auch nur mit einiger Exaktheit zu analysieren. Ihre Intensität ist erstens eine Funktion der Zeit, die zwischen der Einbringung des Giftes und dem Tod liegt. Zweitens hängt sie im weitesten Maße von der Art und Herkunft des Toxins ab. Wir haben schon gesehen, daß Viperidengift fast ausschließlich am Blut angreift, in dem es dieses zur Gerinnung bringt; auf die Nervenzellen wirkt es nur ganz schwach ein. Im Gegensatz dazu finden wir in letzteren bei Colubridenvergiftung deutliche Veränderungen des Chromatins. Die Nisslschen Körperchen sind völlig aufgelöst und in eine körnige Masse verwandelt. In der Mehrzahl der Stichochromen ist nicht einmal das Reticulum deutlich erkennbar. Die Kerne sind getrübt, die Nucleoli gebläht und zum Teil zerfallen.

Fred. Bailey[3]) fand in den Vorderhörnern die Mehrzahl der Ganglienzellen normal; nur ganz vereinzelte zeigten die Zeichen der akuten körnigen Degeneration: Vermehrung der chromophilen Körnungen und, in einigen Zellen, völligen Schwund der Chromatinsubstanz.

Vom funktionell-physiologischen Standpunkte aus schädigt das Gift der Kobra in erster Linie die Zentren im verlängerten Mark, besonders die Vaguskerne. Erstes Frühsymptom ist eine allmählige Herabsetzung der Funktion in Nervenzellen, die mit Vagus, Accessorius und Hypo-

glossus im Zusammenhang stehen; später erlischt dann die Erregbarkeit der Nervenendplatten in den Muskeln, so daß ein der Curarevergiftung sehr ähnliches Bild entsteht.

Viperidengift hat, in schwachen Dosen, eine lähmende Wirkung auf die Reflexerregbarkeit des Rückenmarks. Aber es ist die Frage, ob dies nicht ausschließlich ein Effekt der Blutveränderungen ist, die ja hier die Szene gänzlich beherrschen.

Ich habe viel im Sinne der Frage experimentiert, ob Gehirn, Bulbus oder Rückenmark eines für Kobragift empfänglichen Tieres imstande ist, dieses Gift in vitro zu fixieren, ähnlich wie es dies mit dem Tetanustoxin tut (Wassermann und Takaki). Ich fand dabei, daß, wenn man etwas Pulpa von den Großhirnhemisphären resp. vom Bulbus mit letalen Giftmengen verreibt, gut wäscht und zentrifugiert, um jeden Überschuß nicht fixierten Virus zu entfernen und das Präparät injiziert, die so behandelten Tiere gleichfalls einer typischen Vergiftung erliegen, allerdings mit einer Verspätung von 4—10 Stunden gegen die Kontrolltiere, die bei der gewählten Dosis in etwa 2 Stunden eingingen. Es findet also in der Tat eine partielle Verankerung des Giftes an die nervösen Gewebe statt; nur kann man hieraus ebensowenig wie beim Tetanustoxin etwa den Schluß auf ein Antitoxingehalt dieser Gewebe gegenüber dem Schlangengiftvirus schließen. Denn Tiere, die in ein Bein eine Gehirnemulsion, ins andere die (in 2 Stunden) letale Giftmenge injiziert bekommen, sterben genau so rasch, wie die Kontrollen.

L. Rogers[21]) hat ähnliche Versuche mit dem Gifte von Enhydrina (Hydrophidae) angestellt und ist bei Anwendung von Taubenhirnemulsionen zu genau den gleichen Resultaten gelangt

Flexner und Noguchi[9]) haben mittels intracerebraler Injektionen vergleichende Untersuchungen über die Giftigkeit von Krotalusgift einerseits, Kobragift andererseits angestellt und haben folgendes feststellen können. Kobragift, das vorher auf 75° erhitzt und von seiner hämolytischen Komponente befreit ist, erzeugt unmittelbar im Anschluß an die Einbringung ins Gehirn Krämpfe und Lähmungen, ganz im Gegensatz zur subkutanen und intraperitonealen Applikation. Die letale Dosis aber ist in allen drei Fällen die gleiche: 0,1 mg für ein Meerschweinchen.

Von Viperidengift (Krotalus), das $^1/_2$ Stunde auf 75° erhitzt worden war, an sich sehr wenig Neurotoxin enthält und durch die Vorbehandlung den Blutungen erzeugenden Faktor eingebüßt hatte, bewirken 0,5 mg direkt ins Gehirn von Meerschweinchen eingebracht, nur ganz vorübergehende, nicht zum Exitus führende Störungen; während von frischem Gift 0,05 mg genügen, um in 3 Stunden unter ausgedehntesten Hämorrhagien den Tod herbeizuführen. Diese letzte Dosis (0,05 mg) ist 20 mal kleiner als die letale Minimaldosis bei subkutaner Injektion.

Daraus erhellt deutlich, daß in dem speziellen Fall des Krotalustoxins nicht ein Neurotoxin die eigentliche Noxe ist, sondern eine andere Substanz, die Flexner und Noguchi „Haemorrhagin" nennen und deren Angriffspunkt die Blutelemente und die Gefäßendothelien sind.

In fast allen Viperngiften ist diese Substanz nachweisbar enthalten.

e) Wirkung aufs Blut. Bei der Autopsie an Schlangenvergiftung gestorbener Tiere findet man das Blut im Herzen und in den großen Gefäßen bald zu einer einzigen Masse erstarrt, bald ganz dünnflüssig und in manchen Fällen dunkelfarbig, etwa wie Pflaumenmus, während es in anderen eine prachtvoll rote durchsichtige Beschaffenheit hat. Das Gesamtsekret enthält noch Substanzen, und zwar in verschiedenen Massen-

verhältnissen, von denen einige besondere biologische Affinitäten zum Fibrinferment oder zum Fibrin selbst haben; andere, die Erythrocyten, noch andere, die die Leukocyten angreifen; schließlich solche, die hauptsächlich die Gefäßendothelien schädigen.

Das hämolytische Prinzip der Schlangengifte ist in den letzten Jahren von mehreren Forschern zum Gegenstand eingehender Untersuchungen gemacht worden (W. Stephens, Phisalix, Flexner und Noguchi, Calmette, Kyes, Noc).

Jedes Schlangengift wirkt hämolytisch, aber nicht alle tun dies in gleichem Maße. Zu vergleichenden Studien nimmt man am besten, wie Noc es getan hat, eine bestimmte Gifteinheit, und zwar 1 mg, als Basis und bestimmt möglichst exakt die Zeit, in der diese Dosis in vitro 1 ccm einer 50 % Aufschwemmung von Pferdeerythrocyten in physiolog. Kochsalzlösung vollständig auflöst. Wichtig ist vor dem Versuch die Erythrocyten durch mehrfaches Waschen und Zentrifugieren mit physiol. (0,8 %) NaCl-lösung ganz serum- resp. plasmafrei zu machen.

Pferdeblut ist allen anderen Blutarten bei weitem vorzuziehen, weil es eine mittlere und ziemlich konstante Empfindlichkeit für die Toxine besitzt. Andere Erythrocythenarten z. B. vom Rinde, Ziege, Hammel, Kaninchen sind weniger empfindlich. Affen-, Meerschweinchen-, Ratten- und Menschenblut zeigt umgekehrtes Verhalten.

Wenn die Blutkörperchen sorgfältig gewaschen waren, ist kein Schlangengift allein imstande die Hämolyse herbeizuführen. Hierzu ist vielmehr notwendig, der Kombination entweder eine Kleinigkeit frischen oder inaktivierten normalen Pferdeserums (z. B. 0,2 ccm) oder die gleiche Menge einer 0,1 ‰ Lecithinlösung in physiologischer Kochsalzlösung zuzusetzen*).

Das Schlangengift löst also rote Blutkörperchen nur auf, wenn ein Aktivator in Gestalt von Normalpferdeserum oder Lecithin zur Verfügung steht.

Die Lecithinlösung stellt man so her, daß man 1 g Lecithin in 100 ccm reinen Methylalkohol auflöst. 1 ccm dieser Stammlösung wird mit 9 ccm physiol. NaCl-Lösung verdünnt und davon mit 1 ccm in 9 ccm physiol. NaCl-Lösung die Endverdünnung hergestellt. Mit dieser Lösung von 1:10000 wird die Reaktion angesetzt (Kyes[19]).

Die Unterschiede im hämolytischen Vermögen der einzelnen Giftarten bei Aktivierung mit Normalserum oder Lecithin sind sehr beträchtlich. Am aktivsten sind Kobra- und Bungarusgift. Das Toxin von Vipernarten, besonders das von Lachesis wirkt bedeutend langsamer. Während z. B. 1 mg Kobragift 1 ccm 5 % Blutaufschwemmung in 5—10 Min. vollständig auflöst, braucht die gleiche Dosis Gift von Vipera Russelii 30 Min.; das von Lachesis lanceolatus sogar 3 Stunden.

Das Schlangengifthämolysin ist ziemlich hitzebeständig. Es wird erst bei Temperaturen über 68° allmählich inaktiviert. Kobragift ist noch bei 75° schwach hämolytisch; bei 80° wird es ganz unwirksam.

Durch diese Hitzebeständigkeit erklärt sich die Tatsache, daß das Serum von Pferden, die mit stark erhitztem Virus immunisiert sind, deutliche Antikörperwirkung zeigt und sowohl in vitro, wie in vivo die Auflösung der gefährdeten Blutelemente verhindert.

---

*) Siehe Sachs, dieses Handbuch.

Neben dem hämolytischen Vermögen haben manche Schlangengifte, namentlich von Viperiden, auch noch agglutinierende Eigenschaften gegenüber roten Blutköperchen. Das agglutinierende Prinzip ist nicht identisch mit dem hämolytischen: während das erstere auch bei 0° fast momentan seine Wirkung entfaltet, geht die Hämolyse bei dieser Temperatur garnicht oder doch nur äußerst langsam vor sich.

Erhitzung auf 75° zerstört das Agglutinin (Flexner und Noguchi).

Auch die weißen Blutkörperchen unterliegen der Einwirkung der Schlangengifttoxine. Sie läßt sich in vitro an leukocytenreichen Exudaten nachweisen, die man etwa durch Injektion abgetöteter Megatheriumkulturen in die Peritoneal- oder Pleurahöhle leicht verstellen kann; einige Stunden nach der Injektion entnimmt man mittels fein ausgezogener Glaskapillaren etwas von diesem Exsudat und setzt kleine Mengen Toxin hinzu. Man sieht dann unter dem Mikroskop, daß zuerst die großen mononuklearen später die multinukleären Leukocyten aufgelöst werden. Die Lymphocyten widerstehen am längsten.

Cobragift ruft diese Leukolyse bedeutend rascher und intensiver hervor als Crotalus (Flexner und Noguchi).

Noc hat gezeigt, daß Colubridengift in vitro keine Blutgerinnung bewirkt, weder am Plasma, noch am Gesamtblut, wenn die spontane Gerinnung durch eine der üblichen physiologischen Methoden (Zusatz von Blutegelextrakt, Oxalsäure usw.) hintangehalten wurde.

Dagegen befördern die Gifte der Vipernarten alle mehr oder minder die Koagulation. Die fragliche Substanz ist durch Alkoholbehandlung fällbar; daß wieder aufgelöste Präzipitat hat die gleichen Eigenschaften, wie das Originalgift. In Anbetracht unserer zurzeit noch sehr lückenhaften Kenntnisse über die Natur der Fibrinfermente (Plasmase der Autoren) ist es schwer zu entscheiden, ob das Gift lediglich die Rolle eines Aktivators spielt, oder selbst ein „fibrinogenes" Ferment ist.

7. Proteolytische Wirkungen.

Flexner und Noguchi, Delezenne[6]) und Noc[19]) haben die proteolytische Wirkung des Schlangengiftes auf Gelatine, Fibrin und Ovalbumin eingehend geprüft.

Es war bereits früher bekannt, daß gewisse Sorten unter diesen Giften in vivo ausgesprochen lytisch auf Gefäßendothelien und auch auf die muskulären Elemente wirken. Delezenne hat dann im Schlangengift eine Kinase nachgewiesen, ähnlich der Leukokinase der weißen Blutkörperchen und der sog. Enterokinase. Das Gift greift durch Erhitzen zur Gerinnung gebrachtes Ovalbumin selbst nicht an, wohl aber aktiviert es reinen an sich inaktiven Pankreassaft in ganz hervorragendem Maße.

Bei weitem am reichsten an Kinase hat sich das Gift von Lachesis herausgestellt. Gelatine wird davon vollkommen verdaut und verliert ihr Erstarrungsvermögen auch bei kürzerer Einwirkung.

Lannoy[15]), der mit löslichen Eiweißkörpern (Casein, Serumalbumin vom Rind) experimentierte, konnte seinerseits feststellen, daß das Eiweißmolekül von reinem Cobra- und Viperngift sehr wohl angegriffen wird: die angeführten Eiweißarten blieben auch nach Zusatz von Formaldehyd löslich und waren aus ihrer Lösung durch Essigsäure nicht mehr fällbar. Die hydrolytische Spaltung geht nie bis zum Pepton; sie führt nur zur Bildung von Albumosen, die die Biuretreaktion geben.

Die Wirkung des Giftes auf Fibrin läßt sich sehr gut in vitro beobachten, wenn man kleine Fibrinstückchen, aus geronnenem Ochsen-, Kaninchen- oder Vogelblut, die vorher sorgfältig ausgewaschen sein

müssen, ohne sie höheren Temperaturen auszusetzen mit genügend großen Giftmengen — z. B. 0,01 g — zusammenbringt. Solche Fibrinstückchen zerfallen dann rasch und werden je nach der Giftart schneller oder langsamer aufgelöst. Hierbei ist Viperidengift am wirksamsten. Die Colubridentoxine wirken langsamer.

Diesem proteolytischen Vermögen des Schlangengiftes entspricht ziemlich genau ihre Gerinnung erzeugende, resp. auch Gerinnung hemmende oder verflüssigende Eigenschaft, z. B. gegenüber Pferde- und Kaninchenblut, so daß die Eigentümlichkeit der Viperidengifte mehr oder weniger rasch die Gerinnsel wieder aufzulösen, die sie selbst gesetzt hatten, auf das Vorhandensein eines energisch wirkenden proteolytischen Ferments neben dem die Fibrinbildung auslösenden, ohne weiteres zurückzuführen ist.

8. Sonstige physiologische und chemische Eigenschaften des Schlangengiftes. (Diastatische Wirkung). Schon 1884 hat de Lucerda in seinen Vorlesungen über das Gift der brasilianischen Giftschlangen die Resultate seiner Untersuchungen über das diastatische Vermögen dieser Körper veröffentlicht. Er hatte gefunden, daß sie Fett emulsionieren, Milch koagulieren und aus Stärke keinen Zucker bilden. Jedoch waren die Giftlösungen mit denen er arbeitete keineswegs steril, so daß die Annahme berechtigt war, daß Fäulnisprozesse seine Reaktionen beeinflußt hätten.

Wehrmann[24]) und später Lannoy[15]) haben daher diese Untersuchungen wieder aufgenommen. Sie konnten nachweisen, daß die Schlangengifte weder Stärke noch Inulin spalten.

Rohrzucker wird durch Kobra- und Viperngift in geringem Maße invertiert.

Glykoside (Amygdalin, Koniferin, Salizin, Arbutin und Digitalin) greifen sie nicht an; sie enthalten demnach kein Emulsin.

Ch. Féré[21]) hat den Einfluß in das Eiweiß eingebrachten Schlangengiftes auf die Entwicklung des Hühnerembryos untersucht. Er fand, daß 83 % der mit je 0,05 mg Viperngift geimpften und nach 72 Stunden Bebrütung untersuchten Eier verschiedene Entwicklungsanomalien aufwiesen.

9. Wirkung der normalen Körperenzyme auf Schlangengift.

Die Schlangengifte werden durch bestimmte im normalen Körper tätige Enzyme wesentlich modifiziert oder sogar gänzlich zerstört. Lacerda, Weir Mitchell, S. Fayrer, L. Brunton haben schon vor langer Zeit den Beweis erbracht, daß ausgewachsene Säugetiere ohne Störung das mehrfache der tödlichen Dosis vertragen, wenn das Gift direkt in den Magen gebracht wird.

Ich selbst habe zu wiederholten Malen diese Tatsache bestätigen können; dabei fand ich aber, daß bei ganz jungen, noch säugenden Exemplaren das Gift sehr wohl vom Magendarmkanal aus resorbiert werden kann, so daß die Tiere auf diese Weise an Dosen eingehen, die nur um ein geringes die letale Dosis für subkutane Applikation übersteigen — ein Beweis mehr, für die beträchtliche Durchlässigkeit der Darmmukosa junger Tiere für Toxin.

Wehrmann[24]) und Carrière[5]) haben im Speziellen untersucht, welchen Veränderungen Schlangengift im Intestinaltraktus von Kaninchen ausgesetzt ist. Sie fanden, daß letztere die 600 fache D. L. innerlich ausgezeichnet vertrugen. Bei wiederholten derartigen Gaben, konnten diese Autoren übrigens, im Gegensatz zu Befunden von Fraser[23]) feststellen, daß auf diese Weise keine Immunität erzeugt werden kann, nicht einmal gegen die einfache subkutan gegebene D. L. Im Blut sind keine

Antikörper nachzuweisen. Das Ptyalin des Speichels, Pankreassekret und Galle zerstören in vitro das Gift der Kobra. Man wird also wohl mit Sicherheit die Unschädlichmachung des Giftes im Intestinaltraktus gleichfalls auf die Wirkung jener dreier Faktoren zurückführen können. Jedenfalls spielen die Darmbakterien keine Rolle dabei, auch der reine Darmsaft ist unwirksam. Magensaft dagegen ist in der angegebenen Richtung aktiv, wenn auch nur ganz wenig. Fast ebenso stark wie Pankreassaft wirkt Papain.

Fraser hat die energische destruierende Wirkung von Galle auf Kobragift, schon 1895 experimentell festgestellt. Aber im Gegensatz zu der Annahme dieses Forschers hat sich später ergeben, daß der Galle keine antitoxischen, gegen Schlangengift gerichteten Eigenschaften zukommen, weder präventive, noch therapeutische: sie entfaltet eben ihre zerstörende Wirkung nur im Reagenzglase.

Aus dem bisher Gesagten geht hervor, daß Schlangengift in empfänglichen Organismen die kompliziertesten Wirkungen auf Gewebe und Säfte hervorbringen kann. Auf die Nervenzellen wirkt das Neurotoxin, die Gefäßendothelien werden von Hämorrhagin (Flexner und Noguchi), die Erythrocyten vom Hämolysin angegriffen; Fibrin und Muskelfasern unterliegen der Wirkung eines proteolytischen Ferments und schließlich wird das Fibrinferment durch eine Art Thrombase in seiner Wirkungsweise entschieden beeinflußt. Auch auf Leukocyten äußert sich die Wirkung des Schlangengiftes in vivo (Chatenay[4]) sowohl, als auch — nach den Untersuchungen von Flexner — in vitro.

Es ist ohne weiteres klar, daß unter diesen Umständen auch die Verteidigungsmittel gegen einen so vielseitigen Feind überaus kompliziert sein müssen.

Bei schwächeren Graden von Vergiftung reagiert der Organismus unter Intervention seiner weißen Blutzellen: es besteht Hyperleukocytose, die von mehr oder minder bedeutendem Fieber begleitet ist. Nach einigen Stunden bereits ist alles zur Norm zurückgekehrt.

Wenn man die Einverleibung solcher nichtletalen Dosen in Abständen von einigen Tagen mehrmals wiederholt, erscheinen im Serum sehr bald Antikörper gegen das betreffende Gift.

Ist die Dosis stark genug, um das Tier zu töten, so beobachtet man sehr bald nach der Injektion Absinken der Temperatur und das Auftreten einer Hypoleukocytose; letztere ist um so ausgesprochener, je näher die applizierte Giftmenge der jeweiligen D. L. kommt. Nach sehr großen Gaben hat das Phänomen keine Zeit sich völlig zu entwickeln.

Es ist somit höchst wahrscheinlich, daß bei der Schlangenbißvergiftung ebenso wie bei Vergiftungen mit Bakterientoxinen, die Leukocyten die Hauptrolle im Verteidigungskampfe des Organismus spielen. Nicht nur, weil ihre vitalen Zellsekrete das betreffende Gift verdauen und dadurch direkt zerstören können, sondern auch, weil die Leukocyten, wenn nicht als einzige, so doch wenigstens als Hauptquelle der Antikörper (Amboceptoren) gegen jene Gifte anzusehen sind.

Von diesen Antikörpern wird nun im II. Band (Antitoxine) eingehend die Rede sein.

Literatur.

1) Armstrong, Snake Commission Report 1874.
2) Bonaparte, L., Gazetta Toscana des Scienc. med. 1893, pag. 169.
3) Bailey, Med. Record 1900, 15. Sept.
4) Chatency, Les réactions leucocytaires vis à vis de certaines toxines. Thèse de Paris 1894.
5) Carrière, Ann. de l'Inst. Pasteur 1894.
6) Delezenne, Compt. rend. de l'Acad. des Scienc. de Paris 1902. Août.
7) Féré, Soc. de Biologie 1906. Janvier.
8) Fraser, Brit. med. Journ. 1895 u. 1897.
9) Flexner und Noguchi, Const. of snake venom and snake seren. Univ. Pensylv. 1902.
10) Francis, Indian Annals 1868. July.
11) Hindale, Medical News Philadelphie 1889.
12) Kanthak, Journ. of physiol., Bd. XIII.
13) Karlinski, Fortschr. der Med. Berlin 1890.
14) Kyes, Berliner klin. Wochenschr. 1902, 1903 und 1904.
15) Lannoy, Thèse de Paris 1903, Nr. 1138.
16) Mitchel, Weir und Reichert, Smithsonian Institution 1860 und 1866.
17) Martin und Smith, Proc. of the Royal soc. of New-South-Wales 1892.
18) Nowack, Ann. de l'Inst. Pasteur 1898.
19) Noc, Ann. de l'Inst. Pasteur 1904. Juni.
20) Pedler, Proc. of the Royal Soc. London 1878.
21) Rogers, Proc. of the Royal Soc. London 1903, Vol. LXXI.
22) Vaillant, Thèse de Bordeaux 1902.
23) Wolfenden, Journ. of physiol. 1886.
24) Wehrmann, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897 und 1898.

Antigene pflanzlichen Ursprunges.

XIV.

Ricin, Abrin, Robin.

Von

Prof. M. Jacoby

in Berlin.

Die Pflanzenstoffe Ricin und Abrin sind von EHRLICH[1]) 1891 in ihrer Eigenschaft als Antigene erkannt worden. Sie gehören überhaupt mit zu den ersten Substanzen, von denen die Fähigkeit der Antikörperbildung nachgewiesen wurde. Die Phytotoxine, zu denen außer dem Ricin und Abrin auch noch das Crotin, Robin und Phallin gehören, eignen sich schon deshalb besonders für Versuche über Antigene, weil wenigstens Ricin, Abrin und Crotin zu einem verhältnismäßig geringen Preise in gebrauchsfähigem Zustande von den chemischen Fabriken, insbesondere von Merck in Darmstadt, bezogen werden können.

I. Ricin.

Das von Merck käuflich zu beziehende Ricin wird nach den Angaben von KOBERT folgendermaßen gewonnen:

„Die pulverisierten Samen werden mit Äther, dann auch noch mit Alkohol erschöpft, um Fette, Lecithin, Cholesterin, Alkaloide usw. zu beseitigen, endlich mit 10 proz. Kochsalzlösung bei 37—40° C 24 Stunden mazeriert und und das Filtrat der Mazeration durch Eintragen von Ammonsulfat bis zur Sättigung gefällt. Der Niederschlag wird bei Zimmertemperatur getrocknet und kann so jahrelang aufbewahrt werden, wobei er allerdings allmählich unlöslich und unwirksam wird. Will man das dem Niederschlag noch reichlich anhaftende Chlornatrium und Ammonsulfat entfernen, so kann man dies durch Dialyse, denn unsere Substanz dialysiert nicht."

Aus dem käuflichen Präparat kann man hochwirksame Gifte isolieren. Diese gereinigten Gifte unterscheiden sich von dem Ausgangsmaterial dadurch, daß sie vom Trypsin zerstört werden, je nach der Methode der Reinigung besitzen sie noch oder nicht mehr die Eiweißreaktion, so daß diese Reaktionen auf indifferente Beimengungen zurückgeführt werden müssen.

Das Ricin ist am besten in dünnen Salzlösungen löslich. Für biologische Experimente verwendet man zweckmäßig Lösungen in physiologischer Kochsalzlösung, die man immer frisch bereitet. Man erhält bei

so geringem Salzzusatz allerdings nicht so klare Flüssigkeiten wie bei größerem Zusatz von Kochsalz; jedoch ist die Giftigkeit ebenso groß und man entgeht namentlich bei Reagensglasversuchen manchen Fehlerquellen. Die Präparate von Merck haben im Laufe der Jahre nicht immer dieselbe Giftigkeit. Da man bei vielen Fragen selbst für Versuchsreihen von mehreren Jahren mit einigen Gramm auskommt, hat man aber die Möglichkeit, über konstant wirksame Gifte, soweit Vergleiche nötig sind, zu verfügen. Allmählich verändern sich auch die Trockenpräparate, ohne daß aber die quantitativen Verhältnisse eine zusammenhängende Versuchsreihe stören können.

Das Ricin ist ein sehr starkes Gift: 0,1 mg einiger käuflicher Präparate töten ein Kilo Kaninchen bei subkutaner Injektion schnell und sicher. EHRLICH[1]) berechnete für das ihm 1891 zur Verfügung stehende Präparat, daß 1 g dieses Handelsproduktes imstande war, $1\frac{1}{2}$ Millionen Meerschweinchen zu töten. Bei weißen Mäusen fand EHRLICH die letale Dosis schwankend, je nach der Besonderheit der Rasse, des Alters, der Ernährung und anderer individueller Verschiedenheiten. Injizierte er für 20 g Lebendgewicht 1 ccm subkutan, so war immer eine Lösung 1:200000 eines Merckschen Ricins, das 30% Asche enthielt, ausreichend, um den Tod binnen 2—4 Tagen herbeizuführen. Bei Präparaten, die im Laboratorium gereinigt sind, steigt die Giftigkeit ganz enorm und zwar, wie gegenüber einer Annahme von MENDEL und OSBORNE betont werden muß, auch bei Präparaten, die keine Spur von Eiweißreaktionen mehr zeigen. Derartige Präparate im Großen darzustellen, würde für biologische Zwecke meistens nicht von Interesse, außerdem wegen der großen Labilität der isolierten Substanzen nicht leicht sein.

Durch fraktionierte Salzfällung mit Ammonsulfat oder Magnesiumsulfat und durch Dialyse kann man recht wirksame Präparate erhalten. So isolierten OSBORNE, MENDEL und HARRIS[5]) eine Albuminfraktion, deren Toxizität pro Kilo Kaninchen 0,0005 mg betrug. JACOBY[4]) war es schon früher durch einen besonderen Kunstgriff gelungen, Präparate darzustellen, deren Giftigkeit der Toxizität der neuerdings von den amerikanischen Autoren erhaltenen Albuminpräparate nicht nachsteht, die aber keine Eiweißreaktionen mehr zeigen. OSBORNE, MENDEL und HARRIS bestätigten den Befund JACOBYS, daß gereinigte Präparate sehr empfindlich gegen Trypsin sind, während es für die käuflichen Präparate lange feststeht, daß sie sehr trypsinfest sind. Da nun JACOBYS Präparate ebenso giftig sind wie OSBORNES, ohne Eiweißreaktionen zu zeigen, aber auch das Kriterium der Angreifbarkeit durch Trypsin besitzen, so dürfte der Schluß, daß die Konstitution des Ricins ganz dunkel ist, berechtigter sein, als die Annahme OSBORNES, daß er in seinem Albumin das „Ricin" in Händen gehabt hat.

OSBORNE, MENDEL und HARRIS Versuche lehren eben wieder, daß es mit der Zeit immer mehr gelingt, die grob nachweisbaren Eiweißsubstanzen in den Toxinpräparaten als biologisch indifferent zu erkennen und es wird ihrem Albumin dasselbe Schicksal beschieden sein, wie den zahlreichen toxischen Globulinen und ähnlichen „Toxalbuminen".

Meine eigenen Versuche hatten Erfolg durch einen glücklichen Kunstgriff, der sich von der gewöhnlichen Bahn der Isolierungsmethoden in zweckentsprechender Weise fernhielt. Es wurde die Erfahrung benutzt, daß man aus trypsinhaltigen Pankreasextrakten sich wirksame Fermentlösungen durch vorsichtiges Manipulieren herstellen kann, wenn man die Lösungen zunächst mit Ammonsulfat bis zu 60% Sättigung aussalzt und

dann das Filtrat mit dem Salz bis zur Ganzsättigung versetzt. Dabei ist ganz gleichgültig, für den vorliegenden Zweck, daß Trypsin, wie Mays gefunden, aber auch Jacoby nie bestritten hatte, auch in die Fraktion bis 60% Sättigung hineingeht. Denn auch Mays fand in Bestätigung der Angaben von Jacoby, daß auch das Filtrat wirklich Ferment enthält. Mays hat offenbar nicht eingesehen, daß es mir nur darauf ankam, von der ersten Fraktion freie Fermentlösungen zu erhalten. Wie wir gleich sehen werden, brauchte ich Fermentlösungen, die bei der partiellen Ammonsulfatsättigung möglichst geringe Niederschläge geben.

Wie ich in Übereinstimmung mit den neuesten Arbeiten gefunden hatte, wird das Ricin bei Sättigung mit Ammonsulfat bis zu 60% ausgesalzen. Ich versuchte nun, ob es nicht gelingt, die Hauptmasse der das Ricin begleitenden Eiweißsubstanzen dadurch von dem Toxin zu trennen, daß ich durch Verdauung die Eiweißkörper in diffusible und schwer aussalzbare Substanzen verwandelte. Das gelang in der Tat und indem ich das oben erwähnte, besonders präparierte Trypsin benutzte, konnte ich am Schlusse der Verdauung aus den Lösungen ein eiweißfreies Ricin durch Aussalzen mit Ammonsulfat bei 60% Sättigung und Dialyse isolieren, das seine Wirksamkeit quantitativ behalten hatte. Da es außer etwas Ammonsulfat keine sichtbaren Bestandteile auch bei mikroskopischer Untersuchung enthielt, so war die Giftigkeit der Trockensubstanz eine mindestens ebenso große wie die des giftigen Albumins von Osborne. Ich habe auch, wie schon erwähnt, in meiner Arbeit erwähnt, daß das reine Präparat durch Trypsin verdaulich war. Es hatte also dieses Kriterium gereinigten Ricins, war aber nicht mit nachweisbarem Albumin gemengt.

Wenn ich meine Methode so eingehend geschildert habe, so geschah das, weil Toxinisolierungen, die dem spezifischen Zwecke angepaßt waren, sich nur spärlich in der Literatur finden. Den stets wiederkehrenden Mißverständnissen gegenüber sei betont, daß der Schluß immer nur lauten kann: Die chemische Natur des Ricins ist unbekannt, Beweise für seine Eiweißnatur fehlen, ausgeschlossen ist sie nicht.

Die Prüfung der Giftigkeit erfolgt nach den für Toxine im allgemeinen üblichen Methoden und ist hier wegen der Konstanz der Präparate leichter als sonst. Natürlich muß man, um individuelle Schwankungen auszuschließen, immer mehrere Tiere benutzen. Es wird stets die geringste, schnell tötende Dosis bestimmt. Das Ricin tötet nicht akut, vielmehr auch bei intravenöser Injektion erst nach einer Inkubationszeit, die sich ungefähr auf 24—48 Stunden durch Vergrößerung der Dosis herabdrücken läßt. Eine solche Dosis wäre als schnell tötende anzusehen. Die Symptome der Ricinvergiftung sind nicht überaus charakteristisch. Erfolgt der Tod nicht allzuschnell, so kann man starke Gewichtsabnahme und entsprechenden Stickstoffverlust feststellen. Diese Verhältnisse hat F. Müller[6]) sehr exakt untersucht. Müller stellte auch fest, daß der Tod erfolgt, nachdem ganz akut etwa eine Stunde vorher der Blutdruck sich stark gesenkt hat. Stets versagt die Atmung vor dem Kreislauf, auf das Herz hat das Ricin keinen direkt nachweisbaren Einfluß.

Für experimentelle Untersuchungen auf dem Gebiet der Immunitätslehre ist als wichtigster Indikator der typischen Ricinwirkung der Sektionsbefund anzusehen und besser verwertbar als die klinischen Symptome. Besonders leicht erkennbar ist eine Rötung und Schwellung der Peyerschen Plaques, die man nur einige Male gesehen haben muß, um

sicher zu sein, ob das Versuchstier der Ricinvergiftung oder einer zufälligen Schädigung erlegen ist. Bei besonders kurzer Zeit zwischen der Vergiftung und dem Tod oder bei sehr protrahiertem Verlauf kann der Sektionsbefund an Deutlichkeit verlieren; auch die Fäulnis verwischt das Bild, so daß bei Tieren, die z. B. im Sommer über 24 Stunden gelegen haben, eine sichere Sektionsdiagnose manchmal unmöglich ist. Die Ricinvergiftung läßt sich auch von der ihr recht ähnlichen Abrinvergiftung anatomisch unterscheiden. Da diese Notwendigkeit aber für den Experimentator nur in Ausnahmefällen eintreten wird, braucht hier nicht darauf eingegangen zu werden. Die Ricinvergiftung ist auch histologisch sorgfältig untersucht worden, worüber man in den Arbeiten von Franz Müller sich leicht orientieren kann.

Für die Serumforschung beansprucht besonderes Interesse die intensive Einwirkung des Ricins auf das Blut und namentlich auf die roten Blutkörperchen. Diese Wirkung wurde von Stillmark[8]) im Laboratorium Koberts entdeckt und seitdem vielfach studiert. Das Ricin verändert die roten Blutkörperchen der meisten Wirbeltiere, im allgemeinen wird dabei der Blutfarbstoff mit dem Stroma der Zellen zusammen niedergeschlagen. Man spricht dann von Agglutination oder Konglutination. Bei größeren Dosen Ricins sah Fraenkel[2]) beim Fischblut anstatt Agglutination Hämolyse eintreten.

Die Blutkörperchen der einzelnen Spezies, aber auch der einzelnen Individuen sind verschieden empfindlich für das Ricin. Das beruht zum Teil darauf, daß die Blutzellen bei einzelnen Arten, Spezies und Individuen eine verschieden große Resistenz gegenüber dem Ricin haben. Außerdem schwächt aber auch das Serum in verschiedener Intensität die Ricinwirkung ab. Für den Zeitpunkt des Eintrittes der Wirkung des Ricins auf die Blutkörper ist die Größe der Dosis entscheidend. Ist die Dosis sehr klein, so erfolgt die Wirkung nur ganz allmählich und bei zu kleiner Dosis unvollkommen, bei großer tritt die Veränderung sofort ein und erstreckt sich auf alle im Glase vorhandenen Zellen. Wendet man in der für Reagensglasversuche üblichen Weise überall gleiche Blutkörperchenmengen und gleiche Verdünnungen an, so kann man zu ausreichend scharfen Vorstellungen über die quantitative Seite der Ricinwirkung auf Blutkörperchen gelangen.

Schließlich wären hier noch die Beziehungen zu besprechen, die zwischen dem Ricin-Agglutinin und dem allgemein wirkenden Toxin bestehen. Insbesondere sind die Versuche, Präparate mit nur einer von beiden Wirkungen herzustellen, von Bedeutung. Da für diese Fragen jedoch die Berücksichtigung der Reaktionen der Antigene mit den Antikörpern notwendig ist, so werde ich auf diese Punkte in dem Abschnitt über die Antikörper eingehen.

Das Abrin.

Das Abrin wird aus dem Samen von Abrus precatorius, der Jequiritybohne gewonnen und ist ebenfalls durch das Entgegenkommen der Firma Merck im Handel zugänglich. Die Giftigkeit der käuflichen Präparate ist natürlich im Laufe der Jahre eine verschiedene; wohl stets aber ist das Abrin ungiftiger als das Ricin. Die Wirkungen beider Toxine sind sehr ähnliche, der Sektionsbefund beim Abrin ähnlich wie beim Ricin charakterisiert durch Blutungen besonders im Netz, Rötung und Schwellung der Peyerschen Plaques, sowie der retroperitonealen Lymph-

drüsen. Während die allgemeine Wirkung des Abrins auf den Tierkörper und auch die Blutwirkung große Annäherung an die Ricinwirkung zeigt, fehlt es doch auch nicht an bemerkenswerten Unterschieden. Beide Gifte sind Hautgifte, aber das Abrin führt zu einer intensiven Enthaarung, die Ehrlich, der dieses Symptom entdeckte, auf eine dem Abrin spezifische Wirkung auf den Haarboden zurückführte. Während das Ricin sonst viel giftiger als das Abrin ist, besteht umgekehrtes Verhältnis bei der Einwirkung der Stoffe auf das Auge. Hier entfalten viel kleinere Abrindosen intensive Wirkungen als es beim Ricin der Fall ist. Auch die Wirkungen des Abrins auf das Auge sind, wie die Allgemeinwirkung, ganz entsprechend den Befunden beim Ricin durch eine Inkubationszeit eingeleitet. Je nach der Dosis kann man die ganze Skala einer leichten Reizung der Konjunktiva bis zu schwerster Entzündung und Verlust des Bulbus beobachten. Ja man kann die Tiere durch Bepinseln der Konjunktiva töten. Schon seit einigen Jahrzehnten wird von den Augenärzten angegeben, daß bei geschickter Benutzung des Abrins es möglich ist, Hornhauttrübungen aufzuhellen. In dieser Beziehung sei auf die verdienstvolle Untersuchung Römers verwiesen, die uns später beim Antiabrin noch beschäftigen wird.

Hausmann[3]), dem die Trennung des Abrins vom Eiweiß nach dem beim Ricin bewährten Verfahren gelang, beobachtete, daß im Gegensatz zum Ricin, bei dem durch Pepsinsalzsäure die Agglutinationswirkung auf die roten Blutkörperchen wesentlich stärker beeinflußt wird als die Allgemeinwirkung, beim Abrin die Agglutinationswirkung gegen Pepsinsalzsäure ebenso resistent, wenn nicht resistenter ist als seine allgemeine Wirkung. Daß beide Antigene spezifische Antikörper bilden, wird später noch zu erörtern sein.

Das Crotin.

Das Crotin, das aus Crotonsamen gewonnen wird, ist ebenfalls von Merck-Darmstadt zu beziehen. Die Substanz ist erheblich ungiftiger als Ricin und Abrin. Erst Zentigramme rufen pro Kilo Kaninchen deutliche Vergiftungserscheinungen hervor. Selbstverständlich bezieht sich das nur auf die käuflichen Präparate, die praktisch in Frage kommen. Man kann natürlich aus den Präparaten bedeutend giftigere Fraktionen gewinnen. Die einzelnen Individuen ein und derselben Spezies reagieren sehr ungleich auf Crotin. Die Substanz muß daher zu biologischen Versuchen mit großer Vorsicht und mit vielen Kontrollen benutzt werden, sie ist aber durch ihre ungleiche Wirkung vorzüglich für Versuche über individuelle Disposition geeignet.

Ausgezeichnet ist das Crotin unter den Phytotoxinen dadurch, daß es manche Blutkörperchenarten, z. B. die Blutkörperchen des Kaninchens, auflöst, ausgesprochene Hämolyse veranlaßt. Für Demonstrationszwecke ist es insofern sehr bequem, als man jederzeit ein fertiges Hämolysin im Crotin zur Verfügung hat. Zu beachten ist aber, daß auch die hämolytische Wirkung von Individuum zu Individuum verschieden ist, noch mehr natürlich von Spezies zu Spezies usw. Gegenüber Vogelblut ist das Crotin ganz unwirksam. Dementsprechend entziehen die Blutkörperchen des Kaninchens den Lösungen des Crotins das Gift, während Vogelblut dazu nicht imstande ist. Eine Trennung des Crotinhämolysins in zwei Faktoren, einen Immunkörper und ein Komplement, wie man sie bei den Serumhämolysinen und anderen Lysinen durchgeführt hat, ist beim

Crotin bisher nicht gelungen. Es ist überhaupt keineswegs sicher, ob zwei voneinander unabhängige Substanzen hier bei der Hämolyse beteiligt sind.

Das Robin und das Phallin.

Das Robin, das Kobert aus der Rinde von Robinia pseudoacacia, einer Akazienart, gewonnen hat, sei hier kurz erwähnt, weil Ehrlich auch gegen diese Substanz immunisieren konnte. Noch weniger wissen wir bisher über das Phallin, das giftige Prinzip des Knollenblätterpilzes (Amanita phalloides), das nach den Beobachtungen von Kobert außerordentlich intensiv hämolytisch wirkt.

Literatur.

1) Ehrlich, Deutsche med. Wochenschr. 1891 und Fortschritte der Medizin 1897.
2) Fraenkel, Hofmeisters Beiträge, Bd. IV.
3) Hausmann, Hofmeisters Beiträge, Bd. II.
4) Jacoby, Hofmeisters Beiträge, Bd. I u. ff. und Literatur im Biochemischen Centralblatt, Bd. I.
5) Mendel, Osborne and Harris, Amer. Journ. of physiol. 1905.
6) Müller, Schmiedebergs Archiv, Bd. XLII und Zieglers Beiträge, Bd. XXVII.
7) Römer, Archiv für Ophthalmologie, Bd. LII.
8) Stillmark, Arbeiten des pharmakol. Instituts zu Dorpat, Bd. III.

XV.

Die Heufiebergifte.

Von

Dr. C. Prausnitz

in London.

Das Heufieber.

In den Schriften des 18. Jahrhunderts finden sich gelegentlich Hinweise auf eine als paroxysmaler oder nervöser Schnupfen bezeichnete Krankheit. Die erste exakte Darstellung des uns beschäftigenden Symptomenkomplexes wurde 1819 von dem Londoner Arzte BOSTOCK[5]) gegeben, der die Krankheit an sich und anderen Patienten eingehend studiert hatte. Bereits in seinen Schriften sind die meisten Symptome so genau geschildert, daß spätere Untersucher dieser Beschreibung wenig haben hinzufügen können. Es möge daher schon hier eine kurze Schilderung der Krankheit folgen.

Während einer bestimmten Jahreszeit — in den gemäßigten Klimaten im Sommer oder Herbst — erkranken alljährlich gewisse Personen an einem katarrhähnlichen Zustande der Schleimhäute der Augen, der Nase, des Rachens, der oberen und zuweilen auch der tieferen Luftwege. Die Dauer dieser Erkrankung pflegt in der Regel sechs Wochen nicht zu überschreiten. Nach einem ein bis zwei Wochen dauernden Vorstadium gelegentlichen leichten Juckens der Augenwinkel und der Nase mit mäßiger Tränen- und Nasenschleimsekretion pflegt die Krankheit innerhalb einiger Tage, ja oft in wenigen Stunden einen ersten Höhepunkt zu erreichen. Die während des Vorstadiums beobachteten Symptome steigern sich dann akut: man beobachtet an den Augen Rötung der Carunculae lacrimales und der Plicae semilunares, Injektion der Conjunctivae bulbi, die am Limbus corneae und den nasalen und temporalen Feldern beginnt und von da über die ganze Conjunctiva ausstrahlt, Ödem der Conjunctivae, das sich bis zur Chemosis steigern kann, Rötung und Schwellung der Lidränder und starke Tränensekretion. Etwa gleichzeitig beginnen auch die Erscheinungen von seiten der Nase. Sie bestehen in explosionsartigem Niesen und reichlicher, wässeriger Nasenschleimsekretion, die innerhalb weniger Minuten mehrere Taschentücher völlig durchnässen kann. Im Anschluß an die Niesanfälle schwillt die Nasenschleimhaut rasch an, so daß bald beide Nasenhöhlen für Luft undurchgängig werden. Bei rhinoskopischer Betrachtung ist auch hier ausgiebige Injektion, besonders der feineren Gefäße der Nasenmuscheln zu erkennen. Diese objektiv wahrnehmbaren Symptome werden eingeleitet durch einen äußerst lästigen Juck-

reiz in den befallenen Schleimhäuten, der auf der Höhe des Anfalles heftigem, schmerzhaftem Brennen weicht. Die Augenveränderungen bedingen starke Lichtscheu. Bald nachdem die Nase undurchgängig geworden und nur noch Mundatmung übrig geblieben ist, beginnt das Zahnfleisch, sowie die Mund- und Rachenschleimhaut zu jucken. Kurzer, trockener Husten zeigt dann die Reizung der tieferen Rachen- und Kehlkopfschleimhaut an.

Hieran können sich Symptome von seiten der tieferen Luftwege anschließen, welche alle Übergänge zwischen mäßigen bronchitischen und schwersten asthmatischen Erscheinungen bieten. Während eines ausgesprochenen Heuasthmaanfalles zeigen die Patienten hochgradige exspiratorische Dyspnoë und scheiden mit qualvoller Anstrengung geringe Mengen eines zähen Sputums aus, das Asthmaspiralen und eosinophile Zellen enthält. Man vernimmt in diesem Stadium über der ganzen Lunge selbst in einiger Entfernung hörbare Rhonchi. Die Beteiligung der tieferen Luftwege wird nur bei einer geringen Zahl von Patienten beobachtet, in der Regel bei solchen, die auch besonders schwer unter den anderen Manifestationen des Heufiebers leiden und welche die Krankheit bereits sehr häufig durchgemacht haben. Gewöhnlich treten die Asthmaanfälle auch bei diesen Personen erst ein bis zwei Wochen nach dem Beginn der Krankheit auf.

Neben solchen charakteristischen Fällen beobachtet man einzelne atypische oder larvierte, die entweder nur über Asthma oder nur über Nasen- oder über Augenerscheinungen klagen. Die Zugehörigkeit solcher Fälle zur Heufiebergruppe kann durch die nachfolgend berichteten Experimente erwiesen werden.

Eine wesentliche Beteiligung anderer Organe wird nicht beobachtet. Höchstens wäre hierher eine zuweilen beobachtete Urticaria zu rechnen. Die Funktionen des Verdauungskanales zeigen bei einigen Patienten leichte Störungen. Doch ist ein Zusammenhang mit dem Heufieber nicht erwiesen. Dasselbe dürfte für die Albuminurie gelten, welche von einzelnen Autoren als Heufiebersymptom beschrieben worden ist.

Sind nun die geschilderten Erscheinungen auch nicht als ernste anzusehen, so ist es doch ersichtlich, daß sie bei gleichzeitigem Bestehen gewisser Krankheiten der Atmungs- oder Kreislaufsorgane, wie Lungenschwindsucht oder Arteriosklerose recht ernste Komplikationen darstellen. Berücksichtigt man ferner, daß in jedem Falle von Heufieber hochgradige Reizbarkeit, Erschöpfung und Abgeschlagenheit bestehen, so ist es begreiflich, daß die Krankheit auch für den Neurologen und Psychiater gelegentlich bedeutungsvoll werden kann. In der Tat sind bei Neurasthenikern Selbstmordideen zur Heufieberzeit nicht ganz selten. Ferner ist ein Fall mitgeteilt, in dem eine der Beschreibung nach zirkuläre Psychose regelmäßig zur Heufieberzeit zu exazerbieren pflegte.

Diese Symptome von Erschöpfung und Abgeschlagenheit haben wohl auch zu der bei Laien verbreiteten Ansicht geführt, daß die Krankheit fieberhaft wäre. Tatsächlich werden Temperaturerhöhungen nur ganz ausnahmsweise beobachtet. Leider hat trotzdem der ganz unwissenschaftliche Name „Heufieber" sich so sehr eingebürgert, daß es schwer halten dürfte, ihn durch einen passenderen zu ersetzen.

Sind nun die oben beschriebenen Erscheinungen an sich schon recht typisch, so ist noch charakteristischer die Eigenart ihrer Entstehung und ihres Abklingens. Die Symptome erreichen meist sehr rasch und plötzlich, oft im Verlauf einer halben oder einer Stunde ihren Höhepunkt und können Stunden oder Tage lang auf dieser Höhe bleiben, oft aber auch

ganz plötzliche Remissionen zeigen. Man gewinnt dadurch den Eindruck, daß die Krankheit sich aus einer Reihe von mehr oder weniger scharf abgegrenzten „Anfällen" zusammensetzt. Diese Anfälle sind am schlimmsten beim Aufenthalt im Freien, bei heißem, windigem oder schwülem Wetter. Die Remissionen werden bei kühlem, feuchtem Wetter beobachtet und können jederzeit durch Aufenthalt im kühlen, dunklen und vor Luftzug bewahrten Zimmer herbeigeführt werden. Die Dauer der ganzen Krankheit beträgt gewöhnlich in gemäßigten Klimaten ungefähr sechs bis acht Wochen und nur in ausnahmsweise schweren Fällen zwei bis drei Monate. Gegen Ende der Krankheitsperiode werden die Anfälle seltener und leichter, die Remissionen länger und tiefer. Während also der Beginn des Heufiebers gewöhnlich ein relativ plötzlicher ist, ist sein Ende ein fast unmerkliches. Nach dem Abklingen der Schleimhautsymptome erholt sich der Patient mehr oder weniger rasch, je nach seiner Elastizität. Gewöhnlich bleibt aber ein recht lästiger Erschöpfungszustand noch einige Zeit nachher bestehen.

Das Heufieber beginnt in Mitteleuropa Ende Mai oder Anfang Juni, in Südeuropa schon im April, im Hochgebirge erst Ende Juni oder Anfang Juli. An jedem Ort pflegt der Beginn der Krankheit bei fast allen Patienten auf denselben Tag zu fallen, und ebenso zeigt die Kurve der Anfälle und Remissionen bei den an einem Ort wohnenden Kranken einen durchaus übereinstimmenden, den Witterungswechseln folgenden Verlauf. In den nördlichen Vereinigten Staaten werden zwei Krankheitsperioden beobachtet, deren erste im Juni und Anfang Juli herrscht („Spring Cold", „June Cold"), während die zweite von Ende Juli oder Anfang August bis zum Beginn der Nachtfröste im Oktober sich erstreckt („Autumn Catarrh"). Der kleinere Teil der amerikanischen Patienten leidet an der ersteren, die Mehrzahl an der letzteren Form. Nur ganz ausnahmsweise sollen Patienten zu beiden Perioden erkranken [Wyman[42])].

Wer die Krankheit einmal gehabt hat, bekommt sie fast ausnahmslos in jedem folgenden Jahre wieder. Sie kann im Laufe der Jahre immer leichter werden, aber häufiger tritt das Gegenteil ein, stellt sich von Jahr zu Jahr immer qualvolleres Asthma mit seinen Folgezuständen ein und leiden die Patienten subjektiv und objektiv immer schwerer.

Die ersten Anfälle treten meist in oder kurz vor der Pubertätszeit, seltener im Erwachsenenalter auf; man hat sie gelegentlich erst bei etwa 60jährigen Personen, aber auch schon bei nur 2jährigen Kindern gesehen. Zweifellos kommt der Heredität ein sehr hoher Einfluß zu. Es ist interessant, daß man in „Heufieberfamilien" relativ oft Personen findet, die zwar nicht an Heufieber leiden, aber ausgesprochene Idiosynkrasien, z. B. gegen Krebse, Hummer, Erdbeeren o. ä. zeigen.

Es wird behauptet, daß Männer etwa doppelt so oft wie Frauen an Heufieber erkranken. Von allen Rassen ist fast ausschließlich die kaukasische disponiert; als gelegentlicher Befund sind Erkrankungen bei Negern in Amerika sowie bei einer Japanerin festgestellt; innerhalb der weißen Rasse sind die angelsächsischen Stämme bei weitem bevorzugt. Dementsprechend ist die Krankheit in Deutschland, Dänemark, Holland und besonders England und Nordamerika sehr verbreitet, scheint aber in Frankreich, Spanien, Italien seltener zu sein. Aus Asien und Afrika liegen nur Mitteilungen über Fälle bei Weißen, nicht bei Eingeborenen vor.

In den hauptsächlich heimgesuchten Ländern werden vorwiegend Angehörige der gebildeten Klassen befallen. Ärzte, Geistliche, Juristen, Kaufleute stellen ein großes Kontingent, während Arbeiter relativ selten erkranken. Allgemein gesprochen scheint das Heufieber eine Krankheit der Zivilisierten oder der Zivilisation zu sein.

Die Heufieber-Disposition.

Auf Grund der Beobachtung, daß das Heufieber eine so wählerische Krankheit ist, und nur eine bestimmte Minderzahl von Menschen befällt, diesen aber gewöhnlich ihr Leben lang treu bleibt, kam man frühzeitig dazu, eine Disposition zu vermuten und sich über deren Wesen gewisse Vorstellungen zu machen. Man hat lange versucht, durch geistreiche Hypothesen und durch Auswertung statistischen Materials diese Disposition zu ergründen, um darauf eine ätiologische Theorie aufzubauen.

Bostock[5]) selbst und nach ihm Phoebus[31]), Dechambre[37]), Kinnear[37]), Guéneau de Mussy[37]), Ferber[13]), Beard[3]) und Stowell[38]) suchten sie in einer Überempfindlichkeit der Schleimhäute gegen Staub, helles Licht, Hitze oder bestimmte Düfte. Sie berücksichtigten nicht, daß diese Schädlichkeiten auch außerhalb der Heufieberzeit wirkten. Die Erklärung der Empfindlichkeit wurde von den Polypragmatikern, besonders Ärzten der amerikanischen Schule, wie Daly[37]), Isch-Wall[37]), Allen[2]), Thomas[37]), Roe[33]), Lockard[22]), James[19]), Hope[18]) u. a. in Nasenanomalien, Septumverbiegungen, Polypen usw. gesucht und die Behandlung vorwiegend hierauf gerichtet. Dagegen haben spätere Untersuchungen gezeigt, daß viele Heufieberpatienten völlig normale Nasen besitzen. Mehrere Autoren, wie Molinié[29]), Guéneau de Mussy, Murphy[30]) u. a. glaubten die arthritische Diathese anschuldigen zu sollen, während z. B. Sajous[37]), Sandmann[37]), Hack[15]), J. Mackenzie[26]) und Fink[14]) die Disposition in einer Trigeminusneurose suchten. Auch diese Hypothesen erklären nur einen kleinen Teil der Erscheinungen. Dagegen kommen die Autoren, welche für das Heufieber eine neuropathische Disposition postulieren, der Wahrheit näher. Denn das Heufieber bevorzugt Familien mit solcher Disposition, und sein erstes Auftreten folgt, wie Thost[39]) gezeigt hat, oft schweren Anstrengungen des Nervensystems oder Krankheiten, welche das Nervensystem besonders beanspruchen, wie Influenza. Aus den nachstehend zu berichtenden Untersuchungen über das Heufiebergift hat Alberts[1]) geschlossen, daß die Krankheit auf einer Sympathicusneurose beruht, da ihre Symptome vorwiegend auf das Gebiet der vasomotorischen und sekretorischen Nerven beschränkt sind. Uns scheint es, daß wir zur Zeit nur sagen können, daß die Heufieberdisposition in der Existenz bindender Gruppen für das Heufiebergift in den Zellen des Patienten zu suchen ist. Wir sind allerdings zurzeit über den Grund im Unklaren, weshalb diese Receptoren bei einigen Personen vorhanden sind, während sie bei der Mehrzahl fehlen.

Die Ätiologie des Heufiebers.

Wenden wir uns nunmehr der Frage nach dem eigentlichen Erreger zu, so sind nur zwei Theorien ernst zu nehmen, nämlich die Bakterientheorie mit ihren Hauptvertretern Helmholtz[16]), Sticker[37]), Heymann und Matzushita[17]), Weil[41]) u. a., und die Pollentheorie, welche sich vor allem auf die Arbeiten von Elliotson[12]), Blackley[4]),

Morell Mackenzie[27]), Dietsch[7]) und Dunbar[8]) stützt. Vertreter der ersteren Theorie haben aus dem Nasenschleim von Heufieberpatienten zur Zeit des Anfalles verschiedene Bakterien isoliert. Aber mit keinem derselben haben sich die Kochschen Postulate erfüllen lassen. Auch ist es nicht leicht, mit der Annahme eines vermehrungsfähigen Mikroben die plötzlichen Exazerbationen und die raschen Remissionen der Krankheit in Einklang zu bringen. Ebensowenig konnte die frühere Annahme Stickers befriedigen, daß die Pollen als Träger gewisser erregender Mikroben wirkten.

Dagegen ruht die Pollentheorie auf sicherer experimenteller Basis. Bereits Elliotson vertrat im Jahre 1831 die Meinung, daß bei disponierten Personen das Heufieber durch Pollen hervorgerufen würde. Blackley führte beweisende Versuche in den Jahren 1868—1881 in vielen sorgfältigen Reihen aus; leider verfiel er in den Irrtum, alle Pollen als heufiebererregend anzusehen. Durch eine sinnreiche Anordnung zeigte er, daß die Zahl der in der Luft schwebenden Pollen in bestimmter Beziehung zu der Zahl und Schwere der Anfälle stände. Die Pollenzählung erfolgte unter dem Mikroskop an Objektträgern, die mit einer klebrigen Lösung (Glyzerin 10, Alkohol 50, Wasser 40, Karbolsäure einige Tropfen) bestrichen und unter einem kleinen Schutzdach der Luft ausgesetzt worden waren.

Ohne zunächst Kenntnis von diesen Arbeiten zu haben, führte Dunbar[8]) im Sommer 1902 ähnliche Versuche an sich und einigen anderen Heufieberpatienten aus. Wir werden im folgenden sehen, daß die von ihm aufgestellten Forderungen nunmehr als erfüllt betrachtet werden müssen und damit eine völlig ausreichende Erklärung des gesamten Symptomenkomplexes des Heufiebers gegeben ist. Diese Postulate besagten, daß der Heufiebererreger rein darzustellen wäre, daß mit ihm alle Heufiebersymptome unabhängig von Temperatur und Witterungsverhältnissen und auch außerhalb der kritischen Jahreszeit auslösbar sein müßten, und daß der Erreger nur auf Heufieberpatienten wirken dürfte.

Auf Grund systematischer Beobachtungen auf Reisen zur Heufieberzeit war Dunbar zur Auffassung gelangt, daß mit großer Wahrscheinlichkeit Pollen der Erreger wäre. Zur sauberen Gewinnung der zunächst besonders verdächtigen Gramineenpollen wurde wie folgt verfahren: Grashalme bezw. Getreideähren, an denen die ersten Antheren zum Vorschein gekommen waren, wurden möglichst lang abgeschnitten und schräg in Schalen mit Wasser gelegt, so daß die Ähren über sterilisierten Schalen hingen. Wurden die Schalen an einem warmen, sonnigen Ort aufgestellt, so dauerte es nicht lange, bis die Antheren in reicher Menge hervorsprossten und der Pollen entweder spontan oder nach leichtem Klopfen an den Halmen in die darunter gestellten Schalen hineinstäubte. Auf diese Weise gelang es, die für die Vorversuche nötigen Pollenmengen in relativ kurzer Zeit zu gewinnen. Die Aufbewahrung des so gewonnenen Pollens geschah in Schalen oder nach gründlicher Trocknung in sterilen Flaschen. Die Trocknung war nötig, weil im frischen Pollen sehr viele Enzyme vorhanden sind, die leicht zur Selbstverdauung und völligen Verflüssigung des Pollens führen, wobei der Pollen seine Wirksamkeit einbüßt.

In den ersten Versuchen wurden die so gesammelten Pollen mit Wattestäbchen auf die Augenbindehaut oder die Nasenschleimhaut von Heufieberpatienten und von Normalpersonen gebracht. Stets erkrankten die ersteren in typischer, schwerer Weise an den für Heufieber charakte-

ristischen Erscheinungen, während die letzteren, abgesehen von einem, durch den Fremdkörper bedingten leichten und nur subjektiven, sofort wieder verschwindenden Fremdkörpergefühl völlig reizfrei blieben. Bei anderen Versuchen wurden in einem geschlossenen Raume Pollen verstäubt. Während mehrere Normalpersonen auch nicht die leisesten Beschwerden spürten, erkrankte ein Heufieberpatient das eine Mal an typischen Augen- und Nasensymptomen; ein anderes Mal, wo er unvorsichtigerweise sprach und lachte, bekam er einen heftigen Stickhusten mit stundenlang anhaltenden asthmatischen Beschwerden.

Ähnliche Versuche sind im Laufe der Jahre mit einer großen Zahl verschiedener Pflanzenpollen und an vielen Heufieberpatienten und Normalpersonen angestellt worden. Danach sind gegenüber den europäischen Patienten die Pollen aller Gramineen und einiger verwandter Familien (z. B. Cyperacaen), einiger Liliengewächse, ferner von Maiglöckchen, Knöterich, Rübsaat, sowie Kompositen (Distel, Kornblume u. a.) mehr oder minder stark wirksam. Unwirksam waren im Gegensatz zu einer verbreiteten Annahme die Pollen von Rosen, Linden und Flieder.

Weitere Untersuchungen wurden von Dunbar[10]) selber und auf seine Veranlassung von amerikanischen Kollegen wie E. Mayer, Wesbrook, Joachim u. a. unternommen, um die Ätiologie des Herbstkatarrhes aufzuklären. Es hat sich aus denselben ergeben, daß die in den Vereinigten Staaten am „June Cold“ leidenden Personen für die Gramineenpollen empfindlich sind. Dagegen wurden Herbstkatarrhpatienten durch Gramineenpollen gar nicht, wohl aber durch die Pollen gewisser Kompositen, speziell der dort sehr verbreiteten und als Unkräuter wachsenden Ambrosia- und Solidagoarten gereizt. Diese Pflanzen hatten schon seit langer Zeit drüben als die Erreger gegolten, und es ist von Interesse, daß der Hauptübeltäter, die Ambrosia artemisiaefolia, fast die einzige windblütige Komposite ist. Die Herbstkatarrhpatienten sind ferner für die Pollen von Chrysanthemen und Astern empfindlich. Diese Pflanzen kommen zwar wegen ihres geringen Anbaues praktisch weniger in Betracht, können aber, wenn sie als Tafelschmuck verwendet werden, gelegentlich recht heftige Anfälle auslösen. Nur ein kleiner Teil der amerikanischen Patienten erkrankt, wie erwähnt, sowohl im Juni wie im August. Diese, sowie einige besonders empfindliche europäische Patienten sind gleichzeitig gegen die Pollen der Gramineen und der genannten Kompositen empfindlich.

War durch diese Experimente der Beweis geliefert, daß die Pollen bestimmter Pflanzen bei Heufieberpatienten die Erscheinungen des Heufiebers hervorrufen, so mußte nunmehr gezeigt werden, daß die Zahl der in der Luft schwebenden Pollen tatsächlich ausreichte, um Anfälle auszulösen. Unter Verwendung des Blackleyschen und ähnlicher von Liefmann[21]) konstruierter geeigneter Apparate wurde diese Zahl bestimmt. Mit Klebstoff bestrichene, netzförmig eingeteilte Objektträger wurden in diesen Apparaten eine bestimmte Zeit lang der Luft ausgesetzt und dann nach Zusatz von Jodlösung unter 60facher Vergrößerung durchsucht; alle pollenähnlichen Gebilde wurden dann mit 250facher Vergrößerung identifiziert. Die Pollenkörner sind gegenüber den anderen im Präparate vorkommenden Objekten leicht kenntlich durch ihre Größe — meist 50—60 μ — und durch ihre auffallenden, regelmäßigen Formen, deren es eine große Mannigfaltigkeit gibt. Die Gramineenpollen sind zum Unterschiede von den meisten anderen Pollen durch die Einförmigkeit ihrer Hülle ausgezeichnet: sie sind von kugeliger bis eiförmiger Gestalt, ihre äußere Membran ist glatt und besitzt an einem Pol eine

Austrittsöffnung für den Pollenschlauch. Im Inneren finden sich viele ca. 3 μ lange, 1 μ breite ovoide Stärkestäbchen, die sich mit Jod intensiv blauschwarz färben. Diese Kriterien genügen, um die Gramineenpollen von den meisten anderen Pollen zu unterscheiden.

Die in Hamburg ausgeführten Pollenzählungen haben nun gezeigt, daß die Zahl der Gramineenpollen Ende Mai — also zur Zeit der Heufieberprodrome — rasch zu steigen beginnt und im Laufe des Juni eine beträchtliche Höhe erreicht, um in der ersten Hälfte des Juli allmählich wieder abzufallen. Während der Zeit ihres reichlichen Vorkommens beobachtet man mehrere Maxima und Minima, die, wie aus der nebenstehenden Figur*) hervorgeht, in innigem Zusammenhang mit den Witterungswechseln stehen. Erst Ende August verschwinden sie ganz von der Bildfläche. Während der Zeit ihres gehäuften Vorkommens pflegen sie etwa 90 % der Gesamtpollenzahl auszumachen.

———— Gesamtpollenzahl } auf 19 ccm in 24 Stunden
-·-·-·-·- Gramineenpollenzahl }
▬▬▬ Niederschläge (mm).
---------- Mittlere Tagestemperatur.

Fig. 1. Einfluß der Witterungsverhältnisse auf den Gehalt der Luft an Pollen. (Hamburg, Botanischer Garten, 1905.)

Es ist berechnet worden, daß in der Zeit der Pollenmaxima etwa 4—5 Millionen Gramineenpollen sich in 24 Stunden auf einem Quadratmeter Fläche sammeln. Nach LIEFMANN wurden noch gegen Ende Juni, also zur Blütezeit des Sommerroggens, in der Nähe von Hamburg 200 bis 300 Gräserpollen in 1 cbm gefunden, so daß mit jedem Atemzuge etwa 4—6 Pollen aufgenommen wurden. Diese Zahl ist, wie später gezeigt werden wird, zur Auslösung von Anfällen vollauf ausreichend. Nach neueren Versuchen mit seinem „Aeroskop" atmete LIEFMANN in der Nähe eines Kornfeldes in 12 Minuten 500 Pollen, also mit jedem Atemzuge zwei oder drei Pollen ein.

*) Diese Figur ist in freundlicher Weise von Herrn Professor DR. DUNBAR zur Verfügung gestellt worden.

Ähnliche Zählungen sind in Amerika für die Ambrosiapollen vorgenommen worden und haben zu entsprechenden Ergebnissen geführt. Die Ambrosiapollen sind ca. 10—15 μ groß, annähernd kugelig und mit sehr zahlreichen kleinen Wärzchen besetzt. Sie enthalten keine Stärkestäbchen und werden durch Jodlösung gleichmäßig braun gefärbt.

Analyse der Pollen.

Nach den dargelegten Befunden durfte die ätiologische Bedeutung gewisser Pollen für das Heufieber als festgestellt gelten. Es fragte sich aber, wie diese Wirkung zustande kam. Daß es sich nur um eine mechanische Reizwirkung handelte, war deswegen unwahrscheinlich, weil die Pollen der meisten Pflanzen, darunter auch Pollen mit rauher, stacheliger Oberfläche, wie Malvenpollen, unwirksam waren, während gerade die glatten Gramineenpollen höchst wirksam waren. Vielmehr mußte es sich um eine Giftwirkung handeln, und die Frage nach der Natur dieses Giftes, die bereits von Blackley aufgeworfen war, ist durch Dunbar und seine Schüler beantwortet worden. Um die recht mühsamen chemischen Untersuchungen haben sich insbesondere der zu früh verstorbene Dr. Kattein und nach ihm Kammann [20]) verdient gemacht.

Die Untersuchungen wurden zunächst mit Roggenpollen angestellt, von denen etwa 20 Millionen Körner 1 g wiegen. Der lufttrockene Pollen enthält 10,2 % Wasser, 3,4 % Asche und 86,4 % organische Substanz. Diese rund 86 % organischer Substanz setzen sich zusammen aus 3 % alkohol-äther-löslichen Bestandteilen, 25 % Kohlehydraten, 18 % stickstoffhaltigen Körpern nicht eiweißartiger Natur und 40 % Eiweißkörpern, sowie verschiedenen Enzymen.

Durch Alkohol-Äther-Extraktion gewinnt man aus den Pollen eine braune, wachsartige Masse von angenehm aromatischem Geruch, eine Mischung der im Pollen enthaltenen Fette, Wachssubstanzen und ätherischen Öle. Diese Masse reizt bei konjunktivaler Applikation Normalpersonen gleich heftig wie Heufieberpatienten; sie ist übrigens nicht in ausreichender Menge vorhanden, um unter natürlichen Verhältnissen in Betracht zu kommen.

Die Kohlehydrate sind vorwiegend in Gestalt der oben beschriebenen Stärkekörner vertreten. Anfangs glaubte Dunbar diese als den Erreger des Heufiebers ansehen zu sollen, da er sie in den wirksamen Gramineenpollen nie vermißte und in nicht wirksamen Pollen zunächst nicht fand. Später fanden sich freilich viele stärkehaltige, aber unwirksame, sowie stärkefreie aber wirksame Pollen. Als es dann gelang, diese Pollenstärke in ausreichenden Mengen rein herzustellen, erwies sie sich als ungiftig. Zu diesem Zwecke wurden die scharf getrockneten Pollen gemahlen, in 5 % Kochsalzlösung aufgeschwemmt und mehrmals kräftig zentrifugiert. Über den gelben Pollentrümmern setzte sich eine schmale weiße Schicht ab, welche abgesogen und durch mehrmaliges Zentrifugieren gereinigt wurde. Diese Substanz, welche aus Amylum bestand, war Heufieberpatienten gegenüber unwirksam.

Den Enzymen, von denen u. a. proteolytische, saccharifizierende und oxydierende nachgewiesen sind, kann eine Giftwirkung gegenüber unseren Kranken nicht zukommen, da das Pollengift hitzebeständig ist.

Die Trennung der Proteine von den anderen Pollenbestandteilen, vor allem von den anderen stickstoffhaltigen Körpern nicht eiweißartiger Natur, erfolgt am besten durch etwa 10stündiges Digerieren der ge-

mahlenen Pollen mit 5 % Kochsalzlösung bei 37° unter Zusatz von 0,5 % Phenol und nachfolgendes energisches Zentrifugieren. Der Rückstand, welcher dann noch ungesättigte stickstoffhaltige Verbindungen enthält, ist — nach gründlichem Waschen — völlig unwirksam. Die überstehende, opalisierende Flüssigkeit, das „Pollenextrakt“, ist intensiv wirksam für Heufieberpatienten, aber gänzlich unwirksam für Normalpersonen. Aus dieser Lösung kann man einen hochgiftigen Körper durch Fällung mit dem 8—10fachen Volumen 96 % Alkoholes, oder durch Aussalzen mit Magnesiumsulfat, Ammoniumsulfat oder durch Dialyse gewinnen. Diese Substanz ist ein weißer, amorpher Körper, welcher alle Eiweißreaktionen zeigt und mit physiologischer Kochsalzlösung eine leicht opalisierende Lösung gibt.

Das so gewonnene Protein ist ein Gemenge von verschiedenen Eiweißkörpern, welche durch fraktionierte Fällungen in die Pseudo- und Euglobuline und die Albumine getrennt werden können. Nur die Albumine, welche etwa 16 % des gesamten mit Kochsalzlösung extrahierbaren Polleneiweißes ausmachen, sind die Träger der Giftwirkung, während die anderen Eiweißkörper völlig wirkungslos sind.

Die Herstellung eines eiweißfreien Giftes aus den Pollen ist bisher nicht gelungen; daß das eigentliche Gift einfacher konstituiert ist als das Eiweißmolekül, erscheint allerdings wohl glaublich angesichts der alsbald zu erörternden Hitzebeständigkeit des Pollengiftes.

Da die Gewinnung des Toxalbumins umständlich und mit einem beträchtlichen Giftverlust verbunden ist, so wurden die meisten Untersuchungen mit den aus dem Pollenextrakt durch Alkohol gefällten Gesamtproteinen angestellt.

Aus Roggenpollen verschiedener Provenienz und verschiedener Jahrgänge wurden stets Proteine von gleichem physiologischen Wirkungswert nach dieser Methode gewonnen. Diese Proteine wurden trocken in zugeschmolzenen oder paraffinierten Röhrchen im Eisschrank aufgehoben und ließen dann selbst nach mehreren Jahren keine Abschwächung erkennen. Auch die bei 23° und 37° im Dunkeln aufgehobenen Proteine haben innerhalb eines Jahres keine Abschwächung erfahren. Dagegen geht das Gift in Lösungen, besonders in stärkeren Verdünnungen, oft binnen einigen Tagen zugrunde, wohl infolge hydrolytischer Spaltungen.

Das Gift ist relativ recht thermostabil. Bei einstündiger Erhitzung der Lösung auf 70° tritt keine meßbare Abschwächung ein; bei Erhitzung auf ca. 80° wird die Wirksamkeit um etwa $^1/_4$, bei Erhitzung auf 100° um etwa $^3/_4$ herabgesetzt. Selbst nach einstündiger Erhitzung im Einschmelzrohr auf 120° behält eine 1 pro millige Lösung noch einen Rest von Giftwirkung; erst nach einstündiger Erhitzung auf 150° geht der letzte Rest von Giftwirkung verloren.

Nach Behandlung mit Alkalien und Säuren, mit Trypsin und Pepsin wurde die Giftwirkung beträchtlich abgeschwächt, aber unter den Bedingungen des Versuches nicht völlig aufgehoben. Eine sehr starke Schädigung wurde nach fünfstündiger Behandlung mit 2,5 %iger Kalilauge beobachtet.

Physiologische Wirkungsweise des Pollenproteins.

Nach den vorstehenden Angaben ist es ersichtlich, daß die Giftwirkung des Pollens einem chemisch wohl charakterisierten Körper anhaftet. Die Natur dieser Giftwirkung ist ungemein deutlich und typisch, und

kann an Heufieberpatienten leicht unter jeder Versuchsanordnung beobachtet werden.

Auf der Conjunctiva genügt ein Tropfen einer Lösung 1:40000, also $^1/_{1000}$ mg Protein, um bei Heufieberpatienten innerhalb weniger Minuten Jucken, Brennen und eine vom Limbus corneae ausstrahlende Injektion nebst starker Tränenabsonderung hervorzurufen. Diese Proteinmenge dürfte ungefähr $^1/_{400}$ mg Roggenpollen oder 50 Roggenpollenkörnern entsprechen. Bei einem sehr empfindlichen Patienten trat schon nach Instillation einer 20mal so kleinen Dosis deutliche konjunktivale Reizung auf. Bei zahlreichen Patienten ruft ein Tropfen einer Lösung 1 : 100000, also $^1/_{2500}$ mg Protein, die typischen Reizerscheinungen hervor. In der Regel gelangt nur ein Teil des Giftes an Ort und Stelle zur Wirkung, während ein Teil durch den Ductus naso-lacrimalis in die entsprechende Nasenhöhle gelangt, wo er Jucken, Niesen, sowie Injektion, Schwellung und Schleimsekretion der Nasenschleimhaut hervorruft. Die nasalen Erscheinungen treten natürlich rascher und sicherer bei endonasaler Instillation des Giftes auf. Nach konjunktivaler bezw. nasaler Applikation größerer Dosen wurde bei einem Patienten, der nur gelegentlich während der Heufieberzeit und nie außerhalb derselben an Asthma litt, regelmäßig mehrere Stunden nach einem solchen Augen- bezw. Nasen- und Nanfall typisches Asthma von oft mehrstündiger Dauer ausgelöst. Derselbe Patient hatte einige Male das Mißgeschick, beim Abwägen des überaus leichten, staubfein gepulverten Proteins einige Stäubchen davon zu aspirieren. Jedesmal trat innerhalb weniger Minuten trockener Husten auf, dem bald ein intensiver Asthmaanfall folgte.

Um festzustellen, ob die Empfindlichkeit nur in dem Gebiete des Trigeminus lokalisiert wäre, ließ man einen Patienten sich das Gift in den Anus applizieren. Binnen weniger Minuten trat an dieser Stelle ein außerordentlich heftiges Jucken auf.

Nach Einreiben eines Tropfens Giftlösung in die unversehrte Haut des Vorderarms bildeten sich im Verlaufe von etwa einer Viertelstunde unter starkem Jucken mehrere umschriebene urticaria-artige Quaddeln aus, die sich erst nach mehreren Stunden verloren.

Nach subkutaner Injektion des Pollenextraktes bei einem zu Heufieber disponierten Arzte traten alle Symptome in sehr akuter Form auf. Nach 10 Minuten begann heftiges Niesen mit reichlicher Nasenschleimsekretion; nach ca. 30 Minuten folgte trockener Husten mit wenig zähem Auswurf. Gleichzeitig schwoll das Gesicht an und wurde stark gerötet. Auf der Conjunctiva entwickelte sich eine starke Injektion, die bis zur Chemosis bulbi zunahm. Die Nase war völlig verstopft. In beiden Ohren war ein Gefühl von Spannung vorhanden; objektiv erschienen die Trommelfelle allerdings nicht verändert. Etwa eine Stunde nach der Injektion traten recht quälende asthmatische Beschwerden mit weithin hörbarem Giemen auf. Eine Stunde später hatte sich das Asthma ziemlich verloren, aber nunmehr entwickelte sich auf der ganzen Haut unter heftigem Jucken ein großquaddeliges, urticarielles Exanthem. Nach einer weiteren Stunde begann der Vorderarm am Ort der Injektion anzuschwellen. Das Ödem, welches nicht schmerzhaft war, breitete sich im Laufe der Nacht über die ganze obere Extremität aus. Das Armödem und eine gewisse Gedunsenheit des Gesichts blieben noch mehrere Tage bestehen. Alle anderen objektiv erkennbaren Folgezustände der Impfung waren schon am anderen Morgen verschwunden.

Die Temperatur blieb während der Dauer des Versuches normal. Im Urin fand sich nichts Abnormes. Subjektiv empfand der Patient noch etwa eine Woche nach Ablauf des Versuches ein störendes Gefühl von Schwäche und Mattigkeit, das besonders bei leichteren körperlichen Anstrengungen, wie beim Treppensteigen, auffiel, sowie gelegentliche Anfälle von Herzklopfen.

Nach der Heftigkeit dieser Erscheinungen schien es nicht geraten, eine Wiederholung des Versuches mit Proteinlösungen vorzunehmen, da nach den übrigen Versuchsergebnissen abweichende Resultate nicht zu erwarten waren. Ähnliche Erscheinungen sind bei einem anderen Patienten nach subkutaner Injektion eines nicht ganz neutralen Gemisches von Pollenextrakt und Pollenantitoxin beobachtet worden; nur fehlten hier die Reizerscheinungen von seiten der Schleimhäute, während die Herzerscheinungen in bedrohlicher Weise in den Vordergrund traten. Es bedarf besonderer Anerkennung, daß trotz dieser recht unangenehmen Symptome ein nicht zu Heufieber disponierter Kollege sich zur Kontrolle mit dem gleichen Pollenextrakt impfen ließ. Bei ihm trat nur ein leichtes, etwas juckendes, circumscriptes Ödem am Ort der Injektion auf.

Das Heuasthma kann nach den vorstehenden Versuchen auf zwei Weisen zustande kommen, entweder durch lokale Reizung der Bronchiolen, wie in den Versuchen, wo Pollen oder Protein aspiriert wurde, oder dadurch, daß Gift von der Nasenschleimhaut resorbiert wird und in den Kreislauf gelangt, wie es in dem letztgenannten Versuche der Fall war und bei der Applikation großer Dosen von Giftlösung in den Konjunktivalsack oder die Nasenhöhle regelmäßig geschieht.

Die übrigen Versuche, speziell die konjunktivale und endonasale Giftapplikation, sind bei einer großen Zahl von Patienten und Normalpersonen zu allen Jahreszeiten und in vielen Ländern von verschiedenen Untersuchern ausgeführt worden; nur ein Teil derselben ist veröffentlicht worden. [Thost[40]), Semon[35]), Mc. Bride[25]), Mayer[28]), Stein[36]).] Im Hamburger Hygienischen Institut allein sind mehrere hundert Patienten mit positivem und fast ebenso viele Normalpersonen mit negativem Ergebnis geprüft worden. Stets war das Ergebnis das gleiche, daß bei Heufieberpatienten das Gift die geschilderten Symptome auslöste, während es — mit verschwindenden Ausnahmen — bei Normalpersonen unwirksam blieb. Von den bisher bekannt gewordenen drei Ausnahmen (Semon, E. Mayer) waren zwei Personen, die gelegentlich zur Sommerszeit leichte Reizerscheinungen in ihren Augen oder Nasen zu empfinden pflegten. Sie dürften deshalb vielleicht als larvierte Heufieberpatienten aufzufassen sein, deren Erkennung erst durch das Pollengift möglich geworden ist.

Entsprechende Versuche sind mit den Proteinen einer Anzahl anderer wirksamer Pollen ausgeführt worden und haben regelmäßig eine genaue Übereinstimmung mit den zugehörigen Pollenversuchen ergeben. Denn stets waren die aus nicht wirksamen Pollen hergestellten Proteine in noch so konzentrierter Lösung unwirksam, und waren die Proteine aus schwächer wirksamen Pollen weniger wirksam als die aus hochwirksamen, wie den Roggenpollen. Herbstkatarrhpatienten wurden durch die aus Ambrosia- und Solidagopollen hergestellten Proteine prompt gereizt, waren aber gegenüber den Gramineenpollenproteinen nicht empfindlich. Von den europäischen Patienten waren alle bisher untersuchten, wie erwähnt, für die Gramineenpollenproteine, aber nur einige hochempfindliche zugleich für die Ambrosia- und Solidagoproteine empfindlich. Auch

hier liegen also die Verhältnisse genau entsprechend wie es oben für die Versuche mit Pollen geschildert worden ist. An dieser Stelle mag noch erwähnt werden, daß O. Scherer[34]) in Detroit mit einem aus Ambrosiapollen hergestellten Eiweißpräparat an Herbstkatarrhpatienten bei konjunktivaler Instillation Reizung der Augen, bei subkutaner Injektion Juckreiz in der Nase und Niesreiz sowie starke Schwellung am Injektionsort erhalten hat; dagegen trat bei Normalpersonen nach subkutaner Injektion einer 15000 mal so großen Dosis nur Schwellung am Injektionsort, aber kein Niesen auf.

Von den beschriebenen Prüfungsergebnissen des Pollenproteins abweichende Resultate sind von Denker[6]) und E. Mayer mitgeteilt worden. Beide Autoren vermochten mit den ihnen von Dunbar im Frühjahr 1903 zugeschickten Pollenproteinlösungen keine Reizung bei Heufieberpatienten hervorzurufen. Der Grund hierfür lag offenbar daran, daß die verwendeten verdünnten Lösungen vor dem Gebrauch mehrere Wochen gestanden hatten; die rasche Zersetzlichkeit des Pollengiftes in Lösungen war damals nämlich noch nicht bekannt. Bei einer späteren Nachprüfung mit frisch aus Proteinpulver hergestellten Lösungen hat E. Mayer die charakteristischen Symptome erhalten.

Auf einige weitere Einwände, die gegen die Toxinnatur der Pollenproteine erhoben worden sind, kann erst bei der Besprechung des Pollenantitoxins eingegangen werden.

Tierversuche.

In diesem Zusammenhange mag über eine größere Reihe von Tierversuchen berichtet werden, welche Dunbar zu Immunisationszwecken ausführte. Nach subkutaner Injektion von Pollen, sowie nach subkutaner oder intravenöser Injektion von Pollenextrakten oder Pollenproteinlösungen zeigten einige Kaninchen und zwar besonders „Lapins“ eine sehr ausgesprochene Reaktion, welche in Temperaturerhöhung um einige Grad, Gewichtsverlust von durchschnittlich 200 g und herabgesetzter Freßlust bestand. Die gleichen Verhältnisse wurden auch bei einem Teil der entsprechend behandelten Ziegen erhalten. Es trat im Verlauf der Behandlung bei den reagierenden Tieren eine auffallende Gewöhnung an das Gift ein, so daß zur Erzielung einer Reaktion immer größere Giftmengen injiziert werden mußten. In vereinzelten Fällen starben die Tiere im direkten Anschluß an die intravenöse Injektion von Pollenextrakten, was von einigen Autoren als Beweis für eine Giftüberempfindlichkeit gedeutet worden ist. Dagegen ist zu erwägen, daß gerade die in Frage kommenden Injektionen nicht mit klaren Lösungen, sondern mit Pollenemulsionen ausgeführt wurden und daß demnach eine einfache mechanische Erklärung für diese Unglücksfälle näher liegt. Im Anschluß an die Versuche an kleineren Tieren sind ausgedehnte Impfversuche an Pferden vorgenommen worden. Es hat sich gezeigt, daß von allen Pferden nur ein Teil auf die ausschließlich geübte subkutane Injektion von Pollenextrakten oder Pollenproteinlösungen reagiert; auch hier sind die edelsten Tiere in der Regel die empfindlichsten. Im Anschluß an die Impfung bildet sich binnen wenigen Stunden eine starke, schmerzhafte Schwellung am Ort der Injektion aus; gleichzeitig steigt die Temperatur oft bis über 40°; Schüttelfröste und Urticaria sind nicht selten; das Allgemeinbefinden und die Freßlust sind stets

wesentlich beeinträchtigt. Bei einigen Pferden ist kürzlich von GILDEMEISTER*) eine lokale Empfindlichkeit gegenüber hohen Dosen des Giftes festgestellt worden: von neun auf subkutane Giftinjektionen reagierenden Pferden zeigten drei bei konjunktivaler Instillation von fünf Tropfen einer Roggenpollenproteinlösung $^1/_{100}$ eine deutliche Rötung und Injektion der Schleimhaut. Bei anderen Tieren ist bislang der Nachweis einer Empfindlichkeit gegenüber den Pollen oder den Pollengiften nicht gelungen.

Fassen wir die Hauptergebnisse der obigen Ausführungen zusammen, so ergibt sich, daß es mit dem von DUNBAR aus heufiebererregenden Pollen dargestellten Protein gelingt, die sämtlichen Erscheinungen des Heufiebers hervorzurufen. Es kann daher nicht mehr zweifelhaft sein, daß dieser Giftstoff den Erreger des Heufiebers darstellt bezw. enthält, sowie daß dieses Protein in den entsprechenden Pollen zur Heufieberzeit in ausreichender Menge auf die Schleimhäute gelangt, um bei disponierten Personen die typischen Reizerscheinungen auszulösen. Demnach ist die im Auge oder der Nase nach Applikation des Pollenproteins entstehende Reaktion für das Heufieber bezw. für die Disposition dazu, pathognomonisch und kann differentialdiagnostisch verwendet werden.

Literatur.

1) ALBERTS, Het Pollen-Asthma. Amsterdam 1903.
2) ALLEN, Americ. Journ. Med. Scienc. 1884, pag. 156.
3) BEARD, Medical Times and Gaz. 1877, Vol. II, pag. 385.
7) BLACKLEY, Experimental researches on the causes and nature of Catarrhus aestivus. London 1873.
5) BOSTOCK, Medico-Chirurg. Transactions 1819, Vol. X, pag. 161; ebenda, 1828, pag. 437.
6) DENKER, Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 19 u. 23.
7) DIETSCH, Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 7.
8) DUNBAR, Zur Ursache und spezifischen Behandlung des Heufiebers. München 1903.
9) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 9.
10) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 24—26, 28.
11) Ders., Ebenda 1905, Nr. 26, 28—30.
12) ELLIOTSON, London Med. Gaz. 1831, pag. 411; 1833, pag. 164.
13) FERBER, Arch. für Heilkunde 1868, pag. 556.
14) FINK, Das Heufieber und andere Formen des nervösen Schnupfens. Jena 1902.
15) HACK, Wiener med. Wochenschr. 1883, pag. 406; Deutsche med. Wochenschr. 1886, pag. 141.
16) HELMHOLTZ, Virchows Archiv 1869, Bd. XLVI, pag. 100.
17) HEYMANN und MATZUSHITA, Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVIII.
18) HOPE, Referat im Intern. Centralblatt für Laryngologie 1903, pag. 262.
19) JAMES, St. Paul Med. Journ. 1903, May.
20) KAMMANN, Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1904, Bd. V, Heft 7/8.
21) LIEFMANN, Zeitschr. für Hygiene 1904, Bd. XLVI; Hygienische Rundschau 1906, Nr. 15.
22) LOCKARD, Boston Med. and Surg. Journ. 1903, 15. Jan.
23) LUEBBERT, A., und PRAUSNITZ, C., Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 11/12.
24) LUEBBERT, Therapeut. Monatshefte 1904, Nr. 12.
25) MC BRIDE, Edinburgh Med. Journ. 1903, July.
26) MACKENZIE, J., Amer. Journ. Med. Science 1886, pag. 45.
27) MACKENZIE, MORELL, Hayfever. London 1885.
28) MAYER, New York Med. Journ. 1903, August.

---

*) Ich bin Herrn DR. GILDEMEISTER für die freundliche Mitteilung dieser Befunde sehr dankbar.

29) Molinié, Gaz. des Hôpitaux 1899, pag. 481.
30) Murphy, New York Med. Record 1901, 5. October.
31) Phoebus, Der typische Frühsommerkatarrh oder das Heufieber. Gießen 1862.
32) Prausnitz, Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 9.
33) Roe, Brit. Med. Journ. 1888, Vol. II, pag. 608.
34) Scherer, Journ. Michigan State Med. Soc. 1904, Nr. 5.
35) Semon, Sir F., Brit. Med. Journ. 1903, Nr. 2204 u. 2207.
36) Stein, New York Med. Record 1905, 6. May.
37) Sticker, Heufieber. Nothnagels Handbuch 1896, Bd. IV, pag. 1.
38) Stowell, New York Med. Journ. 1903, 5. Okt.
39) Thost, Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 17/18.
40) Ders., ibid. 1903, Nr. 23.
41) Weil, Verhandl. der Gesellschaft deutscher Naturf. und Ärzte. Hamburg 1901. pag. 393.
42) Wyman, Autumnal Catarrh. New-York 1872.

XVI.

Darstellung der Antigene mit chemischen und physikalischen Methoden.

Von

Priv.-Doz. Dr. Ernst P. Pick

in Wien.

Einleitung.

Mit dem Namen Antigen werden alle Substanzen bezeichnet, welche im lebenden Organismus die Bildung von spezifischen Antikörpern auslösen. Da diese Eigenschaft den verschiedensten Körpern eigentümlich ist und die Zahl neuer Antigene im stetigen Wachstum begriffen ist, so ist es nur schwer möglich, die Antigene in irgend eine Systematik zu bringen, geschweige denn sie nach bestimmten chemischen Prinzipien zu ordnen. Denn wir sind trotz einiger unleugbarer Fortschritte in der Erkenntnis dieser so ungemein reaktionsfähigen Substanzen noch immer nicht in der Lage, irgend etwas Sicheres über die Natur derselben auszusagen und der chemische Aufbau der Antigene bleibt wohl noch bis auf weiteres — allen hochgespannten Erwartungen der jüngsten Zeit zum Trotz — ein Objekt der Erörterung, in welcher die entgegengesetzten Meinungen und Hypothesen ihren Platz finden können.

So weit sich die vorliegenden Tatsachen überblicken lassen, scheint die chemische Natur der Immunität erzeugenden Substanzen eine recht verschiedene zu sein. Es geht dies zum Teil schon daraus hervor, daß die verschiedenen Antigene eine recht verschiedene Widerstandskraft gegen physikalische und chemische Eingriffe zeigen, ohne daß wir es durchaus immer etwa mit labilen Substanzen zu tun haben. Ich erinnere bloß an das gegen Temperatur widerstandsfähige Neurotoxin des Schlangengiftes, an die Präcipitinogene, welche tief eingreifende chemische Prozesse vertragen, ohne ihre Antigennatur einzubüßen, an das Ricin und Abrin, die sehr wohl mit bestimmten Giftkomponenten der tryptischen Verdauung widerstehen, und an andere wieder, wie die Immun-Hämolysine resp. -komplemente, die zum Teil ungemein thermolabil sind, an das Diphtherie- und Tetanustoxin, von dem die vieltausendfachen Dosen in kürzester Zeit vom tryptischen Fermente zerstört werden und viele andere. Viel mehr noch als die verschiedene Labilität gegen physikalische und chemische Eingriffe scheint für die große Verschiedenheit der Substrate das mannigfache biologische Verhalten der Antigene

zu sprechen, ihre verschiedenartige Wirksamkeit im Organismus, die Art ihrer Resorption und Ausbreitung in bestimmten Richtungen und weiter die Art ihrer Wirkung auf das Antitoxin, resp. die Bindungsweise mit demselben. Es ist bei der Betrachtung der chemischen Natur dieser Stoffe unbedingt nötig, das große experimentelle Material zu berücksichtigen, das die Immunitätsforschung in den letzten Jahren aufgestapelt hat, und es scheint der Vorwurf nicht unberechtigt zu sein, daß die relativ geringen Fortschritte, welche in der Erkenntnis der chemischen Natur dieser Körper gemacht worden sind, zum Teil auf der mangelhaften Berücksichtigung der experimentell mit diesen Körpern gewonnenen Erfahrungen beruhen. So hat uns das pathologische Experiment eine viel größere Vertrautheit mit der Natur dieser Substanzen gebracht, als die bloßen chemischen Methoden, welche sich ausschließlich auf die Reindarstellung dieser Körper beschränkten, und es ist zweifellos ein großes Verdienst der Lehre von den Immunkörpern, auf Grund des Experimentes eine Reihe von Methoden geschaffen zu haben, die für die Biochemie von der allergrößten Bedeutung sind.

Es scheint daher, daß auch der gewöhnliche methodische Gang durch Abbau zu reinen Körpern zu gelangen, der sonst bei der chemischen Reindarstellung und Charakterisierung ähnlicher Körper eingeschlagen zu werden pflegte, bei der Darstellung der Antigene nicht zum Ziele führt. Wir vermögen bisher auf Grund der mit dieser Methodik angestellten Untersuchungen nicht zu sagen, welcher Körperklasse die Antigene angehören, und insbesondere ist die Frage, ob Antigene oder ein großer Teil derselben den Eiweißkörpern zugehört, als eine vollkommen offene zu betrachten. So hat die Darstellung bestimmter Gifte (Abrin und Ricin) durch proteolytischen fermentativen Abbau zu giftigen Produkten geführt, welche keine gewöhnlichen Eiweißreaktionen geben, und man hat auf Grund dieses Befundes auf die Nichteiweißnatur der betreffenden Giftkomponenten geschlossen. Wie ich glaube, ist dieser Schluß nicht berechtigt. Es ist ganz wohl möglich, daß es sich in diesem Falle durchaus nicht um Körper handelt, die etwa den betreffenden Pflanzeneiweißkörpern bloß beigemengt sind, sondern daß in den Eiweißkörpern als solchen Gruppen die Träger der Giftwirkung sind, welche der Proteolyse widerstehen. Solche Gruppen sind ja bereits Kühne bekannt gewesen, und die neueren Untersuchungen E. Fischers und seiner Schüler haben diesen widerstandsfähigen Kern des Eiweißes noch weiter charakterisiert. Doch liegen auch noch andere Erklärungsmöglichkeiten für einen derartigen Befund vor, ohne daß die Nötigung vorliegen würde, die Eiweißkörper als bloßen Ballast resp. als Verunreinigung der hochwirksamen Gifte mit indifferenten Stoffen anzusehen.

Das einzige, mit wenigen Ausnahmen ziemlich allgemein angenommene, physikalisch-chemische Charakteristikum der Antigene ist ihre kolloidale Natur. Nun wissen wir aus zahlreichen Untersuchungen der letzten Jahre, daß Kolloide einander nicht allein in der verschiedenartigsten Weise beeinflussen können, sondern daß durch Vermischen zweier verschiedener Kolloide miteinander Lösungen von ganz neuen Eigenschaften entstehen, wobei es für unsere Betrachtung völlig gleichgültig ist, ob die Verbindung zwischen den zwei Kolloiden eine chemische ist oder nicht; das Wesentliche sind für uns die neuen Eigenschaften, die durch Zusammentritt der Kolloide entstanden sind und welche ursprünglich keinem der reinen Kolloide vor der Vereinigung eigentümlich waren. Als Beispiel mag der Cassiussche Purpur hier angeführt sein, dessen

chemische Natur auf Grund der eigentümlichen, nur dem Goldpurpur eigenen Reaktionen durch Jahrzehnte strittig war, bis es erst durch die von ZSIGMONDY herbeigeführte Synthese mit den Hydrosolen von Gold und Zinnsäure gelang, den Purpur als Gemenge dieser Substanzen oder nach VAN BEMMELENS Ausdrucksweise als Absorptionsverbindung zu charakterisieren. Es steht unseres Erachtens nach durchaus nichts im Wege, auch die Antigene resp. ihre Eigenschaft, Immunkörper zu erzeugen, auf solche Absorptionsverbindungen zwischen gewissen Kolloiden und den Giften zurückzuführen, um so weniger als eine ähnliche Auffassung bei der Einwirkung von Toxinen auf Antitoxine sich allmählich auf Grund der Untersuchungen von LANDSTEINER und BILTZ (siehe auch PAULI und ZANGGER) vielfach bereits Bahn gebrochen hat. Sind wir dann noch weiter berechtigt, die Eiweißkörper*) nur als verunreinigenden Ballast der Antigene zu betrachten? Gewiß nicht. Denn gerade die Anwesenheit von kolloidalen, hochmolekularen Komplexen, wie es die Eiweißkörper sind, scheint für die charakteristische Wirkung der Antigene ausschlaggebend zu sein. Wir kennen bisher keinen einzigen experimentell einwandsfrei begründeten Fall, daß irgend ein „rein", d. h. einwandsfrei dargestelltes Gift sich auch als ebenso gutes Antigen, wie etwa das ungereinigte Ausgangsmaterial, erwiesen hätte; der Grund mag ja zunächst ein rein äußerlicher sein, daß nämlich die Schwierigkeit der Beschaffung des reinen Materials ein Hindernis für ausgedehnte Versuche in der angegebenen Richtung bildet. Aber daß die Eiweißkörper, welche die giftigen Substanzen begleiten, nicht nur die Rolle von lästigen Beimengungen spielen, geht ja schon daraus hervor, daß die wenigen „rein" dargestellten Gifte zum Teil ein anderes Verhalten zeigen, als die eiweißhaltigen. So berichtet JACOBY, daß sein durch Trypsinverdauung und Salzfällung eiweißfrei dargestelltes Ricin sowohl durch Trypsin, wie auch durch H_2O_2 leicht zerstört wird, während es in eiweißhaltiger Lösung gegen Trypsin resistent ist und von H_2O_2 nur langsam angegriffen wird. Ebenso merkwürdig ist das Verhalten des von FAUST in der jüngsten Zeit dargestellten Ophiotoxins. Während das native, eiweißhaltige Kobragift bei subkutaner Applikation sehr rasch resorbiert wird und die intensivste Wirkung herbeiführt, wirkt das reine Ophiotoxin subkutan nur sehr langsam und zwar derart, daß eine Dosis von 8 mg des nativen Giftes, das höchstens 1 mg reinen Ophiotoxins enthält, eine Wirkung ausübt, die von dem reinen Gift erst bei der zwölffachen Dosis (bei 12 mg) erzielt wird und erst die 30—40fache Menge des reinen Giftes subkutan beigebracht, bringt denselben Effekt hervor, als die intravenöse Applikation. Auch hier wächst die Zersetzlichkeit und die Veränderlichkeit des Giftes mit abnehmendem Gehalt seiner Lösungen an biuretartig reagierenden Stoffen, so daß FAUST den Schluß zieht, daß im nativen Kobragift das Ophiotoxin salz- oder esterartig an Eiweiß oder eiweißartige Stoffe gebunden ist und „daß Ophiotoxin durch die Art der Bindung an Eiweiß vor den im freien oder ungebundenen Zustande leicht eintretenden und Unwirksamwerden herbeiführenden Veränderungen im Molekül geschützt ist".

Spielen aber die „anhaftenden" eiweißähnlichen Stoffe oder Eiweißkörper bereits bei der Resorbierbarkeit und Haltbarkeit der giftigen

---

*) Dabei soll natürlich nicht geleugnet werden, daß ein großer Teil der Eiweißkörper, aus denen sich die nativen antigenhaltigen Substrate zusammensetzen, ohne Schaden für die Antigenwirkung entfernt werden kann.

Substanzen eine so große Rolle, kann die Annahme nicht zurückgewiesen werden, daß dieselben Körper bei den intravitalen Prozessen, welche eben zur Immunkörperbildung führen, von allergrößter Bedeutung sein dürften. Wir können sie also keinesfalls als Schlacken oder ganz gleichgültige Beimengungen des Antigens betrachten, zumal bei manchen Antigenen, wie z. B. bei den Präzipitinogenen nach den Untersuchungen von Obermayer und E. P. Pick die allergrößte Wahrscheinlichkeit vorliegt, daß es sich da in der Tat um Eiweißkörper handelt. Gerade der Einfluß von Proteinen und Kolloiden bei der Antigenwirkung von Giften und die Auffassung der Antigene als Absorptionsverbindungen ist einer experimentellen Prüfung zugänglich, die seit längerer Zeit bereits vom Referenten in Angriff genommen ist.

Von hämolytischen Antigenen wurden insbesondere die Schlangengifthämolysine und andere tierische Hämolysine, wie das Skorpionen- und Bienengift, die Hämolysine des Pankreassaftes des Hundes und des Menschen durch die Darstellung sogenannter Lecithide nach Kyes einer Reinigung unterzogen und Produkte gewonnen, welche in Alkohol, Chloroform und ähnliche Lösungsmittel übergehen und vielfach die Biuretreaktion vermissen lassen. Indeß muß auch hier nach den neuesten Untersuchungen von L. Michaelis und P. Rona hervorgehoben werden, daß die Löslichkeitsverhältnisse, welche scheinbar die Eiweißnatur dieser Antigene ausschließen, nicht gegen den Eiweißcharakter sprechen, da die beiden letzteren Autoren den Nachweis erbrachten, daß sogar Albumosenlösungen durch Zufügen von Lecithin alkohol- und chloroformlösliche Produkte liefern; die durch Lecithinzusatz erfolgte Änderung der Löslichkeitsverhältnisse kann daher, wie auch Morgenroth und Carpi betonen, die Eiweißnatur dieser Körper durchaus nicht ausschließen. Da andererseits die interessanten Untersuchungen von Preston Kyes zeigen, daß in die als Lecithide bezeichneten Produkte nur eine relativ sehr geringe Menge des wirksamen Rohproduktes übergeht, so ist die Annahme nicht unwahrscheinlich, daß der Mangel der Biuretreaktion entweder diesem Umstande allein zuzuschreiben ist oder daß Lecithinverbindungen entstehen, welche das Auftreten der typischen Biuretreaktion in irgend einer Weise behindern.

Ähnliche Erwägungen scheinen mir auch Geltung zu haben für die hämolysinbildenden Substanzen, wie sie von Landsteiner und seinen Mitarbeitern und von Bang und Forssmann aus den roten Blutkörperchen dargestellt worden sind; auch hier mag der „Immunisator" (Bang und Forssmann), der als eingetrockneter Ätherextrakt aus Blutkörperchen gewonnen, eine typische, spezifische Hämolysinbildung bewirkt, seine Löslichkeit in Chloroform und Benzol dem Lecithin oder ähnlich wirkenden Körpern verdanken, ohne daß der Beweis der Nichteiweißnatur dieser Antigene dadurch erbracht wäre.

Daß ähnlich, wie bei den oben angeführten Toxinen die Eiweißkörper, bei den eben erwähnten Hämolysinen die Anwesenheit der Lecithine, sei es durch rein physikalische oder auch chemische Einwirkung, die Natur des Antigens in hervorragender Weise beeinflussen kann, zeigt nicht allein die veränderte Löslichkeit der Lecithide, sondern auch die in manchen Punkten veränderte spezifische Reaktionsfähigkeit des Kobralecithids gegenüber den mit dem Rohgift erzeugten Immunkörpern (Kyes) und dessen Beständigkeit gegenüber den das freie Kobrahämolysin rasch zerstörenden proteolytischen Fermenten (Teruuchi, Morgenroth und Carpi), ein Umstand, der das allergrößte biologische Interesse verdient.

Die hier aufgeworfenen Fragen stehen im innigen Zusammenhange mit einem zweiten bisher noch ungelösten Problem, nämlich der Identität des die Giftwirkung und Antigenwirkung auslösenden Komplexes. Bereits aus dem eben Gesagten ergibt es sich, daß eine Identität nicht nötig ist, ja es erscheint nicht unwahrscheinlich, daß die beiden physiologischen Wirkungen bis zu einem gewissen Grade voneinander getrennt sind. Ein Nachweis der Identität der beiden Komplexe ist bisher wenigstens nicht erbracht und wir wollen vorläufig diese beiden Wirkungen, die reine Giftwirkung und die Antigenwirkung als zwei getrennte Begriffe betrachten, wobei wir die Wirkung gewisser Gifte Substanzen zusprechen, die ihre Giftwirkung auch dann bewahren können, wenn sie von den begleitenden Eiweißkörpern oder eiweißähnlichen Körpern befreit sind, während die Wirkung der Antigene an Absorptionsverbindungen dieser Gifte mit gewissen Proteinen oder proteinartigen Stoffen geknüpft wäre. Wir werden daher in bezug auf viele Antigene, insbesondere soweit es sich um die sogenannten Toxine handelt, an dem alten Begriffe des Toxalbumins festzuhalten haben und lassen es dahingestellt, ob die eigentliche Giftwirkung eiweißfreien Toxinen oder bereits Absorptionsverbindungen in unserem Sinne zukommt. Nicht unerwähnt soll dabei bleiben, daß alle bisherigen Züchtungs-Versuche auf eiweißfreien Nährböden Toxine von nur sehr geringer Wirksamkeit ergaben und selbst diese geringen Giftmengen auf geringfügige Eiweißquantitäten zurückgeführt werden, welche den Nährlösungen durch die Bakterienleiber beigemengt waren. So glaubt ZINNO, daß zur Toxinproduktion Eiweiß unumgänglich notwendig sei.

Aus dem früher Angeführten geht ohne weiteres hervor, daß wir bei der Darstellung der Antigene uns hauptsächlich solcher Methoden bedienen werden, wie sie bei den Arbeiten mit kolloiden Substanzen und insbesondere mit Eiweißkörpern üblich sind, und wir werden in der Folge sehen, daß die einfachsten Methoden der Eiweißchemie bei der Darstellung und Reinigung der meisten Antigene Anwendung fanden. Für die Erkenntnis des feineren Baues dieser Substanzen werden freilich den Abbau- und Spaltungsmethoden die Substitutions- und synthetischen Methoden vorzuziehen sein, die sich bei der Untersuchung der Präzipitinogene durch OBERMEYER und PICK und bei der Darstellung und dem genaueren Studium der Lecithide durch EHRLICH und seine Schüler KYES, SACHS und MORGENROTH als gut gangbar erwiesen hatten. Allerdings ist die Auswahl der Methoden durch die Labilität des Materiales eine eng begrenzte. Dabei darf nicht außer acht gelassen werden, daß wir es nahezu niemals mit gut chemisch begrenzten Stoffen zu tun haben, sondern mit Körpergemengen, die auch im biologischen Sinne zumeist eine ganze Reihe von Wirkungen repräsentieren, die scheinbar miteinander nicht zusammenhängend, dennoch an das gleiche Substrat geknüpft sind.

Die Trennung in biologisch verschiedenartig wirksame Individuen ist den gewöhnlichen chemischen Trennungsmethoden zumeist versagt und hier müssen die feineren biologischen Methoden als vollwertiger Ersatz eintreten. Es kann so z. B. an ein und dasselbe Substrat sowohl eine toxische, hämolytische wie eine fermentative Wirkung geknüpft sein, und selbst die bisher am reinsten dargestellten Antigene, z. B. das Rizin oder das Ophiotoxin, tragen neben der eigentlich toxischen Hauptwirkung stets noch eine andere Nebenwirkung, so das Rizin die Agglutininwirkung auf rote Blutkörperchen, das Ophiotoxin die hämolytische des Kobragiftes. Daß ein Antigen mit einem fremden Antitoxin, so das Tetanusantitoxin

mit dem Präzipitinogen des Serums, innig vergesellschaftet sein kann, zeigen die Befunde von Dehne und Hamburger deutlich an.

Das Material, aus dem wir die Antigene darstellen, bestimmt von vornherein den methodischen Gang. Dieser wird ein verschiedener sein, wenn es sich um flüssige oder feste Kulturmedien handelt oder um höhere Pflanzen oder um tierische Gewebe und Gewebssäfte; die Methodik wird ebenfalls variieren, je nachdem wir es mit labilen oder mit gegen thermische und chemische Einflüsse widerstandsfähigen Antigenen zu tun haben, und sie wird ebenfalls wechseln müssen, wenn es sich um Stoffe handelt, die leicht extrahierbar von den Zellen selbst nach außen sezerniert werden, oder um Zellbestandteile, welche erst nach Zertrümmerung des Zellleibes eine zweckmäßige Anwendung im Experiment gestatten.

Man wird auf Grund des eingeschlagenen Verfahrens entweder Antigene erhalten, wie sie in dem ursprünglichen Ausgangsmaterial vorhanden sind — native Antigene —, oder in ihrer ursprünglichen Wirksamkeit durch die Methodik veränderte Körper — denaturierte Antigene. — Da es sich bei den letzteren zumeist um eine Abschwächung der ursprünglich zu giftigen, für die Immunisierung unbrauchbaren Körper handelt, haben solche denaturierte Antigene und die hier einschlägigen physikalisch-chemischen Methoden schon seit Pasteurs Milzbrandvaccine stets eine große Rolle gespielt und verdienen daher auch hier Berücksichtigung.

Es erscdeint uns am zweckmäßigsten, die hierher gehörigen physikalisch-chemischen Darstellungsmethoden, die sich ja notgedrungen in manchen Punkten mit den bakteriologischen Methoden berühren, zu trennen in jene Verfahren, welche die Gewinnung der Antigene aus dem Ausgangsmaterial bezwecken und jene, welche die eigentlichen Reinigungsprozesse der Antigene umfassen. Es kann natürlich in dem mir hier zugewiesenen Rahmen von einer erschöpfenden Darstellung nicht gesprochen werden, sondern es sollen nur die allgemeinen Prinzipien der Antigendarstellung geschildert werden, wobei die den einzelnen Giften gewidmeten speziellen Kapitel dieses Handbuches ergänzend eintreten müssen*).

I. Chemische und physikalische Methoden der Gewinnung der Antigene.

A. Gewinnung bakterieller Antigene.

Zahlreiche Bakterien haben die Fähigkeit, in ihren Nährlösungen Gifte zu produzieren, die äußerst leicht von den an und für sich ungiftigen Zelleibern getrennt werden können. Es spielt dabei zumeist keine große Rolle, ob es sich um flüssige Nährböden, so z. B. die gewöhnliche Peptonbouillon, oder um feste Agar- oder Gelatinekulturen handelt, vorausgesetzt, daß die Wachstumsbedingungen und die Zusammensetzung des Nährsubstrates eine reiche Toxinproduktion überhaupt ermöglicht. Bei anderen Bakterien kennen wir bisher keine in die Nährlösungen „sezernierten" Gifte, und man stellt sich vielfach vor, daß diese Gifte erst dann frei werden, wenn der Bakterien-Zelleib zerfällt, um auf diese Weise die deletäre Wirkung dieser Bakterien im tierischen Organismus zu erklären. Man bezeichnet diese erst nach dem Zerfall der Bakterien in

*) Eine ausgezeichnete Übersicht über das einschlägige Material liefert die Monographie Oppenheimers, Toxine und Antitoxine. G. Fischer, Jena 1904.

Freiheit gesetzten giftigen Substanzen als Endotoxine und hat eine ganze Reihe äußerst sinnreicher Methoden gefunden, um durch künstliche Zertrümmerung der Zelleiber die Endotoxine in Freiheit zu setzen. Indes muß vorweggenommen werden, daß keine der mit geradezu gigantischen Mitteln arbeitenden Methoden viel mehr zu leisten imstande ist, als die relativ einfachen Extraktion- und Konzentrierungsmethoden, so daß vielmehr der Anschauung Ausdruck gegeben werden muß, daß keinesfalls die mechanischen Verhältnisse innerhalb des Zelleibes die „Sekretion" des Endotoxins verhindern, sondern daß die physiologischen Verhältnisse in unseren bisher angewandten künstlichen Nährmedien einfach derartige sind, daß sie eine sinnfällige Giftproduktion, wie sie im tierischen Organismus stattfindet, überhaupt nicht oder nur in geringem Umfange gestatten. Eine derartige Auffassung des von PFEIFFER auf Grund seiner klassischen Cholerastudien geschaffenen Endotoxinbegriffs würde sich mit dem Tatsächlichen decken und phantasievollen Hypothesen über die Stellung der Endotoxine als Antigene den Boden entziehen.

I. Antigene aus Toxin sezernierenden Bakterien.

a) Trennung der Bakterienleiber durch Sedimentierung, Zentrifugieren, Zusatz von Klärpulvern und Papierfiltration.

Zu den hierher gehörigen Giften zählen wir das Diphtherietoxin Tetanustoxin, das Botulismusgift, das Pyocyaneustoxin, das Rauschbrandgift, das Dysenteriegift des Bazillus KRUSE-SHIGA, MARKLS Pesttoxin, ferner die hämolytischen Gifte der Bakterien, das von DENYS und VAN DE VELDE entdeckte Leukocidin der Staphylokokken und die akut wirkenden Gifte bestimmter Vibrionen und Cholerastämme (Vibrio Nasik, Cholera El Tor [KRAUS]; Saigonstamm [BRAU und DENIER]). Endlich sind hierher zu rechnen die zahlreichen an den Eiweißkörpern und eiweißartigen Stoffen hängenden Antigene, die zur Bildung von Agglutininen, Koagulinen und antifermentativen Immunkörpern (v. DUNGERN, GHÉORGHIEWSKY, GLÄSSNER usw.) führen.

Der Typus der hierher gehörigen Antigene ist das Diphtheriegift; dasselbe wird derart dargestellt, daß toxinhaltige Bouillonkulturen behufs Abtötung der Bakterien mit einem Desinfiziens versetzt werden. Dabei kann zweckmäßig ein Zusatz konzentrierter Karbolsäure verwendet werden und zwar derart, daß auf je ein Liter Bouillon 5 ccm der Karbolsäurelösung zugesetzt werden, so daß ein 0,5 $^0/_0$-Gehalt an Karbolsäure resultiert. Durch den Karbolsäurezusatz werden die Bakterien nicht allein abgetötet, sondern sie sedimentieren nach Umschütteln der Flüssigkeit bei ca. zweitägigem Stehen und es kann dann die klare überstehende Lösung entweder direkt von dem Sediment abgegossen werden oder durch ein gut dem Trichter anliegendes Papierfilter klar filtriert werden, wobei die Bakterienleiber am Filter zurückbleiben. Das klare Bouillonfiltrat stellt das Toxin resp. das gebrauchsfähige Antigen dar. Man kann statt Karbolsäure auch ein anderes Desinfiziens, so z. B. Toluol verwenden, wie dies nach den Angaben von OTTO im Frankfurter Institut für experimentelle Therapie bei der Herstellung der Testgifte üblich ist. Jeder der 500 g Bouillon fassenden Kolben mit gut gewachsenen Bazillen wird umgeschüttelt, so daß sich die oberflächlich gewachsenen Bakterien senken, die überstehende Flüssigkeit in 1-Literkolben umgefüllt und mit einer $1^1/_2$ bis 2 cm hohen Toluolschicht überschüttet. Diese Kolben müssen

zwei bis drei Tage unter Toluol stehen, wobei sie mehrmals täglich kräftig geschüttelt werden, damit die noch verhandenen Bakterien abgetötet werden. Nachdem sich alles Toluol über dem Gift angesammelt hat, kann bereits eine Probe zur orientierenden Giftprüfung dem Kolben entnommen werden. In gleicher Weise stellte auch Wassermann sein Pyocyaneustoxin dar.

Ein anderes Trennungsverfahren, das insbesondere dort angewendet wird, wo eine Sedimentierung nur schwer statthat und eine Filtration ebenfalls nicht durchführbar ist, besteht in der Benützung der Zentrifuge. Sie kann ihre praktische Anwendung bei der Darstellung des Tetanustoxins im großen finden, wobei es sich insbesondere darum handelt, die schwierig zu vernichtenden Tetanussporen ohne Verlust an Gift zu entfernen. Nach den Angaben von Marx wird diese Methode im Ehrlichschen Institute in der Weise mit einer Salzfällung kombiniert, daß die tetanustoxinhaltige Zuckerbouillon mit festem Ammonsulfat ausgesalzen, die Fällung sofort in Kochsalzlösung gelöst wird und nun die noch stark sporenhaltige Flüssigkeit eine Stunde auf einer mit 4000 Touren in der Minute laufenden Zentrifuge scharf zentrifugiert wird. Diese Prozedur wird nach jedesmaligem Ausfällen und Lösen der vom Sediment abgehobenen Flüssigkeit wiederholt; nach drei- bis viermaligem Zentrifugieren erhält man eine nahezu sporenfreie Giftlösung.

Eine weitere schonende Methode ist jene, welche Grassberger und Schattenfroh bei der Darstellung des Rauschbrandgiftes verwandten und welche die Umgehung der, wie wir gleich hören werden, durch Adsorption große Toxinverluste bedingenden Bakterienfilter gestattet und in der Anwendung von Klärpulver (sterilisierte Schlemmkreide)*) besteht; deren Benützung befreit die Bouillonkultur von den lebenden Keimen, ohne den Toxingehalt der keimfreien Flüssigkeit wesentlich herabzusetzen, während Pukall- und Chamberlandkerzen eine fast vollständige Entgiftung der Rauschbrandgiftlösungen herbeiführen.

Diese hier angeführten Methoden sind die einfachsten Trennungsmethoden der „sezernierten" Gifte von den Bakterien und gewähren naturgemäß eine nahezu quantitative Ausbeute der in den Nährmedien vorhandenen Antigene, wobei zumeist auch die Gefahr einer Verunreinigung mit fremdartigem Material nicht besteht. Sie werden daher sehr häufig bei der Darstellung der verschiedensten bakteriellen Antigene angewandt.

b. Trennung durch Ton- und Porzellanfilter, Infusorienfilter und gepreßte Papierfilter.

Die Methoden der Filtration bakterienhaltiger Flüssigkeiten durch poröses Tonmaterial werden zur Darstellung der Gifte und Antigene sehr häufig verwendet, insbesondere dort, wo es nicht auf quantitative Ausbeuten ankommt. Denn zahlreiche Gifte passieren nur unvollständig Tonfilter, welche durch Adsorption sehr viel von dem kolloiden Material zurückhalten; insbesondere alte, bereits wiederholt verwendete Filter und Kerzen bleiben häufig infolge der Verstopfung der Poren für Toxine undurchgängig. Wird sehr eiweißreiches Material durchfiltriert, dann kann es im Verlaufe der Filtration sehr leicht zur völligen Verlegung

*) Siehe näheres in Grassberger-Schattenfrohs Abhandlung über das Rauschbrandgift in diesem Handbuche.

des Filters kommen, so daß nicht allein kolloide Gifte zurückgehalten werden, sondern selbst Kristalloide passieren derartige Filter nicht mehr.

Die verschiedenen hauptsächlich in Betracht kommenden Tonfilter, die Chamberland-, Reichel- und Pukallfilter, unterscheiden sich durch die Größe der durchlässigen Poren sehr wesentlich voneinander und man hat aus dem Passieren des einen oder anderen Filters auch Schlüsse auf die Größe der durchtretenden Teilchen resp. Organismen gezogen. Zsigmondy hat es unternommen, die Größe der Filterporen einiger Tonkerzen zu bestimmen, indem er kolloidale Goldlösungen von bekannter Teilchengröße durch dieselben filtrierte. Er verwendete eine Filterkerze nach Maassen, ein Pukallfilter und eine Chamberlandfiltrierkerze. Die beiden ersten Kerzen haben größere Poren, die Chamberlandkerze sehr feine Poren, aber alle drei Arten enthalten Poren, die groß genug sind, Goldteilchen von etwa 30 $\mu\mu$ und darüber durchzulassen. Doch ist die Porengröße bei einem und demselben Filter sehr verschieden. Daß jedoch die Porengröße beim Filtrieren nicht allein den Ausschlag gibt, sondern daß es in erster Linie darauf ankommt, ob die zu filtrierenden Teilchen an der Oberfläche durch Adsorption festgehalten werden oder nicht, geht aus folgendem Versuch Bredigs und Zsigmondys hervor. Wird zu kolloidalem Gold Hühnereiweiß zugefügt und diese eiweißhaltige Goldlösung durch Pukall- oder Maassenfilter filtriert, so gehen alle Goldteilchen glatt durch die Zelle ohne nachweisbare Konzentrationsänderung. Läßt man jedoch das Eiweiß oder ein anderes geeignetes Schutzkolloid weg und filtriert reines Goldhydrosol durch, so werden die Goldteilchen auf der äußeren Oberfläche des Filters festgehalten und verhindern zunächst teilweise, später ganz den Durchtritt der übrigen Goldteilchen. Man sieht also, daß es auf das zu filtrierende kolloide Material im höchsten Grade ankommt und daß Schlüsse aus der Filtrierbarkeit resp. Undurchlässigkeit auf die Teilchengröße nur mit großer Vorsicht gezogen werden dürfen.

Eine besondere Art von Filtern stellen die von Martin und Cherry bei ihren bekannten Trennungsversuchen angewendeten, mit Gelatine imprägnierten Pasteur-Chamberlandkerzen dar, welche wohl Diphtherietoxin durchlassen, während das Antitoxin nicht durchtritt. Einer besonderen Erwähnung verdient ferner das Berkefeldfilter, welches aus Infusorienerde dargestellt, auch für die kleinsten sichtbaren Mikroben undurchgängig, nach den Untersuchungen von Remlinger und Anderen das Lyssa-Virus passieren läßt, ebenso wie nach Borrel auch das infizierende Agens der Schafpocken. Steinhardt gibt an, daß bakteriolytische Komplemente nur zum Teile durch Berkefeldfilter filtrieren, da ein Teil durch Adsorption zurückgehalten wird.

Um den vielfach sehr unbequemen Absorptionserscheinungen zu entgehen, war man bestrebt, das poröse Ton oder Kieselgurmaterial durch gepreßte Papierfilter zu ersetzen; ein solches gut brauchbares Filter hat vor mehreren Jahren E. Freund in Wien herstellen lassen und in ähnlicher Weise hat ein Filter jüngst Heim empfohlen (ein Asbestfilter, das auch zur Sedimentierung und Sammlung der Bakterienleiber benutzt werden kann). Zur Filtration sehr kleiner Flüssigkeitsmengen hat Reiser vor kurzem eine zweckmäßige Vorrichtung beschrieben, welche eine rasche und quantitative Filtration gestattet. (Siehe Chemiker-Zeitung, 30. Jahrg., S. 686.)

Die Handhabung der Bakterienfiltration durch Tonfilter findet hauptsächlich bei der Darstellung des Tetanustoxins im Großen statt, um mit

voller Sicherheit auf diese Weise das sporenhaltige Giftmaterial zu reinigen. Erst aus den erhaltenen sterilen Filtraten wird durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat das zu Immunisierungszwecken nötige Tetanustoxin gewonnen. Es mag hier gleich vorweg genommen werden, daß auch die Trennung einzelner hämolytischer Komplemente, wie sie Ehrlich und seine Schüler (Neisser und Döring für Meerschweinchen und Kaninchenblut) und Lüdke (durch Filtration von Menschen- und Hühnerserum

— A
— H
— G_1
— T
— G_2
— B

Fig. 1. Sterile Filtration durch Papierfilter.

durch frische Pukallfilter für Hammel- und Schweineblut) durchführten, in bestimmten Fällen durch Tonfiltration leicht zu bewerkstelligen ist.

Zur Illustration des Mechanismus steriler Filtration mögen die beiden beigegebenen Abbildungen dienen, von denen die eine die Filtration durch gewöhnliche sterile Papierfilter, die andere eine solche durch Chamberlandkerzen darstellt.

Die Papierfiltration, wie sie auch bei der Verarbeitung von Immunseren zum Abfiltrieren der nach Karbolisierung entstehender Eiweißkoagula, Bodensätze usw. im staatlichen serotherapeutischen Institute zu Wien verwendet wird, kann natürlich in gleicher Weise auch zur Entfernung karbolisierter Bakterienleiber, wie bei der Darstellung des Diphtherietoxins, Botulismustoxins, Dysenterietoxins und anderer Toxine gehandhabt werden. Die Anlage (Fig. 1) stellt einen mit Türen verschließbaren Schrank dar, in welchem auf einem in Mannshöhe angebrachten Holzgestell die zu filtrierenden Flüssigkeiten (karbolisiertes Immunserum, abgetötete Bouillonkulturen) in Flaschen aufgestellt sind. In diese mit Watte und Papier verschlossenen Gefäße (*A*) reichen sterile Heberrohre (*H*), an welche sterile, mit Klemmen oder Quetschhähnen versehene Gummischläuche (G_1) außen angebracht sind, die an ihrem zweiten Ende an ein Messingrohr angeschlossen sind; dasselbe führt direkt in den sterilen Filtriertrichter (*T*) und ist an eine den Trichter bedeckende Messingplatte angelötet. Der Trichter ist zuerst mit einem Kalmuck, dann mit dem eben erwähnten das Messingrohr tragenden Messingdeckel und endlich oben mit einer Papierlage verschlossen; durch alle drei Schichten tritt das Messingrohr durch. Der Trichter ist mit einem gut anliegenden, glatten Filter beschickt, bei größeren Trichtern ist die Anlegung eines Filterschutzes wegen der Gefahr des Reißens des Filters zweckmäßig. Der Ablauf des Trichters ist wieder mit einem sterilen Gummischlauch (G_2) und einem Glasrohr mit dem die filtrierte Flüssigkeit aufnehmenden, mit Watte und Papier verschlossenen sterilen Gefäß (*B*) verbunden. Die Filtration wird derart in Gang gebracht, daß durch Zusammendrücken und Streichen des am Heberrohr angebrachten Gummischlauches (G_1) die Heberwirkung in Gang gebracht wird, wodurch die Flüssigkeit in den Trichter einläuft; die Filtration geht vollkommen selbsttätig vonstatten und der Zufluß kann durch die an den Schläuchen angebrachten Klemmen oder Quetschhähne beliebig reguliert werden. Behufs Beschleunigung der Filtration kann auch ein Gefäß durch Anlegen eines *T*-Rohres an das Heberrohr gleichzeitig mit zwei oder auch mit mehreren Trichtern verbunden werden.

Die in der zweiten Abbildung*) (Fig. 2) ersichtliche Filtrationsanlage durch Chamberlandkerzen ist nach einer Anlage im Statens Seruminstitut in Kopenhagen reproduziert. Dieselbe besteht aus einer großen Wasserstrahlpumpe (*a*), welche mittels einer Rohrleitung (*b*) zunächst zwei große mit Manometer versehene Kupferbehälter (Vakuumreservoirs) (*c, d*) evakuieren kann, die dazu bestimmt sind, über Nacht konstantes Vakuum zu halten; außerdem können durch besondere Leitungen (*e, f* und *g, h*) die Filter direkt von der Wasserstrahlpumpe aus evakuiert werden. Die Filter selbst bestehen aus der Tonkerze (*i*), einem mit Watte verschlossenen Glasbehälter (*l*), durch welchen das Eingießen der zu filtrierenden Flüssigkeit in die Kerze stattfindet und einer Vorlage (*m*), welche durch ein auf der Reproduktion nicht sichtbares Verbindungsstück (*n*) mit der Vakuumleitung verbunden ist; außerdem ist die Vorlage mit einer Abfüllvorrichtung (*o*) mittels eines durch Klemmhahn verschließbaren Gummischlauchs (*p*) in Verbindung.

*) Ich verdanke dieselbe der besonderen Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. Dr. TH. MADSEN in Kopenhagen.

II. Abschwächungsmethoden der Toxine behufs praktischer Anwendung als Antigene.

Da die auf eben beschriebene Weise gewonnenen Toxine vielfach wegen ihrer intensiven Wirkung bei Beginn der Immunisierung nicht als Antigene verwendet werden können, hat man versucht, dieselben durch Wärme und Einwirkung von Chemikalien abzuschwächen, um erst auf Grund der Vorbehandlung mit derart modifizierten Giften die Immunisierung fortzusetzen.

a) Abschwächung durch Erhitzen.

Das älteste Verfahren ist die Abschwächung der gifthaltigen Kulturen durch Erhitzen. L. Vaillard ist bereits 1891 bei seinen Immunisierungs-

Fig. 2. Sterile Filtration durch Tonfilter.

versuchen mit Tetanus in der Weise vorgegangen, daß er filtrierte und durch Erhitzen auf 60° teilweise entgiftete Tetanuskulturen, denen er dann voll virulente Kulturen folgen ließ, in die Blutbahn einspritzte; auch Aronson verwendete bei den älteren Immunisierungsversuchen gegen Diphtherie steigende Mengen mehrwöchentlicher Diphtheriebouillonkultur, welche eine Stunde auf 70°, dann solche, welche eine Stunde auf 62° erhitzt worden war. Die weitere Behandlung erfolgte durch Injektion von mäßig giftigen mit $0{,}3\,^0/_0$iger Trikresollösung sterilisierten Kulturen und endlich von alten, äußerst giftigen Diphtheriebazillen.

Die gleichmäßige Erhitzung von Toxinen und Kulturen geschieht in der Weise, daß die betreffende Lösung in ein Wasserbad mit oder ohne konstanten Zufluß eingestellt und mittels einer kleinen, mit einem Thermoregulator verbundenen Gasflamme (Mikrobrenner) geheizt wird. Je nach der Einstellung des Regulators kann die Flamme verkleinert oder vergrößert werden und so die gewünschte Temperatur erreicht und konstant

erhalten werden. Am bequemsten erweisen sich die gewöhnlichen Reichelschen Quecksilberregulatoren. Handelt es sich um kleinere, bei konstanter Temperatur zu erhaltende Flüssigkeitsmengen, z. B. mittelgroße Bechergläser, so genügt für gewöhnlich eine Drahtspirale als Rührer, um die ganze Flüssigkeitssäule des Bades gleichmäßig temperiert zu erhalten (Fig. 3), oder man kann in einfacher Weise nach Ostwald eine Windmühle anbringen, welche auf die Achse der im Wasserbade auf dem Boden ruhenden Rührarme aufgesetzt ist und durch den aufsteigenden Luftzug eines darunter gesetzten Flämmchens betrieben wird. Die Windmühle kann aus Draht und steifem Papier, Aluminiumblech oder Glimmer hergestellt sein und ca. 40—50 cm im Durchmesser haben (s. Fig. 4). Eine andere Art des Rührens kann man erzielen, wenn man durch die zu bewegende

Fig. 3. Versuchsanordnung zum gleichmäßigen Erhitzen im Becherglase.

Fig. 4. Wasserbad mit Windmühle nach Ostwald.

Flüssigkeitsmasse etwa mit einem Wasserstrahlgebläse Luft durchleitet. Bei größeren Wasserbädern hat Ostwald ein Rührwerk angebracht, das an einen Motor angeschlossen, das Wasser in ständiger Bewegung erhält und für die Gleichmäßigkeit der Temperatur innerhalb des ganzen Gefäßes sorgt. Zur Vermeidung einer raschen Wärmeabgabe an die Umgebung ist das Ostwaldsche Wasserbad in ähnlicher Weise, wie die Brutschränke, als ein mit Doppelseitenwänden versehener Kupferblechkasten konstruiert, dessen Außenwände mit Filz isoliert sind (Fig. 5).

Um die bei kleinen Flüssigkeitsmengen oberhalb der Temperatur von 50° bereits eintretende Verdunstung zu hindern, kann man eine dünne Schichte Paraffinöl auf die Wasseroberfläche ausgießen. Für Temperaturen über 90° kann man als Bad zweckmäßig Glyzerin, Paraffinöl

und ähnliches benützen. Zur genaueren Beobachtung der Temperatur ist nach Morgenroth ein Thermometer mit besonders breiter Gradeinteilung (1° C = 1 cm) sehr vorteilhaft; derartige Thermometer brauchen dabei für bestimmte Zwecke nur eine gewisse Zone von Graden zu umfassen.

Es ist selbstverständlich, daß auch statt der Wasserbäder ein entsprechend eingestellter Trockenschrank zur Inaktivierung benutzt werden kann, doch ist dabei zu bemerken, daß in einem derartigen Luftbade die Körper verhältnismäßig langsam die Temperatur der Umgebung annehmen.

Über die Inaktivierungstemperaturen der Gifte lassen sich keine allgemeinen Grundsätze aufstellen, da die verschiedenen bakteriellen Gifte untereinander sehr variieren; dabei kann gleichzeitig die antigene Wirkung verloren gehen oder auch erhalten bleiben. In der Regel werden Temperaturen um 60° bereits als Inaktivierungs-Temperaturen angesehen, doch gibt es eine ganze Reihe bakterieller, tierischer und pflanzlicher giftiger Antigene, welche ohne Schaden bedeutend höhere Temperaturen, ja sogar Kochhitze vertragen, z. B. die als Endotoxine bezeichneten Produkte des Typhusbazillus, das Dysenterietoxin, manche Hämolysine, das Schlangengift u. a. An dieser Stelle mögen gleich auch die Erfahrungen über die Inaktivierung hämolytischer Sera, die ja ebenfalls zu den Antigenen gerechnet werden müssen, auf Grund der Angaben Morgenrots Erwähnung finden. Während man früher auf Grund der Buchnerschen Untersuchungen die Inaktivierungstemperatur von 55 bis 56° als eine für Alexine charakteristische annahm, ergab sich später, daß auch Komplemente vorkommen, die durch ein $^1/_2$ stündiges Erwärmen auf 55° nicht beeinträchtigt werden, sogenannte thermostabile Komplemente, wie sie Ehrlich und Morgenroth im Serum eines mit Hammelblut immunisierten Bockes und im Serum normaler Ziegen fanden; anderseits gibt es neben thermostabilen Amboceptoren auch solche, die bereits bei 55° vernichtet werden, wie der im Pferdeserum und im Hundeserum (Sachs) vorhandene auf Meerschweinchenblut wirkende Amboceptor. Morgenroth bezeichnet Körper als thermolabil, wenn sie durch Erwärmen auf 55° bis 56° unwirksam werden, thermostabil, wenn sie Temperaturen von 56° und darüber vertragen, aber beim Kochen zerstört werden, und koktostabil, wenn sie gegen Erhitzen auf 100° resistent sind. W. H. Mauwaring, der in jüngster Zeit die Wärmeempfindlichkeit der Komplemente des normalen Ziegenserums studierte, stellte fest, daß zur Zerstörung des Komplementes bei 61° 2 Minuten, bei 59° 4 Minuten, bei

Fig. 5. Größeres Wasserbad mit Rührwerk nach Ostwald.

57° 8 Minuten, bei 55° 12 Minuten, bei 53° 14 Minuten, bei 51° 35 Minuten langes Erhitzen nötig sei. Bei 49° kann eine vollkommene Zerstörung des Komplementes nicht mehr erzielt werden.

Ganz anders als im flüssigen Zustande verhalten sich naturgemäß die Körper, wenn sie fest oder getrocknet verschiedenen, selbst hohen Temperaturen (bis zu 120°—150°), ausgesetzt werden.

Während diese Temperaturen auf Antigene im flüssigen Zustande deletär wirken, bleiben die antigenen Eigenschaften, wie auch viele andere, selbst recht labile — wie dies bereits lange bekannt ist — nahezu intakt, wenn dieselben Körper im festen Zustande den gleichen Temperaturen ausgesetzt werden. Löffler hat dieses Verhalten zur bequemen Sterilisierung verschiedener Antigene benützt, eine Methode, welche für viele Zwecke recht gute Dienste leistet, da sie ein leichtes und sicheres Mittel an die Hand gibt, sterile, leicht dosierbare und haltbare Antigene zu erzielen.

Noguchi hat in jüngster Zeit die Komplemente verschiedener normaler, vollständig getrockneter Sera in bezug auf ihre Toleranz dem Erhitzen gegenüber untersucht und gefunden, daß die Sera vom Hund und Ochsen, nachdem sie bei 20° getrocknet worden waren, bei Temperaturen von 100° C. nicht in ihrer Komplementwirkung geschädigt werden, während dieselbe durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen im flüssigen Zustande glatt aufgehoben wird. Temperaturen von 120°—150° veränderten jedoch die getrockneten Sera derart, daß sie ihre Löslichkeit und damit teilweise oder vollständig auch ihre hämolytische Wirkung einbüßen. Auch die Opsonine verhalten sich im getrockneten Zustande wie die hämolytischen Komplemente; sie scheinen insofern resistenter zu sein, als sie noch nach Einwirkung von Temperaturen von 150° nachweisbar bleiben.

Schließlich sei noch angeführt, daß S. Krüger durch Einwirkung des konstanten elektrischen Stromes bei gewissen Stromstärken und bestimmter Einwirkungsdauer einige Bakterienkulturen ähnlich wie durch Erwärmung derart abschwächen konnte, daß sie sich zu immunisatorischen Zwecken eigneten.

b) Abschwächung durch chemische Einwirkung.

Eine zweite, ebenfalls von Vaillard benutzte Abschwächungsmethode war die, filtrierte Tetanuskulturen mit Jodwasser (1 Teil Jod auf 500 ccm H_2O) abzuschwächen, ein Verfahren, das sich sehr gut bewährt hatte. Jodwasser mit dem gleichen Teile des Kulturfiltrats gemischt, wurde zu der ersten Injektion benutzt. Behring führte die Abschwächung seiner Tetanusbouillon-Kulturen mit Jodtrichlorid durch und verfuhr bei der Immunisierung der Pferde derart, daß er 200 ccm Tetanusbouillon, die 0,5% Karbolsäure als Konservierungsmittel erhielt, als Ausgangsmaterial verwendete. Der Giftwert der Kultur muß so hoch sein, daß 0,75 ccm ein ausgewachsenes Kaninchen mit Sicherheit in 3—4 Tagen töten. Diese Kultur wird in vier Portionen geteilt, indem die erste Portion = 20 ccm ohne Zusatz bleibt, die zweite Portion = 40 ccm einen Zusatz von 0,125%, die dritte Portion = 60 ccm einen solchen von 0,175% und die vierte Portion = 80 ccm einen solchen von 0,25% Jodtrichlorid erhält. Zuerst wurden 10 ccm von Mischung vier subkutan injiziert, nach acht Tagen 20 ccm, nach weiteren acht Tagen wieder 20 ccm und nach drei Tagen der Rest. Allmählich wird dann in geeigneten Intervallen zu den mit geringeren Mengen von Jodtrichlorid versetzten Portionen, schließlich zu reiner Tetanusbouillon übergegangen.

Die Abschwächung des Tetanustoxins im Pariser Institut Pasteur geschieht nach Roux und Martin mittels Lugolscher Lösung (Jodjodkaliumlösung, bestehend aus 1 Teil Jod, 3 Teilen Jodkalium), indem bei Beginn der Immunisierung 0,1 ccm Toxin mit 0,1—0,2 ccm Lugolscher Lösung versetzt werden; erst nach 4—5 reaktionslos vertragenen Injektionen mit dem modifizierten Gift wird reines Toxin injiziert. In ähnlicher Weise geschieht in Paris die Abschwächung des Diphtherietoxins.

Behring und Wernicke schwächten dagegen auch die Diphtherie-Kulturen mit Jodtrichlorid, ähnlich wie beim Tetanus ab. Zum Ausgangsmaterial dienten hierbei mindestens vier Monate alte, durch Papier filtrierte und mit Karbolsäure zu 0,5 % versetzte Diphtherie-Kulturen, welche mit verschiedenen Jodtrichloridmengen (0,05—0,4 %) zwei Tage bis vier Wochen in Kontakt gelassen worden waren: durch allmählich steigende Mengen des Giftes gelang es auf diese Weise bei Meerschweinchen und Hammeln die Immunisierung durchzuführen. Die Dosis des mit Jodtrichlorid behandelten Diphtherietoxins wird dabei jedesmal gerade so groß gewählt, daß sie eine deutliche lokale und allgemeine Reaktion auslöst. Bei Kaninchen hat sich dieses Verfahren nicht bewährt und da gelang die Immunisierung durch Verimpfung des getrockneten, gepulverten und eine Stunde auf 77° erhitzten Kalkniederschlages aus giftigen keimfreien Kulturen, der nach Roux und Yersin durch Zusatz von Calciumchloridlösung aus letzteren gewonnen wurde. Eine ganz kleine Menge dieses Diphtheriekalkpulvers in eine Hauttasche verimpft, erzeugte ausgedehnte phlegmonöse Entzündung, nach deren Abheilung erneuerte Impfungen nur noch geringe, immer mehr abnehmende Reaktionen hervorriefen.

Eine Abschwächung des Tetanustoxins konnten Ehrlich und und Bennario durch Behandlung desselben mit Schwefelkohlenstoff erreichen. Es tritt dabei nach Ehrlich eine so gut wie vollkommene Entgiftung der Bouillon ein, derart, daß man Mäusen 0,5—1,0 ccm des modifizierten Giftes ohne großen Schaden zuführen kann. Die so behandelten Mäuse gewinnen schon nach acht Tagen eine Grundimmunität gegen Tetanustoxin. Nach E. Salkowski üben auch Salizylaldehyd und Chloroform mit Diphtherietoxin bei Körpertemperatur digeriert eine abschwächende, als chemisch aufgefaßte Wirkung aus; ebenso beeinflussen Karbolsäure und Formalin das Diphtheriegift. Aronson versuchte die Abschwächung der Diphtheriekulturen derart zu erreichen, daß er auf den Boden der Serumröhrchen verschieden konzentrierte Formaldehydlösungen brachte, dann auf das Serum gleichmäßig Diphtheriebouillon aussäte und die mit Gummikappen verschlossenen Röhrchen in den Brutschrank einstellte. Die unter dem Einflusse der Formaldehyddämpfe sich entwickelnden Kulturen zeigen eine Virulenz-Verminderung von verschiedenen Abstufungen.

Nicht unerwähnt mag noch die wohl nur historisches Interesse beanspruchende Abschwächungsmethode bleiben, welche Brieger, Kitasato und Wassermann auf Grund theoretischer Überlegung für verschiedene Bakterien (Tetanus, Diphtherie, Typhus und einige andere) anwandten, und die einer bereits von Wooldridge für Milzbrandimmunisierung vorgeschlagenen, jedoch nicht bewährten, analog war. Ein Extrakt aus der zerkleinerten Thymus wurde durch 12stündiges Stehen mit H_2O im Eisschrank gewonnen, dann mit Soda schwach alkalisch gemacht und 15 Minuten im Dampfkochtopfe erhitzt. In dieser sterilisierten „Thymusbouillon“

wurden nun die verschiedenen Infektionserreger kultiviert; dabei ergab sich, daß diese Extrakte die Fähigkeit besitzen, die Giftigkeit bestimmter Arten außerordentlich herabzusetzen. Eine Thymustetanusbouillon zeigte nur $^1/_{5000}$—$^1/_{3000}$ der gewöhnlichen Giftigkeit einer analogen Fleischpeptonbouillon, in welcher Tetanusbazillen gewachsen waren. Es handelte sich nach den Autoren keineswegs um mangelnde Giftbildung, sondern darum, daß gewisse Stoffe des Thymusauszuges die Fähigkeit besitzen, die bereits gebildeten Gifte, selbst beim einwöchentlichen Stehen im Eisschrank zu vernichten. Mit derartigen Gemischen konnte immunisiert werden.

Praktisch von größerer Bedeutung für die Immunisierungstechnik als die zuletzt erwähnten chemischen und physikalischen Methoden, ist die mittels Antitoxin herbeigeführte, also biologisch-chemische Abschwächungsmethode, wie sie durch Mischung des Giftes mit Antitoxin zuerst von Babes und durch präventive, der Toxininjektion um 12—18 Stunden vorausgehende Antitoxininjektion von Kretz ausgeführt wurde. Die letztere im Wiener staatlichen Seruminstitute seit Jahren im Großen angewandte Methode liefert die befriedigendsten Resultate.

III. Antigene aus Bakterien ohne bisher bekannte echte Toxine.

Die durch Toxine erzeugte Immunität ist, wie wir aus zahlreichen Untersuchungen wissen, zu trennen von der mit Bakterien erzielten Immunität; es kann nach Metschnikoff eine künstlich erworbene Immunität gegen lebende Infektionserreger trotz der Empfindlichkeit für Toxine bestehen, oder wie Wassermann präzisiert, die mit lebenden Bakterien vorbehandelten Tiere sind nur gegen die Bakterien, aber nicht gegen das Gift, die mit Gift vorbehandelten Tiere mit ihrem Giftschutz gleichzeitig auch gegen die Bakterien gefestigt. Es ist natürlich, daß man mit allen Mitteln bestrebt war, die hierher gehörigen zahlreichen pathogenen Bakterienarten zum Teil als solche in wirksame Antigene umzugestalten, zum Teil aus ihnen spezifisch giftige, zur Immunisierung verwendbare Stoffe zu gewinnen. Zumeist handelt es sich dabei um die Erzielung einer aktiven und zwar keiner antitoxischen Immunität. Der einfachste Weg, derartige Antigene herzustellen, war der, diese Bakterien als solche oder irgendwie in ihrer Giftwirkung abgeschwächt, dem Organismus einzuverleiben. Bekanntlich ist diese Methode die älteste und historisch denkwürdigste, da von hier aus Pasteur die Lehre von der Immunität begründete. Man nennt seit Jenner und Pasteur derartige lebende Infektionsstoffe, die in ihrer Giftwirkung abgeschwächt sind, Vaccins, und ihre Darstellung erfolgt zum Teil mit rein bakteriologischen Methoden, zum Teil jedoch auf Grund von Einwirkung physikalischer und chemischer Einflüsse, so daß einige Prinzipien ihrer Darstellung hier eine kurze Berührung finden sollen.

a) Darstellung von Vaccins.

Das älteste von Pasteur im Jahre 1880 dargestellte Vaccin war jenes gegen den Hühnercholerabazillus und wurde derart gewonnen, daß Bouillonkulturen dieses Bazillus unter Wattepfropf bei Luftzutritt im Dunkeln 3, 4, 5, 6—10 Monate stehen blieben und so in ihrer Virulenz

bedeutend abgeschwächt wurden. Da die unter Luftabschluß 10 Monate aufbewahrten Stämme ihre Virulenz beibehalten hatten, glaubte Pasteur, daß die Sauerstoffeinwirkung die Ursache der Virulenzabschwächung sei, ein Schluß, der sich in der Folge als völlig richtig erwies. Diese so ohne jeden weiteren Eingriff nur durch Einwirkung des Sauerstoffes der Luft beim Stehen abgeschwächten Kulturen stellen den Pasteurschen Impfstoff dar.

Das weitere ebenfalls von Pasteur, Roux und Chamberland hergestellte Vaccin ist das gegen Milzbrand und Rauschbrandkulturen. Die Abschwächung des Milzbrandes geschieht derart, daß virulente Anthraxbazillen bei 42° gezüchtet werden, bei welcher Temperatur sie sich wohl entwickeln, aber ihre Virulenz verlieren und keine Sporen bilden. Wenn man nach mehreren Tagen die so abgeschwächten Bazillen auf einen neuen Nährboden bei 35° überimpft, dann liefern sie zwar wieder Sporen, doch bleibt die Virulenz dauernd abgeschwächt. Auf diese Weise wurden zwei Vaccins dargestellt, von denen das erste, „premier vaccin", eine Kultur repräsentiert, welche 15—20 Tage bei 42° gehalten wurde und nur noch mit Sicherheit weiße Mäuse, dagegen nicht mehr regelmäßig Meerschweinchen tötete, während das zweite Vaccin „deuxième vaccin" nur 10—12 Tage bei 42° geblieben war und wohl Meerschweinchen, nicht mehr aber Kaninchen tötete. Die Anwendung geschieht derart, daß man die Tiere zunächst mit Vaccin I und nach Schwinden der dadurch gesetzten Krankheitserscheinungen mit Vaccin II impft.

Die Pasteursche Methode der Vaccinebereitung bei Milzbrand wurde vielfach modifiziert und dabei manchmal die Kombination mehrerer Abschwächungsagentien angewandt. So verwendete Chauveau als Vaccin eine durch Züchtung bei 38—39° unter gleichzeitigem Druck von acht Atmosphären abgeschwächte Milzbrandkultur, Cienkowski läßt noch die Vaccins I und II durch den Körper Murmeltieren passieren und Deutsch bereitet eine Sporenvaccine in der Weise, daß er alte Agarkulturen in einer Salz-Glycerin-Wassermischung aufschwemmt.

Nach diesem Muster der Vaccindarstellung wurden später aus zahlreichen Bakterien Vaccins dargestellt; so z. B. schließt sich das Haffkinesche Verfahren der Darstellung der Cholera-Vaccine eng an dieses Pasteursche an. Auch Haffkine stellte aus Cholerakulturen zwei Vaccins dar; das eine, schwächere Vaccin (weak virus) bestand aus Kulturen, welche durch Züchtung bei 39° C und durch Fortzüchtung auf künstlichen Nährböden in ihrer Virulenz abgeschwächt wurden, während das zweite, stärkere Vaccin (virus fixe) Kulturen darstellten, deren Virulenz durch eine große Reihe von Tierpassagen gesteigert worden war. Die erste Impfung wurde mit dem abgeschwächten, die zweite mit dem virulenten Virus ausgeführt. In gleicher Weise haben Kolle und Otto durch langdauernde Züchtung bei 40—41° C virulente Pestkulturen abgeschwächt und so ein im Tierversuch äußerst wirksames Vaccin erhalten, das sogar den mit abgetöteten Kulturen hergestellten Antigenen weit überlegen war; die in Manila von Kolle und Strong bei der Anwendung am Menschen gesammelten Erfahrungen ergaben die volle Unschädlichkeit und gute Brauchbarkeit des Verfahrens.

Weitere biologisch interessante hierher gehörige Abschwächungsmethoden sind die gleichzeitige Züchtung mit anderen Bakterien und die nach Metschnikoff durchgeführte Züchtung im Serum immunisierter Tiere.

Ein drittes Prinzip, das bereits in JENNERS Abschwächung des Variola virus, wie sie in der Verwendung der Kuhpocke gegen die Variola des Menschen sich manifestierte, ein klassisches Vorbild hatte, hat PASTEUR beim Schweinerotlaufbazillus zum erstenmal in zielbewußter Weise in Anwendung gebracht, indem er das Rotlaufvirus einerseits durch Kaninchenpassage (schwächeres Vaccin I) und anderseits durch Taubenpassage (stärkeres Vaccin II) für Schweine abschwächte. Dieses Prinzip der Abschwächung der Virulenz durch Tierpassage hat in den verschiedensten Modifikationen in der Folge die mannigfachste Verwertung erfahren.

Eine ähnliche Methode wurde in neuerer Zeit bei der Tuberkulose in den interessanten Versuchen von FRIEDMANN und MOELLER zur Ausführung gebracht durch Benützung von für den Menschen unschädlichen Kaltblüter-Tuberkelbazillen (Schildkröten- und Blindschleichentuberkulose) als Antigen gegen menschliche Tuberkulose.

Eine vierte, auf chemischem Prinzip beruhende Abschwächung stellt die Herstellung des Impfmarkes bei der Lyssa dar und beruht auf der Beobachtung PASTEURS, daß die Virulenz des Markes durch Austrocknung abgeschwächt werde. Wenn auch durch HÖGYES gezeigt wurde, daß eine eigentliche Abschwächung des Virus wohl nicht eintritt, sondern nur eine Verminderung der unbekannten Wuterreger, indem HÖGYES durch eine einfache Verdünnung der Aufschwemmung des vollvirulenten Wutgehirnes denselben Effekt (abgestufte Inkubationszeit) erzielen konnte wie PASTEUR, so blieb doch der PASTEURschen einfachen Methode die nahezu allgemeine praktische Anwendung gewahrt. Das Trocknen des Markes geschieht derart, daß das Mark in einem Exsikkator aus braunem Glas, welcher mit Ätzkali beschickt ist, auf einem Seidenfaden aufgehängt wird und hier 1—14 Tage, je nachdem die Virulenz vermindert werden soll, getrocknet wird; das Ganze wird an einem dunklen, bei ca. 22° gehaltenem Orte steril aufbewahrt. (Siehe Abbildg. bei KRAUS im Abschnitt Lyssa dieses Handbuch.) Nach VANSTEENBERGHE verliert das Wutgift beim Trocknen an der Luft seine Wirksamkeit oder wird abgeschwächt; wenn man das Trocknen des Markes in dünnen Schichten möglichst rasch im Schwefelsäure-Vakuum unter Lichtausschluß vornimmt, so kann man es im wirksamen Zustand konservieren.

Eine weitere hierher gehörige Abschwächungsmethode ist jene von TIZZONI und CENTANNI, BABES und TALASESCU durch Verdauung des Lyssavirus mit natürlichem und künstlichem Magensaft, Methoden, welche ebenfalls praktisch angewendet werden.

Ein höchst merkwürdiges durch die Anwesenheit von einem anderen Gewebssafte entstehendes Antigen ist nach den Untersuchungen von KOCH und seinen Mitarbeitern KOHLSTOCK, KOLLE und TURNER die Galle Rinderpestkranker resp. an Rinderpest gefallener Tiere, welche eine äußerst starke immunisierende Wirkung entfaltet. Eine Impfung von 10 ccm subkutan genügt bereits, um Rinder gegen eine sicher tödliche Dosis zu schützen. Nach KOLLE handelt es sich nicht etwa um eine Abschwächung des Rinderpestcontagiums, da dasselbe in der Galle seine volle Virulenz beibehalten hatte, sondern um die Wirkung von noch unbekannten Stoffen, welche die allgemeine Ausbreitung des Infektionserregers innerhalb des Tierkörpers hindern. Zusatz normaler Galle zu virulentem Rinderpestblute hat keine Wirkung. Nach E. S. FRANTZIUS ist auch Galle, welche von mit Virus fixe passierten Kaninchen stammt, fähig, mit Virus fixe gemischt, die Giftwirkung des letzteren auf-

zuheben, während normale Galle verschiedener Tiere keine derartige Fähigkeit besaß.

Ein etwas von den bisher angeführten verschiedenes Prinzip der Vaccinebereitung, das der vielfach versuchten Anwendung des Rekonvaleszentenserums nahe steht, kommt bei der Schutzimpfung gegen Texasfieber (Hämoglobinurie-Seuche der Rinder), einer durch ein Protozoon, das Pyrosoma bigeminum, hervorgerufenen Krankheit zur Verwendung, indem das Blut von Tieren entnommen wird, welche vor mehreren Wochen einen Anfall der Krankheit überstanden haben, so daß das Blut nur spärliche Pyrosomen enthält.

Von weiteren chemisch wirkenden Agentien wäre noch der Einfluß des Glyzerins zu erwähnen, welches ebenfalls vielfach als Abschwächungsmittel der Virulenz benützt wurde. So verwendeten es Rodet und Galavielle, um das Rabiesvirus abzuschwächen. E. J. Martin gibt an, daß das Gehirn an Tollwut gestorbener Kaninchen bei 35° und einmonatlichem Liegen in Glyzerin etwas von seiner Giftigkeit verliert, aber erst bei einjährigem Liegen in Glyzerin diese völlig einbüßt. Bei 42° in Glyzerin aufbewahrt, verschwindet die Virulenz in einigen Stunden; mit solchen Gehirnen ist trotzdem noch eine Immunisierung gegen Tollwut möglich. E. Levy benützte Glyzerin, um die Virulenz der Tuberkelbazillen, die verschiedene lange Zeit (zwei bis fünf Tage) in 80%igem, sterilem Glyzerin bei 37° gelegen waren, behufs Vorbehandlung herabzusetzen.

Über den Einfluß der abschwächenden Wirkung der Röntgenstrahlen auf das Gift der Tollwut (Verlängerung der Inkubationszeit), weiß Frantzius zu berichten, während der von Tizzoni und Bongiovanni behauptete Einfluß der Radiumstrahlen auf das gleiche Virus den Widerspruch mehreren Autoren erfuhr.

Die allgemeine Verwendung von physikalischen Mitteln, wie direktem Sonnenlicht, anderen Strahlenarten, fluoreszierenden Agentien, Farbstoffen, sowie von Elektrizität zur Abschwächung von Kulturen und zur Herstellung von Vaccins ist infolge der Unmöglichkeit, die Einwirkung scharf abzugrenzen, vorläufig nicht bequem durchführbar.

b) Darstellung von Impfstoffen aus abgetöteten Kulturen.

Seitdem durch die ersten Arbeiten Pasteurs über Hühnercholera erwiesen wurde, daß zur Erzeugung einer Immunität nicht die Intaktheit des Bakteriums nötig ist, sondern daß es sich höchstwahrscheinlich um chemisch wirksame, von den Bakterien trennbare Stoffe handeln dürfte, waren es insbesondere deutsche Forscher, vor allem Koch und seine Schüler Pfeiffer, Brieger und Wassermann, welche zeigten, daß auch nach Abtötung der Bakterien, insbesondere der Cholera-, Typhus- und Pestbakterien, spezifische Gifte bei Einverleibung der toten Bakterienzellen im Organismus auftreten.

Es ist jedoch vorläufig nicht sichergestellt, ob diese giftigen Substanzen Eiweißbestandteile des Bakterienleibes sind, welche erst im Organismus durch uns unbekannte chemische Prozesse frei werden, oder ob dieselben den Zellbestandteilen nur locker anhaften und mit den in den verschiedenen Extrakten nachweisbaren, zumeist recht schwachen Giften identisch sind; ebenso ist uns auch ihre chemische Natur vollkommen dunkel.

Die Abtötung der Kulturen erfolgt auch hier auf zweierlei Weise, einmal durch Erhitzen der in den flüssigen Nährmedien (Blut, Bouil-

lon usw.) befindlichen oder von den festen Nährböden abgespülten Kulturen, das anderemal durch Zusatz verschiedener chemischen Agentien zu den keimhaltigen Nährsubstraten.

Die ersten, welche im unmittelbaren Anschluß an die vorher erwähnten PASTEURschen Untersuchungen und bei Nachprüfung der von TOUSSAINT versuchten Methode, ein 10 Minuten auf 55° erhitztes Blut von Milzbrandtieren als Impfstoff zu benutzen — ein Verfahren, das keine Abtötung der im Blute befindlichen Bakterien und Sporen herbeizuführen imstande war, wie dies TOUSSAINT annahm — mit abgetöteten Milzbrandbakterien systematische Immunisierungsversuche anstellten, waren CHAUVEAU, ROUX und CHAMBERLAND. CHAUVEAU immunisierte als erster Tiere mit auf 80° erhitzten Milzbrandkulturen, und die beiden anderen französischen Forscher verwendeten in ihren erfolgreichen Versuchen als Milzbrandantigen Blut aus Milz und Herz eines an Milzbrand gestorbenen Hammels, das in Röhrchen eingeschmolzen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen je eine Stunde auf 58° erhitzt wurde und sich steril erwies. Eine solche fraktionierte Sterilisierung behufs Antigendarstellung wurde auch in der Folge bei verschiedenen Bakterien verschiedentlich versucht, so z. B. bei Tuberkelbazillen, aus denen HERICOURT und RICHET durch mehrmaliges Erhitzen auf 80° ein Antigen erzeugten, während DAREMBERG mit sterilisierten Kulturen von Hühnertuberkulose zu immunisieren versuchte. Indeß war es gerade der Umstand, daß abgetötete Tuberkelbazillen so schlecht resorbiert werden, welcher KOCH bewogen hatte, diese einfachste Methode der Antigendarstellung sehr bald zu verlassen. Daß aber tote Tuberkelbazillen spezifische Giftwirkungen in exquisiter Weise entfalten können, zeigen zahlreiche noch später zu besprechende Untersuchungen u. a. jene von PRUDDEN und HODENPYL, welche durch mehrstündiges Kochen abgetötete Tuberkelbazillen in den Kreislauf von Kaninchen gebracht hatten und das Auftreten von Tuberkelknötchen in der Lunge und in der Leber beobachten konnten, ferner die von A. MASURA, welcher gewaschene und fünf Minuten bei 115° sterilisierte Tuberkelbazillen Kaninchen intravenös injizierte und dieselben Veränderungen fand, wie nach Injektionen von lebenden Bazillen, und von KROMPECHER, der mit auf 120° abgetöteten Tuberkelbazillen ebenso makroskopisch erkennbare verkäsende Tuberkel hervorrufen konnte, wie mit virulenten, nicht abgetöteten Kulturen, ein neuerliches Beispiel für die hohe Widerstandsfähigkeit vieler hier in Frage kommenden Gifte.

Haben diese eben angeführten Antigene ein mehr theoretisches Interesse, so müssen die jetzt anzuführenden eine größere praktische Bedeutung in Anspruch nehmen; es sind dies insbesondere die aus Cholera-, Typhus- und Pestbakterien durch Erhitzen erzeugten Produkte.

Bereits GAMALEIA konnte als erster aus Cholerabouillonkulturen, welche durch Passage an Tauben virulent geworden waren, durch Erhitzen während 20 Minuten auf 120° ein Antigen darstellen, das allerdings recht schwach wirksam war, da ca. 4 ccm davon ein Meerschweinchen binnen 20—24 Stunden und erst 12 ccm eine Taube töteten. Doch liegen nach GAMALEIA die Vorteile dieser „chemischen Vaccination“ in der leichten Dosierbarkeit und völligen Gefahrlosigkeit. Die Anwendung der hohen Temperaturen behufs Abtötung wurde von späteren Autoren verlassen und BRIEGER und WASSERMANN konnten schon 1892 zeigen, ähnlich wie KLEMPERER, daß ein Erwärmen von 24stündigen Cholerabouillonkulturen durch eine Viertelstunde auf 65° genügt, um ein Antigen

zu erzeugen, das in einer Dosis von 2 ccm eingespritzt, nach 48 Stunden schon einen Schutz von zweimonatlicher Dauer gewährt. Fedoroffs Impfstoff gegen Cholera wurde mit dem eben genannten identisch dargestellt, nur wurde als Ausgangsmaterial der Niederschlag von ungefähr sieben Tage lang bei 35° gehaltenen Kulturen der Thymusbouillon verwendet, der nach dem Erhitzen mit Glyzerin konserviert wurde.

Der neueste, auf Grund der Arbeiten von Pfeiffer, Kolle und Marx von Kolle erfolgreich in die Praxis eingeführte Choleraimpfstoff wird derart bereitet, daß Cholera-Agarkulturen — es genügt eine Agarkulturmasse von 2 mg — in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt bei 58° eine Stunde lang abgetötet werden. Die einmalige Injektion erzeugt beim Menschen eine Immunität, die nach fünf Tagen im Blute nachweisbar ist, nach 20 Tagen auf dem Höhepunkt steht und nach einem Jahre noch in der bakteriziden Kraft des Serums, freilich in abgeschwächtem Maße, erkennbar ist. Ein Zusatz von 0,5% Phenol konserviert nach Pfeiffer und Marx ohne Schädigung der immunisierenden Wirkung den Impfstoff, selbst wenn er 4—10 Wochen bei 37° gehalten wird.

Des methodischen Interesses wegen möge hier noch auf die Versuche von Ssawtschenko und Sabolotny verwiesen werden, welche eine Antigenwirkung in der Weise erzielen wollten, daß sie abgetötete und karbolisierte Choleraagarkulturen in den Magen einführten.

Im wesentlichen die gleichen Methoden, wie sie soeben bei der Darstellung der Choleraantigene geschildert worden sind, wurden auch zur Herstellung verschiedener mehr oder minder wirksamen Typhusantigene benützt. Es sei hier nur auf die Arbeiten von Eug. Fränkel (Behandlung Typhuskranker mit bei 63° sterilisierter Thymustyphusbouillon), von Sanarelli (Injektion alter Bouillonkulturen, die bei 120° sterilisiert wurden), von Beumer und Peiper (Immunisierung von Hammeln mit den auf 55—60° erhitzten Bouillonkulturen) u. a. hingewiesen. Praktisch die besten Erfolge und die breiteste theoretische Basis weisen die von Pfeiffer und Kolle hergestellten und die unabhängig von diesen von Wright und seinen Mitarbeitern an großem Materiale erprobten Typhusantigene auf.

Pfeiffer und Kolle haben, angeregt durch die Erfolge der Haffkineschen Choleravaccine in Indien, ihr Typhusantigen folgendermaßen präpariert: Eine gutgewachsene Schrägkultur eines hochvirulenten Typhusstammes wird in 10 ccm 0,85%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und und diese Aufschwemmung für ein bis zwei Stunden auf 54—58° erhitzt oder durch Zusatz von Chloroform abgetötet. Die Abtötung wird durch Verimpfen einiger Tropfen der Aufschwemmung in Bouillon kontrolliert und nach so erwiesener Sterilität mit Karbolsäure zu 0,5% versetzt; 1 ccm dieses Impfstoffes = 2 mg Typhuskultur erzeugt bereits am 11. Tage nach der Verimpfung im Serum der Versuchsperson eine Bakterizidie von 0,075—0,01 gegen 0,3—0,5 vor der Impfung, und einen Agglutinationswert von 1:500—1:600 gegen einen von 1:10 vor der Impfung. Eine längere Zeit anhaltende Immunität wird jedoch nach Kolle nur durch zwei- bis dreimalige Injektion von ein bis drei Ösen 24 stündiger, in NaCl-Lösung suspendierter, eine Stunde auf 60° erhitzter und mit 0,3% Phenol versetzter Kulturen erreicht.

Wright und Semple stellten ihren Impfstoff durch fünf Minuten dauerndes Erhitzen auf 60° her und bedienten sich als Ausgangsmaterial Agarkulturen, welche sich nach 24 stündigem Wachstum bei Körpertemperatur entwickelt hatten; dieselben wurden in steriler Bouillon ver-

teilt und in sterilen, kalibrierten Glasröhrchen eingeschlossen und nach Zuschmelzen sterilisiert. In gleicher Weise wurden auch mit Maltafieber an Affen erfolgreiche Immunisierungsversuche vorgenommen. WRIGHT und LEISHMAN gehen neuerdings von vier Wochen alten auf 1% Peptonbouillon sich entwickelnden Kulturen aus, welche bei 60° sterilisiert und mit 1% Lysol versetzt werden; die angewandte Dose beträgt 0,5—0,75 ccm, nämlich die für 100 g Meerschweinchen tödliche Minimaldosis. Ein anderer Teil des Materials waren jedoch auch hier 24stündige, bei 37° auf Nähragar gewachsene Kulturen, welche bei 60° abgetötet worden waren.

Erwähnt sei noch das von PETRUSCHKY ausgegebene Präparat „Typhoïn", das im wesentlichen abgetötete Typhuskulturen (1 ccm Typhoïn = 100 Millionen Typhuskeime) enthält und als therapeutisches Mittel an drei aufeinanderfolgenden Tagen Typhuskranken eingespritzt werden soll. Die Konservierung erfolgt durch Karbolzusatz.

Eine eigenartige Methode der Abtötung der Typhusbazillen verwenden E. LEVY und FR. BLUMENTHAL, indem sie mit 50%igem Traubenzucker und 25%igen Galaktoselösungen die Bakterien bei 37° abtöten. Die Abtötung verschiedener Bakterien bedarf einer verschiedenen Zeit; die nötige Dauer der Einwirkung schwankt bei der Galaktose von ein bis zwei Stunden bei dem Vibrio Cholerae, bis zu vier bis fünf Tagen beim Tuberkelbazillus. Der Typhus bedarf 48 bis 72 Stunden zu seiner Vernichtung. Dieses Verfahren soll die mit der Abtötung durch Erhitzung oder durch andere chemische Agentien einhergehende tiefgehende Veränderung der Leibessubstanzen und damit verknüpfte Beeinträchtigung der Antigene vermeiden und hat den Vorteil, daß dieses Antigen als Bakterienzuckerpulver leicht konserviert und gelöst werden kann. Die Darstellung erfolgt derart, daß 48stündige Agarkulturen in der Zuckerlösung verteilt werden; um eine dauernd gleichmäßige Durchtränkung herbeizuführen werden mit diesen Suspensionen Röhrchen, beschickt, zugeschmolzen, im Schüttelapparate bei 37° geschüttelt und hierauf im Vakuum zur Trockene eingedampft. Eine einmalige subkutane Injektion von 1—4 mg des Bakterienpulvers (auf feuchte Bakteriensubstanz berechnet) war imstande, Meerschweinchen gegen die vielfach letale intraperitonale Dosis zu immunisieren, und subkutane Einverleibung von 2 mg Pulver schützte ca. 2 kg schwere Kaninchen gegen intraperitoneale tödliche Infektion.

Die durch Abtötung erzeugten Antigene haben endlich bei der prophylaktischen Behandlung der Pest eine große praktische Bedeutung erlangt. Da bei der Abtötung des Pestbazillus durch Siedehitze, sowie durch Chloroform und selbst 0,5%ige Karbolsäure die in den Bakterien befindlichen immunisierenden Stoffe vernichtet werden, bleibt bei der Bereitung wirksamer Antigene nur die Anwendung mittlerer Temperaturen, welche bereits unsichere Abtötung herbeiführen, übrig. Die hier in Betracht kommenden Präparate sind vor allem die nach dem Haffkineschen Verfahren und nach den Angaben der deutschen Pestkommission hergestellten Impfstoffe. Die Darstellung nach HAFFKINE geschieht derart, daß große, mehrere Liter fassende Bouillonkolben, deren Oberfläche mit einem Fett (steriles Butterfett oder Olivenöl) bedeckt ist, mit Pest geimpft und durch ca. sechs Wochen bei 25—30° C im Brutschrank gehalten werden, wobei durch alle zwei bis drei Tage vorgenommenes Schütteln der Kultur das üppige Oberflächenwachstum gefördert werden soll. Dieses Ausgangsmaterial wird nach beendigtem Wachstum zunächst

auf Reinheit geprüft, hierauf eine Stunde lang im Wasserbade auf 65° erhitzt und nunmehr die Sterilität der Kultur durch Überimpfen festgestellt. Der so fertiggestellte Impfstoff wird behufs Konservierung auf 0,5 % Gehalt Karbolsäure gebracht und in 30 ccm fassende Fläschchen verfüllt, die wegen der Sedimentierung der Bakterien vor dem Gebrauche geschüttelt werden müssen. Der Schutzwert wird aus dem Vergleich der Trübung mit einer Pestkultur eingeschätzt. Die normale für subkutane Injektion eines erwachsenen Menschen bestimmte Impfdosis beträgt ca. 3—3,5 ccm.

Die Nachteile des Haffkineschen Impfstoffes, welche in der schlechten Dosierbarkeit und der Möglichkeit leichter Verunreinigung mit Anaeroben (Tetanus, malignes Ödem), nicht zuletzt in der Verwendung alter, in ihrer Antigenwirkung abgeschwächter Bouillonkulturen liegen, hat die Deutsche unter Führung Pfeiffers arbeitende Pestkommission durch Verwendung von Agarkulturen als Ausgangsmaterial des Impfstoffes zu umgehen gesucht. Die Gewinnung desselben findet nach Kolle derart statt, daß in weiten, eine möglichst große Oberfläche darbietenden Agarröhrchen die Pestbazillen zwei Tage lang gezüchtet werden und hierauf in Bouillon oder in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt 1 bis 2 Stunden auf 65° erhitzt werden, eventuell unter Zuhilfenahme eines Schüttelapparates, da sich konzentrierte Bakterienaufschwemmungen nicht immer ohne Schütteln bei 65° sicher sterilisieren lassen. Die Konservierung geschieht auch hier durch Zusatz von Karbolsäure zu 0,5 %, welcher, im Gegensatze zu der virulenten, die abgetötete Kultur in ihrer immunisatorischen Kraft nicht schädigt. Eine Impfdose entspricht einem Agarröhrchen und ca. 80—100 ccm des Haffkineschen Impfstoffes.

Von diesen Impfstoffen wurden einige Modifikationen ausgeführt; einmal wurde der durch Abtötung der Agarkulturen (dreitägige Kulturen in NaCl-Lg. aufgeschwemmt, 1/2 Stunde auf 60° erhitzt und karbolisiert) erhaltene Impfstoff der besseren Resorbierbarkeit wegen mit der gleichen Menge Pestserums gemischt — Verfahren von Shiga — oder es wurden die durch eine Stunde auf 60° im Wasserbade abgetöteten Kochsalzaufschwemmungen der 48stündigen Gelatinekulturen mit einem gut agglutinierenden Pestserum durch 12 Stunden behandelt, um nach dem Vorgange von Ehrlich und Morgenroth nach Bindung der spezifischen Rezeptoren die schädlich wirkenden übrigen Serumbestandteile durch vorsichtiges Auswaschen zu entfernen — Verfahren nach Besredka. In gleicher Weise wurde auch von Besredka ein Typhus- und Choleraimpfstoff hergestellt, nur mit dem Unterschiede, daß die Agglutination vor dem Erwärmen stattfand und erst die agglutinierten, sorgfältig vom Serum gereinigten Bakterien eine Stunde auf 56° erhitzt wurden. Die Darstellung der Pestvaccine nach Gosio ist ganz analog jener von Besredka; die Sterilitätprüfung erfolgt dabei derart, daß zu der als Nährboden verwendeten Bouillon Kalium tellurosum zugefügt wird, welches die lebenden Pestkeime, zumal bei Zusatz von Saccharose, unter Bildung schwarzer Wölkchen zersetzen. Endlich wäre zu erwähnen, daß Terni und Bandi als Ausgangsmaterial ihrer Pestlymphe peritoneales Exsudat von Meerschweinchen oder Kaninchen verwenden, welche mit virulenter, in Löfflerscher Bouillon gezüchteter Pestkultur intraperitoneal infiziert worden waren; das Exsudat wird kurz ante mortem oder post mortem entnommen, auf Reinheit kontrolliert, 12 Stunden lang im Brutschrank wachsen gelassen und 2 Tage nacheinander durch je 2 Stunden auf 50—52° erhitzt; zur Konservierung und Unterstützung der Resorption

wird mit einer wässerigen Lösung von 0,25 % Na_2CO_3, 0,5 % Karbolsäure und 0,75 % NaCl verdünnt. Die Impfdosis für den erwachsenen Menschen beträgt 2,5 ccm, für Kinder 1—1,5 ccm.

Vor einiger Zeit hatte in interessanten Versuchen GABRITSCHEWSKY Streptokokken, von Scharlachfällen des Menschen und der Druse des Pferdes stammend, zu einer Vaccinedarstellung in folgender Weise verwendet:

Eine konzentrierte Bouillonkultur von aus Scharlachfällen gezüchteten Streptokokken wird durch Erhitzen bis auf 60° abgetötet und durch Zusatz von 0,5 % Phenol sterilisiert; diese Kultur wird nun zentrifugiert und die Bakterienmasse derart verteilt, daß in jedem Kubikzentimeter der „Vaccine" 0,02—0,03 ccm des Bakteriensatzes enthalten sind, wobei 0,12 ccm dieses Satzes einem Trockengewicht von 0,005 g entsprechen. Vor der Verwendung wird diese „Vaccine" auf ihre Sterilität geprüft und derart benützt, daß nach Durschschütteln behufs guter Verteilung der Masse das Präparat in das Unterhautzellgewebe des Unterleibes oder des Rückens eingespritzt wird; und zwar werden zum erstenmal 0,5 ccm (für Kinder von 2—10 Jahren) injiziert und im weiteren Verlaufe von 7—10 Tagen noch zweimal Dosen, welche 1½—2mal größer sind, als die vorhergehende Dosis, jedoch stets entsprechend der erhaltenen Reaktion unter möglichster Vermeidung einer Temperatur über 39°. Die Dosis für Kinder unter zwei Jahren ist zweimal geringer, diejenige für Erwachsene zweimal größer.

Das Drusenstreptokokkenvaccin wurde in ähnlicher Weise dargestellt, indem die in der mit Zucker und mit Pferdeserum versetzten Peptonbouillon nach 48 Stunden üppig gewachsenen Streptokokken durch Zusatz von 0,5 % Phenol abgetötet und in auf 0,01 ccm graduierten Röhrchen zentrifugiert worden waren. Das auf seine Sterilität vorher geprüfte, so dargestellte Vaccin wird derart dosiert, daß in jedem Kubikzentimeter 0,1 ccm der zentrifugierten Streptokokkenmasse oder 0,02 g derselben an Trockengewicht enthalten ist. Durch Erhitzen auf 50—60° bleiben einzelne Streptokokken lebensfähig, so daß die Darstellung des Impfstoffes durch Hitze allein nicht zu empfehlen ist. Über die praktische Umwendung des Streptokokkenimpfstoffes bei Scharlach hat ZLATOGOROFF vor kurzem günstige Erfahrungen gesammelt.

Die Impfung mit in verschiedener Weise abgetöteten Bakterien wurde in größerem Maßstabe endlich bei der Pneumonie versucht, sei es, daß die Abtötung durch mehrstündiges Erhitzen 24 Stunden alter Bouillonkulturen auf 60° erfolgte, oder durch 2—3 Tage auf 41—42° (G. u. F. KLEMPERER) oder durch Zusatz von Chloroform und Karbolsäure. Ein sowohl bei subkutaner als auch intravenöser Injektion wirkendes Antigen hat BUNZL-FEDERN dargestellt, indem er Blutserum von an Pneumokokken-Septikämie erkrankten Kaninchen auf 58° erhitzte. Indeß sind die Angaben über die mit den verschiedenen Pneumokokkenantigenen erzielten Resultate recht schwankende. (Siehe auch EMMERICH und FOA.)

Überblicken wir die soeben aus den Bakterienleibern durch Erhitzen erzeugten Antigene, so sind es zumeist solche, welche im Körper zur Bildung von bakteriziden Stoffen führen, dagegen keine oder nicht nennenswerte antitoxische Eigenschaften dem Serum verleihen, eine Tatsache, die sich bei denjenigen Bakterienzellen manifestiert, welche lösliche Gifte als Stoffwechselprodukte in den Nährlösungen bilden. Letztere Erfahrung, daß die Bakterienleiber und die von ihnen produzierten Gifte

völlig verschiedene antigene Wirkungen haben können, wurde in zahlreichen Fällen gemacht und neuerdings wieder beim Diphteriebazillus von Wassermann erhoben, der durch Immunisierung mit Diphteriebazillen ein bakterizides Serum darzustellen versuchte Er verfuhr dabei derart, daß er Diphtheriebazillen (1 g) bei 60° 24 Stunden lang behufs Abtötung trocknete, die nachher zerriebenen Bazillen mehrere Stunden mit 20 ccm 0,1 %iger Äthylendiaminlösung schüttelte und zentrifugierte. Die erhaltene Lösung wurde, um die antitoxisch wirkenden Antigene abzusättigen, mit Antitoxin gemischt und dann intravenös injiziert. Aus den bei der Bereitung des Diphtherietoxins im Institut Pasteur in Paris auf den Filtern zurückgebliebenen Diphtheriebazillen stellte auch E. Rist nach sorgfältigem Waschen mit Alkohol und Äther und Trocknen im Vakuum über H_2SO_4, Zerreiben im Mörser und Aufschwemmen in NaCl-Lösung ein Gift dar, das Meerschweinchen in 24—48 Stunden tötete, aber durch Diphtherieantitoxin nicht zu neutralisieren war. Einen ähnlichen Befund erhoben bereits Brieger und Boer, welche aus den gut mit Wasser extrahierten Diphtheriebazillen ein Meerschweinchen schon in der Dosis von 0,01 g tötendes, von den Autoren als nekrotisierend bezeichnetes Gift auffanden; demselben kamen jedoch keine immunisieren-Eigenschaften zu. (Vgl. Schwoner und Lipstein.)

Eine praktisch wertvolle, physiologisch-chemisch auf Grund der bekannten Tatsache, daß Eiweißkörper im trockenen Zustande sehr hohe Hitzegrade (120°) ohne Änderung ihrer physiologischen Merkmale vertragen, freilich durchaus verständliche Methode ist die bereits früher erwähnte Löfflersche Methode; Löffler zeigte, daß die Mikroorganismen und andere Antigene im trockenen Zustande erhitzt, bei Hitzgraden ihre immunisatorischen Fähigkeiten bewahren, welche bei Einwirkung in feuchtem Zustande deletär wirken, so daß auf diesem Wege in bequemer Weise mit sterilem Materiale immunisiert werden könne. (Siehe auch S. Costamagna*).

Für den Einfluß verschiedener Hitzegrade auf die Antigendarstellung haben neuerdings Friedbergers und Moreschis systematische Studien wertvolle Beiträge geliefert, indem sie zeigten, daß die Art der Abtötung der Bakterien vor der Schutzimpfung für die Produktion der Antigene bedeutungsvoll ist. Durch intravenöse Injektion minimalster Dosen (Bruchteile von $^1/_{100}$ Öse) von Cholera und Typhuskulturen, die bei 60° abgetötet worden waren, gelingt es bereits, hohe bakterizide Titer und hohe Agglutinationswerte zu erzielen, ebenso durch trockene und auf 120° erhitzte Bakterien. Durch Erhitzen der Bakterien im feuchten Zustande über 100° oder durch Erhitzen im trockenen Zustande auf 150° werden die antigenen Gruppen, namentlich die agglutinogenen erheblich geschädigt, eventl. vernichtet, während die Abtötung durch Chloroform speziell die lysinogenen Gruppen nur unbedeutend schädigt; die Agglutinogene sollen auch bei dieser Prozedur unwirksam werden, können

*) Siehe auch Deutsches Reichspatent, Kl. 30h, Nr. 153382 vom 24./IV. 1903 der Farbwerke Höchst a. M.: Verfahren zur Gewinnung von zur Erzeugung von Antikörpern verwendbaren Materialien. Stoffe, welche zur Erzeugung von Antikörpern aller Art, wie Agglutinine, Präzipitine und dgl. bei Tieren und Menschen verwendbar sind, werden gewonnen, wenn organische Substanzen aller Art, Mikroorganismen und deren Produkte, gesunde und krankhaft veränderte Organe und Organteile, Sekrete und Exkrete von Tieren und Menschen in vollkommen trockenem Zustande bis zur Keimfreiheit erhitzt werden. (Nach dem Chemisch. Centralblatt 1904, Bd. II, pag. 1271, 75. Jahrgang.)

aber durch nachträgliche Autolyse bei 37° wieder wirksam werden. Mehrmaliges Gefrierenlassen und Wiederauftauen der bei 60° abgetöteten Bakterien verursacht keine Veränderung ihrer Wirksamkeit für die Antikörperbildung. Bemerkenswert ist dabei der Befund, daß bei Verimpfung wenig wirksamer, durch diese Art der Abtötung geschädigter Antigene die Intensität der Antikörperproduktion der Menge des Impfstoffes proportional ist, während bei der Verimpfung gut wirksamer Antigene innerhalb weiter Grenzen zwischen Impfstoffmenge und Höhe der Antikörperbildung keine Proportionalität besteht.

Wie man aus dem Vorhergehenden ersieht und wie insbesondere aus den speziellen Untersuchungen von Friedberger und Moreschi bei Typhus und Cholera hervorgeht, sind selbst ziemlich hohe Temperaturen anscheinend nicht imstande, — eine Ausnahme bildet das Pestantigen, nach Petterson wird durch Erhitzen auch die immunisierende Wirkung der Typhusbazillen vermindert — die bakteriziden Antigene schädlich zu beeinflussen resp. zu vernichten, und es bleibt eine für den Chemiker immerhin dankenswerte Aufgabe, diese relativ resistenten Stoffe, von denen wir chemisch so gut wie nichts wissen, eines näheren Studiums zu würdigen.

Während die Anwendung höherer Temperaturen ein geeignetes Mittel darstellt, unter Abtötung der Bakterien Antigene zu erzeugen, können selbst die niedrigsten Temperaturen, wie sie z. B. bei Anwendung der flüssigen Luft entstehen (— 190°), von den Bakterien ohne Schaden vertragen werden; Kälte an sich kann also nicht als Abtötungsmittel dienen.

Im Gegensatze dazu scheinen die agglutinogenen Antigene des Zelleibes im gleichen Schritte mit den Eiweißkörpern von verschiedenen Temperaturgraden in verschiedener Weise beeinflußt zu werden und jene Zustandspezifizität zu entfalten, wie sie in den Befunden von Obermayer und Pick, Joos, Kraus und Joachim und O. Porges uns entgegentritt; die Einwirkung der Wärme hat hier in weiten Grenzen keine Vernichtung des Agglutinogens zur Folge, sondern nur eine Änderung desselben, entsprechend der Änderung der physikalisch-chemischen Beschaffenheit der Eiweißkörper des Zelleibes.

Zu der Darstellung der Antigene durch Abtötung mittels Chemikalien werden, wie schon an verschiedenen Stellen erwähnt wurde, vielfach Chloroformzusatz resp. Chloroformdämpfe und Karbolsäurezusatz, so daß 0,5 %ige Lösungen resultieren, verwendet. Bei letzterem Zusatz, der häufig nur die Rolle des Konservierungsmittels spielt, ist zu bemerken, daß es nicht gleichgültig ist für die Bildung der Antigene, ob der Zusatz zu dem durch Hitze nicht abgetöteten Bakterium — also als Abtötungsmittel — erfolgt, oder zu dem bereits abgetöteten, wo der Phenolzusatz nur die Rolle des Konservierungsmittels übernimmt. Während z. B. 0,5 % Karbolsäurelösung die immunisierende Kraft von frischen Pestkulturen herabsetzt, hat dieselbe auf abgetötete keinen schädigenden Einfluß. Ein weiteres öfters benütztes Abtötungsmittel ist das Trikresol in 0,5 %iger Lösung. So benutzte es Gay um aus Aufschwemmungen lebender Ruhrbazillen einen für Pferde gut wirksamen Impfstoff zu erhalten. Dabei scheint sich hier wieder Trikresol umgekehrt zu verhalten, als die Karbolsäure bei den Pestbazillen, da der Zusatz von Trikresol zu abgetöteten Bazillen den Impfstoff erheblich mehr abschwächte, als wenn der Zusatz direkt zu den lebenden Kulturen erfolgte. Van de Velde benützt zur Abtötung der Staphylokokkenkulturen in dem Pleuraexudat Äther und wiederholt wird Thymol auch Toluol nach

kräftigem Schütteln der keimhaltigen Flüssigkeit als Abtötungsmittel angewendet, so unter anderem bei Conradis Versuchen, auf diese Weise Milzbrandantigene darzustellen. Der Lugolschen Lösung sowie des Jodtrichlorids wurde an anderer Stelle, freilich als Abschwächungsmittel der Virulenz, bereits gedacht. Zur bequemen Herstellung von Agglutinogenen wurden verschiedene Reagentien verwendet: so hat bereits vor vielen Jahren Widal durch Formol abgetötete Typhusbouillonkulturen benützt, P. Aaser gebrauchte als Agglutinationsreagens Typhusbakterien in Peptonzuckerwasser (10 g Pepton, 10 g Rohrzucker, 5 g NaCl auf 1000 H_2O) mit 1 % $^n/_{10}$ HCl und Toluol, und endlich Ficker mit Karbolsäure abgetötete Typhusbakterienaufschwemmungen. Zur Abtötung zu agglutinierender Bakterien, speziell Typhusbakterien, wurden bereits früher mit Erfolg verwendet und zwar Chloroform von Bordet, Thymol, Phenol, Äther, Sublimat in antiseptisch wirkenden Dosen von van de Velde.

c) Darstellung der Antigene durch Extraktion der Bakterienleiber.

Der Begriff der Giftsekretion ist bei den Bakterien nicht als ein streng umschriebener zu betrachten; zumal bei der praktischen Darstellung bestimmter Antigene lassen sich zahlreiche Übergänge zwischen den sogenannte „echte" Toxine sezernierenden Bakterien und den sogenannte Endotoxine liefernden aufstellen. Es kann dabei offen gelassen werden, ob die sogenannte Sekretion der Gifte nicht ihre Ursache in einer äußerst leicht durch die stets salzhaltigen Nährböden stattfindenden Extraktion der Zelleiber hat; die Tatsache, daß wir auf diese Weise aus zahlreichen anderen Bakterien keine gut wirksamen Gifte erhalten, kann nur als Beweis dafür gelten, daß diese Gifte mit den bisher angewandten Hilfsmitteln nur schwer oder in so geringer Menge extrahirbar sind, daß sie eben nur schwache physiologische Wirkungen erzeugen; erst durch geeignete Methoden konzentriert, entfalten diese schwachen Extrakte erhebliche Wirkungen. Wir wissen aus den Untersuchungen von Kossel, daß sogar aus dem Diphtheriebazillus, der durch wiederholtes sorgfältiges Waschen bis zur Biuretfreiheit und wiederholtes Zentrifugieren vom Diphtherietoxin völlig befreit worden war, durch Extraktion des mit Chloroform abgetöteten Zelleibes mit schwachen Alkalien schwache aber deutlich wirksame Gifte isoliert werden können und die relative Leichtigkeit, mit welcher unter geeigneten Bedingungen aus den nicht echte Toxine sezernierenden Bakterien giftige Antigene gewonnen werden können, beweist, daß die Scheidung zwischen Gift sezernierenden und nicht sezernierenden Bakterien, wohl nur eine künstliche, zum größtenteil durch unsere mangelhafte Technik bedingte ist.

1. Extraktion durch flüssige Nährmedien und Körpersäfte.

Die bei den echten Toxinen geübte Technik, durch Ton oder Porzellanfilter von den Bakterien gereinigte Nährmedien als Antigene zu benützen, scheitert hier häufig daran, daß die geringen in den Extrakten befindlichen Gifte respektive die giftigen Substrate nur mit großen Verlusten ihrer Giftigkeit solche Filter passieren und auf diese Weise die an und für sich geringe Ausbeute an wirksamen Extrakten noch erheblich vermindern. Dazu kommt noch der Umstand, daß selbst die abgetöteten Bakterienleiber, wie dies Cantani bei der Cholera nachgewiesen hat, stets noch große Giftmengen enthalten, so daß die filtrierte Kultur nie-

mals die Giftigkeit der unfiltrierten selbst sterilisierten Kultur aufweisen kann. Man ist daher nahezu immer gezwungen, der Extraktion eine Konzentrierungsmethode nachfolgen zu lassen und es liegen genügend Erfahrungen vor, die dafür sprechen, daß durch einfache Filtration von Kulturen in flüssigen Nährmedien und nachherige Konzentration aus solchen, im eigentlichen Sinne nicht „giftsezernierenden" Bakterien wirksame spezifische Gifte gewonnen werden können. So hat z. B. Bitter bereits im Jahre 1892 durch vorsichtig gesteigerte intravenöse Injektion von keimfrei filtrierten auf $^1/_{10}$ eingeengten Typhuskulturen an Kaninchen gut wirksame Immunkörper darstellen können, welche auch andere Kaninchen gegen Einführung tödlicher Dosen von giftiger Typhusbouillon zu schützen vermochten.

In ähnlicher Weise wurden von zahlreichen anderen Autoren durch längere und kürzere Züchtung auf geeigneten Nährböden und keimfreie Filtration giftige Antigene von Typhus*) (Chantemesses hitzebeständiges Typhustoxin, Martin, Rodet, Lagriffoul und Aly-Wahby, neuerdings auch Kraus und von Stenitzer usw.) von Cholera**) (Petris thermolabiles Toxopepton, Gamaleias thermostabiles Choleragift, Sluyts thermostabiles [120°] Choleragift, Ransoms thermostabiles, alkohol-fällbares Choleragift und Sobernheims immnuisierendes Gift) und anderen Bakterien (Proteustoxin von Carbone: mit Ammonsulfat ausgesalzene Kulturfiltrate, Pneumotoxin Klemperers: Alkoholfällung filtrierter Pneumokokkenbouillonkulturen, Gonokokkentoxin (?) von Schäffer und Christmas, Colitoxin von Sluyts, Tuberkulosetoxin von Maragliano, die von Martin durch Aussalzen der Kulturfiltrate gewonnenen toxischen Albumosen der Milzbrandbazillen und Marmiers Milzbrandtoxin, das aus den Ammonsulfatniederschlägen der filtrierten Nährmedien durch Glyzerinextraktion dargestellt wurde) gewonnen; doch ist die spezifische Antigennatur vieler dieser Gifte eine strittige.

Eine ganz besondere Sorgfalt wurde angewendet, um aus den Nährflüssigkeiten des Tuberkelbazillus wirksame Antigene zu gewinnen, wie wohl die Bakterienleiber selbst, wie Kochs Untersuchungen zeigen, einen großen, wenn nicht den größten Teil der spezifisch toxischen Substanzen zurückbehalten. Bereits Koch, Stern, Hueppe und Scholl, Strauss und Gamaleia konnten feststellen, daß in den Filtraten von Tuberkelbazillenkulturen wirksame Produkte enthalten sind und die erste Modifikation des ältesten Kochschen Verfahrens der Tuberkulindarstellung, das zunächst ein Extraktionsverfahren der Bazillen mit wässeriger Glyzerinlösung darstellte, besteht darin, daß eine Kultur von Tuberkelbazillen (Bouillon mit Zusatz von 1 % Pepton, 4—5 % Glyzerin) nach einem Wachstum von sechs bis acht Wochen auf $^1/_{10}$ des ursprünglichen Volumens eingeengt und durch Tonfilter filtriert wird. Kühne erhielt durch Eindampfen einer derartigen, nach seinen Vorschriften zusammengesetzten Nährlösung bei 40°, Zerreiben des Rückstandes mit absolutem leicht mit Soda alkalischem Alkohol und 50 %igem Glyzerin und endliche Filtration ein Präparat, das er bei 80° sterilisierte und das sich dem Kochschen Tuberkulin gleichwertig zeigte.

Nach Maragliano enthält das bei 110° eingeengte Kochsche Tuberkulin hauptsächlich die nur widerstandsfähigen Bakterienproteine, während die labileren Toxalbumine, welche eine andere physiologische Wirkung erzielen sollen — die Bakterienproteine sollen Temperaturerhöhung be-

*) Siehe v. Stenitzer pag. 193.
**) Siehe Kraus pag. 176.

dingen, die Toxalbumine Temperaturabfall und Schweißausbrauch veranlassen — zerstört werden. Daher geht Maragliano bei der Darstellung seines Toxalbumins derart vor, daß er die Tuberkulosebouillonkulturen durch Chamberlandkerzen filtriert und im Vakuum bei 30° einengt; so gewinnt er eine Flüssigkeit, welche sowohl Bakterienproteine als auch Toxalbumine enthält. Mit einem Gemisch von drei Teilen auf 100° erhitzter und einem Teile nur im Vakuum bei 30° eingeengter Kultur durch sechs Monate immunisierte Versuchstiere (Hunde, Esel und Pferde) erzeugen nach Maragliano ein Serum, das sowohl antitoxische, wie auch bakterizide Eigenschaften besitzt. Fraenkel und Bronstein konnten im wesentlichen die Versuche Maraglianos bestätigen.

Insbesondere Klebs war es, der der Verarbeitung der keimfreien Tuberkelbazillenkulturen deshalb große Aufmerksamkeit schenkte, weil er annahm, daß durch das Eindampfen der Kulturen nach den Angaben Kochs, von denen er auch früher ausgegangen war, ein großer Teil der Heilsubstanz zerstört würde und die Extraktion der Bakterien, welche toxische, für die Heilwirkung nach Klebs schädliche Substanzen lieferte, umgangen werden könne. Daher geht er bei der Darstellung seines Antiphthisins (abgekürzt AP) derart vor, daß die von den Bazillen getrennte Kulturflüssigkeit durch Zusatz von in Glyzerin gelöstem 0,6 %igen Orthokresol zunächst sterilisiert wird; nach 24stündigem Stehen werden die toxischen Albumosen bei schwach essigsaurer Reaktion mit Natriumwismutjodid ausgefällt, das Filtrat zur Entfernung des Jods mit Natronlauge alkalisch gemacht, zur Entfernung des Wismutsalzes auf dem Wasserbade erwärmt und abermals filtriert. Die wirksame Substanz des Filtrates wird nunmehr mit absolutem Alkohol ausgefällt und der Niederschlag in H_2O unter Zusatz von 0,2 % Orthokresol in Glyzerin derart gelöst, daß eine 1 %ige Glyzerinlösung resultiert.

Auch das Präparat „Tuberkulol" Landmanns, stellt ein Gemisch von Hitzeextrakten des Tuberkelbazillus mit der bei 37° eingeengten und filtrierten Nährflüssigkeit dar. In neuester Zeit hat Denys durch einfache Filtration der Tuberkelbazillenbouillon und Vermeidung jeglicher die Gifte eventuell schädigender Konzentrierungsprozedur in seiner „Bouillon filtré" ein sehr wirksames Tuberkulinpräparat gewonnen.

In ähnlicher Weise, wie die hier aus menschlichen Tuberkelbazillen dargestellten Präparate, wurden auch solche aus Perlsuchtbazillen erzeugt. Spengler engte die Nährbouillon der Perlsuchtbazillen auf die Hälfte ein und brachte durch Glyzerinzusatz die Lösungen auf einen 50 %igen Glyzeringehalt. Das Perlsuchttuberkulin (PTO) soll weniger toxisch sein, wie das menschliche Tuberkulin

Ebenso fand die bei der Tuberkulinbereitung eingeschlagene Technik auch bei der Darstellung wirksamer Impfstoffe aus Rotzkulturen, der sogenannten Malleine reichliche Anwendung. Die am meisten geübte Methode der Malleindarstellung nach Roux und Nocard ist eine der Tuberkulindarstellung der Hauptsache nach vollkommen analoge, indem glyzerinhaltige Bouillonkulturen nach einmonatlichem (Roux) oder mindestens achtmonatlichem (Kresling) Wachstum bei 110° sterilisiert und auf $^1/_{10}$ ihres ursprünglichen Volums auf dem Wasserbade eingeengt werden. Babes verfuhr bei der Darstellung eines gereinigten Malleins, das als Morvin in den Handel gebracht wurde, derart, daß er das Filtrat der Bouillonkulturen nach dem Ansäuern auf 78° erhitzte, nach Abfiltrieren des Albumins mit Ammoniumsulfat oder Magnesiumsulfat die Lösung sättigte und den dialysierten Niederschlag durch Chamberland-

kerzen filtrierte. Die resultierende Lösung wird bei 40° im Vakuum eingeengt, mit Alkohol gefällt und der Niederschlag in glyzerinhaltigem H_2O gelöst. Die Substanz hat thermische und toxische Eigenschaften, wie das Tuberkulin. Ein ähnliches als „trockenes Mallein“ bekanntes Präparat haben auch FOTH, sowie BONOME und VIVALDI, wie auch TRÖSTER durch Fällung der filtrierten Rotzkulturen mit absolutem Alkohol erhalten.

Das günstigste Nährmedium für die Produktion zahlreicher anderer giftiger Antigene — und um solche handelt es sich entsprechend der großen Bedeutung antitoxischer Sera vorwiegend — bilden die Säfte des lebenden tierischen Körpers; es ist in der Tat mit Leichtigkeit gelungen, auf diesem Wege toxische Substanzen zu erhalten aus Bakterien, die in vitro keine Gifte zu produzieren imstande waren. Eine derartige Darstellungsmethode wurde zuerst von METCHNIKOFF, ROUX und TAURELLI-SALIMBENI in geistvoller Weise zum Nachweise der Toxine der Cholera angewendet. METCHNIKOFF und seine Mitarbeiter bedienten sich dreier Kollodiumsäckchen, von denen das eine mit virulenten Cholerabakterien, das zweite mit abgetöteten und das dritte mit einer sterilen Kontrollbouillon beschickt worden war und versenkten alle drei wohl verschlossen in die Peritonealhöhle von je einem Meerschweinchen. Während die zwei letzten Tiere gesund blieben resp. leicht erkrankten, ging das erste Tier an dem von den Vibrionen im Organismus entwickelten, durch das Säckchen durchgetretenen, löslichen Toxin zugrunde. Mit Hilfe dieser Säckchenmethode gelingt es, hochvirulente und giftige Kulturen zu erhalten, welche nach 4—5tägigem Stehen im Brutschrank durch Filtration sterilisiert werden und ein Gift liefern, von dem $^1/_4$—$^1/_3$ ccm bei subkutaner Injektion Meerschweinchen von 300 g in 18 Stunden tötet, welches kochbeständig, durch Alkohol und Ammonsulfat fällbar ist und ein antitoxisches Serum zu erzeugen vermag. Diese Säckchenmethode hat vielfache Anwendung bei Darstellung verschiedener anderer Antigene, wenn auch mit schwankenden Erfolge, gefunden, so von VALLÉE beim Schweinerotlauf, von BISANTI bei der Hühnercholera, von CRENDIROUPOULO und RUFFER beim Bac. pyocyaneus, von RODET und GUECHOFF beim Bact. coli und Typhi und vor kurzem von DE WAELE und SUGG bei der Kuhpocke. DE WAELE hatte neuerdings bei zahlreichen Bakterien und Giften das METCHNIKOFFsche Verfahren insofern modifiziert, als er sich statt der Kollodiumsäckchen, Säckchen aus Schilfrohr (Phragmites communis) und aus Zellulose bediente und dieselben unter die Haut der Versuchstiere brachte.

F. LANGE benützte mit Fortlassung einer dialysierenden Membran ein ähnliches Prinzip, indem er in die Bauchhöhle von Meerschweinchen Typhusbakterien in der 2—3fachen letalen Dosis ($^1/_2$—1,5 ccm einer 16—18stündigen Kultur) injizierte und nach 4—5 Stunden, nach Eintritt erheblicher Herabsetzung der Körpertemperatur und bevor ein Zerfall der Bakterien zu konstatieren war, den Inhalt der Peritonealhöhle entnahm, mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnte und durch ein Berkefeld-Filter bei niedriger Temperatur filtrierte. Das Filtrat enthielt ein spezifisches Gift des Typhusbazillus, das er zum Unterschied von PFEIFFERS Endotoxin als Exotoxin bezeichnete und als ein spezifisches Sekretionsprodukt ansah.

Hierher soll endlich die von OSKAR BAIL in großem Maßstabe durchgeführte Methode der Antigendarstellung mittels der sogenannten „natürlichen Aggressine“ gezählt werden*). Unter Bakterienaggresivität

*) Siehe LEVADITI pag. 237.

versteht Bail eine bei der Infektion wirksame Bakterieneigenschaft, deren Bedeutung in der Überwindung der natürlichen, insbesondere zelligen Schutzkräfte des Organismus besteht (die Leukozyten abhaltende Wirkung der Aggressine).

Wenn auch gerade diese als ein neuartiges Phänomen angenommene Eigenschaft der lebenden Bakterienzelle bisher allgemeine Anerkennung nicht gefunden hat, so ist die Herstellung aggressiv wirkender Substanzen schon deshalb von praktischem Interesse, weil nach dem oben Auseinandergesetzten sehr wohl die Möglichkeit vorliegt, daß der lebende Organismus viel leichter die Bakterienzellen zur Produktion von antigenen Substanzen anregt und diese mittels der Körpersäfte besser extrahiert, als unsere künstlichen Nährsubstrate dies vermögen. In diesem Sinne können auch gewisse qualitative Unterschiede gegenüber den in vitro erhaltenen Bakterienextrakten, wie sie Wassermann und Citron u. a. erhalten haben, bestehen. Nach Bail werden die Aggressine derart dargestellt, daß eine bestimmte Menge einer Kultur intraperitoneal oder intrapleural injiziert wird; sobald das Tier eingegangen ist, wird das entstandene peritoneale oder pleurale Exsudat nach Entfernung der zelligen Elemente und der Bakterien durch Zentrifugieren als Antigen verwendet, eventuell nach Zusatz eines Antiseptikums oder nachdem eine Sterilisierung durch Erhitzen vorgenommen wordenwar. Die aggressiven Substanzen werden durch halbstündiges Erwärmen auf 55—56°, sowie durch Chloroform, Toluol, kleine Mengen Karbolsäure entweder ganz zerstört oder erheblich geschwächt; nur das Tuberkuloseaggressin ist hitzebeständig. Die bisher als Antigene sich wirksam erwiesenen Aggressine sind Choleraaggressine (Bail), Dysenterieaggressine (Kikuchi), Milzbrand und Hühnercholeraaggressine (Weil), Pestaggressine (Hueppe und Kikuchi) und endlich Typhusaggressine (Bail) und Staphylokokkenaggressine (Bail und Weil). Von diesen Aggressinen besitzen die des Milzbrandes und der Hühnercholera keine giftigen Eigenschaften, sind aber trotzdem imstande hohe aktive, wie auch passive Immunität zu erzeugen.

2. Extraktion durch Wasser, Salze, Glyzerin, Organsäfte und Fermente in vitro.

Behufs Extraktion von Bakterien zum Zwecke der Darstellung von Antigenen werden die von Massenkulturen, in der Regel von Agar, Gelatine oder Kartoffelkulturen herrührenden Bakterien in dem betreffenden Extraktionsmittel aufgeschwemmt, einige Zeit bei Brutschranktemperatur stehen gelassen, und, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Bakterien zu erzielen, in einem Schüttelapparate, der zur Unterstützung der Reaktion auch geheizt sein kann, beliebig lange Zeit geschüttelt. Modelle derartiger Schüttelapparate, die mit einem elektrischen Motor eventuell einer Turbine betrieben werden können, stellen die Abbildungen Fig. 6 u. 7 dar. Es gibt eine große Reihe von Modifikationen dieser hier dargestellten Typen. Die weiteste Verbreitung genießen die Schlittenapparate, die auch aus Eisenblech hergestellt, durch eine unter dem Apparate aufgestellte Flamme auf eine beliebige Temperatur erhitzt werden können. Andere Schüttelapparate werden durch große, an ihrem unteren Ende ein Gehäuse zur Aufnahme eines Gefäßes tragende Pendel dargestellt, die einerseits durch die Pendelbewegung und anderseits durch eine bei jeder Schwingung spielende Arretierungsvorrichtung die Flüssigkeit kräftig schütteln.

An die Extraktion der Antigene wird dann in der Regel mit oder ohne Filtration durch Tonzellen oder Papier zweckmäßig ein Konzentrationsverfahren angeschlossen, das von Fall zu Fall ein recht wechselndes sein kann. Die genauere Besprechung der Konzentrationsmethoden erfolgt an anderer Stelle. Die hier zu erwähnenden Extraktionsmethoden sind verschiedenartige.

Fig. 6. Schüttelapparat. (Der Schlitten wird auf den Eisenschienen mittels Elektromotors hin und her bewegt.)

Fig. 7. Schüttelapparat. (Die eingespannten 10 Gefäße werden mit Hilfe eines Motores um eine horizontale Achse bewegt.)

Dieselben werden natürlich vor allem von dem Bau und den biologischen Eigenschaften der zu extrahierenden Bakterien abhängen; die mit dicken, fettähnlichen Hüllen und Kapseln umgebenen Zelleiber werden naturgemäß schwerer der extrahierenden Lösung zugänglich sein, als die mit dünnen, einen Stoffaustausch leicht ermöglichenden Membranen versehenen Zellen. In dieser Beziehung waren es gerade die nur schwer zu extra-

hierenden Tuberkelbazillen, deren Bearbeitung zu einer Förderung der hier einschlägigen Technik geführt hat, welche in der Folge auch bei der Darstellung anderer bakterieller Antigene Anwendung gefunden hat. Es mag daher gerechtfertigt erscheinen, wenn wir mit der Besprechung der Extraktionsmethoden beginnen, welche zu der Gewinnung der verschiedenen Tuberkulinpräparate geführt haben, deren Antigennatur wohl fest steht, wenn auch die Frage nach der Toxinnatur dieser Körper vorläufig offen ist.

Das zu extrahierende Bakterienmaterial wird entweder von flüssigen Kulturen in der Weise gewonnen, daß man die Kulturen mittels Filtration auf der Oberfläche der Ton-, Kieselguhr- oder Kaolinfilter sammelt, oder dieselben durch Zentrifugen ausschleudert, oder, wenn es sich um dichte Oberflächenkulturen handelt, mit dichten Drahtnetzen abhebt; von den verschiedenen festen Nährböden werden die Kulturen mit Platinspateln abkratzt oder mit dem Extraktionsmittel abgespült. Es kann auch die Extraktion in der Weise durchgeführt werden, daß die Kultur samt dem Nährmittel eingeengt und auf diesem Wege gleichzeitig extrahiert wird.

Das Extraktionsmittel *κατ' ἐξοχήν*, welches sich bei der Darstellung des Tuberkulins Koch nach mühevollen Versuchen am geeignetsten erwies, ist das Glyzerin und Kochs erste Darstellung des Rohtuberkulin fand derart statt, daß die von der Nährlösung befreiten Bazillen mit wässeriger Glyzerinlösung übergossen wurden und die so erhaltene Flüssigkeit auf den 10. Teil ihres Volumens im Dampfapparat, also bei 100°, eingeengt und hierauf keimfrei filtriert wurde; diese konzentrierte, bräunlich gefärbte Flüssigkeit ist gut haltbar; in wässeriger Verdünnung dagegen bedarf sie behufs Konservierung eines Phenolzusatzes von 0,5%. Bujwid, von dem der Name Tuberkulin herrührt, stellte ein gleiches Präparat dar aus Agar- und Bouillonkulturen, die er jedoch im Vakuum eindampfte. Das Glyzerin hat sich in 2—5%iger Lösung als Extraktionsmittel auch in der Hand anderer Autoren (Kühne, Klebs, Hueppe, Hirschfelder und Landmann) recht gut bewährt und Buchner rühmt dessen sehr starke osmotische Wirkung auf die pflanzlichen Zellen, so daß Teile des wässrigen Inhaltes mit den darin gelösten eiweißartigen Stoffen schonend extrahiert werden können.

Das durch Glyzerinextraktion und Eindampfen gewonnene Rohtuberkulin war vielfach Gegenstand von Reinigungsversuchen, die einmal darin bestanden, daß dasselbe mit dem 1½fachen Volumen absoluten Alkohols gefällt wurde: der nach 24stündigem Stehen erhaltene Niederschlag wurde wiederholt mit 60%igem Alkohol gewaschen und dann bei 100° im Vakuumexsikator getrocknet. Es resultierte auf diese Weise das sogenannte „gereinigte Tuberkulin" Kochs. Während Koch der Reinigung des Rohtuberkulins keine große Bedeutung beilegte, glaubte Klebs die schädlichen Nebenwirkungen des Tuberkulins, unter welche er die Temperatursteigerung, die lokale Reizung der Applikationsstelle und die Störungen von Seite des Herzens und Nervensystems zählte, durch eine chemische Reinigung beseitigen zu können.

Er stellte zunächst durch Ausfällen des Rohtuberkulins mit dem 5—10-fachen Volumen absoluten Alkohols und Waschen des erhaltenen Niederschlages mit Äther, Chloroform und Benzol das seiner Meinung nach von Alkaloiden freie und gut wirksame Tuberkulinum depuratum her. Die weitere Reinigung fand durch Ausfällung mit Alkaloidreagentien statt, wobei sich Klebs insbesondere das Natriumwismuthjodid in essigsaurer Lösung bewährte, mit dem er die toxisch wirkenden Albumosen

entfernte. Das Filtrat des Albumosenniederschlags, zur Entfernung des Jods mit Lauge behandelt und zur Entfernung des Wismuts auf dem Wasserbade erwärmt, wird nach nochmaliger Filtration mit absolutem Alkohol gefällt. Der erhaltene Niederschlag stellt das „Tuberkulozidin“ von KLEBS dar, welches auf die gleiche Konzentration mit dem Rohtuberkulin gebracht, dessen sämtliche tuberkulozide Substanz enthalten soll. Da der Niederschlag des Wismutjodid neben seiner toxischen Wirkung auch stark tuberkulozide Eigenschaften hat, stellte aus diesem KLEBS durch Auflösen desselben und nach Entfernung des Jod und Wismut in der eben beschriebenen Weise eine wegen der toxischen Wirksamkeit als Erethin bezeichnete Substanz dar.

Eine weitere Reinigung des Rohtuberkulins wurde endlich von HIRSCHFELDER durch Oxydation mit H_2O_2 bei der Darstellung des „Oxytuberkulin“ versucht. Auf die Reindarstellung und Charakterisierung der einzelnen Produkte des Rohtuberkulins durch KÜHNE wird noch später eingegangen werden. (Siehe II. Teil dieser Abhandlung.)

Ein anderes Prinzip der Extraktion hatte MARAGLIANO und zahlreiche andere Forscher angewandt, nämlich die Extraktion mit Wasser bei verschiedenen Temperaturen, von dem MARAGLIANO behauptet, daß es die Tuberkelbazillen besser extrahiere, wie Glyzerin. MARAGLIANO stellte einen wässerigen Extrakt der Tuberkelbazillen dar, indem er die abfiltrierten Bazillen in einer der Kulturflüssigkeit entsprechenden Menge von H_2O aufschwemmte und 45—48 Stunden bei 90—95° unter Ersatz des verdampfenden H_2O digerierte. Die auf solche Weise erhaltene Flüssigkeit wird auf $^1/_{10}$ des ursprünglichen Volumens eingeengt und stellt das „wässrige Tuberkulin“ dar, welches die Wirksamkeit des glyzerinhaltigen Tuberkulins besitzt, ohne eine merkliche lokale Reaktion auszulösen und die dem Glyzerin zukommende Giftwirkung zu besitzen. Ein Kubikzentimeter tötet, mit 5% Glyzerin konserviert, 100 g Meerschweinchen. Es gelingt, den trockenen, entfetteten Bakterien etwa die Hälfte ihres Gewichtes und fast sämtliches Gift zu entziehen. Der Trockenrückstand des wässerigen Tuberkulins enthält ca. 40% Gift, und 0,004 g desselben töten, in H_2O gelöst, 100 g Meerschweinchen. Durch Behandeln des Trockenrückstandes mit Alkohol konnte MARAGLIANO ein äußerst giftiges Präparat erhalten, das noch in einer Verdünnung von 1:25000 Meerschweinchen und 1:33000 bei intravenöser Applikation Kaninchen zu töten imstande war. Auch SCHWEINITZ und DORSET extrahierten mit heißem Wasser aus Tuberkelbazillen eine albuminoide Substanz, von ihnen „cell extract“ genannt, welche bei tuberkulösen Tieren eine spezifische Reaktion erzeugte.

Eine Reihe von Autoren benützten bei der Erzeugung wirksamer Substanzen mehrere Extraktionsverfahren gleichzeitig. So hatte LANDMANN bei der Darstellung des schon früher erwähnten Tuberkulols eine wiederholte Extraktion virulenter Tuberkelbazillen mit Glyzerin, dann mit H_2O und endlich mit physiologischer Kochsalzlösung zuerst bei 40°, dann bei 50°, 60° usw. bis zuletzt bei 100° zu dem Zwecke durchgeführt, damit die extrahierbaren Giftstoffe nicht unnötigerweise hohen, sie schädigenden Temperaturen ausgesetzt wurden. Sämtliche Extrakte werden gesammelt, durch Eindampfen im Vakuum bei 37° eingeengt und durch Hinzufügung der konzentrierten Nährlösung zu dem sogenannten „Tuberkulol“ vereinigt.

Eine bessere Ausbeute bei den verschiedenen hier genannten Extraktionsverfahren glaubte man zu erlangen, wenn man nicht mehr auf die intakten Leiber die Lösungsmittel einwirken ließ, sondern mit mecha-

nisch zerkleinertem Ausgangsmaterial operierte, ein Verfahren, das Koch und H. und E. Buchner bei der später zu beschreibenden Darstellung ihrer Präparate in die Methodik der chemischen Präparation der Antigene einführten.

An die hier für die Darstellung des Tuberkulins benützten Methoden schließt sich die Darstellung zahlreicher anderer Präparate aus Bakterien an, welche zum Teile den Tuberkelbazillen in ihrem Bau oder im biologischen Verhalten nahe stehen.

So haben bei der Darstellung des Malleins die hier erwähnten Extraktionsmethoden eine große Rolle gespielt. Helmann und nach ihm Kalning, sowie viele Andere verrieben die von jungen Kartoffelkulturen abgeschabten Rotzbazillen mit H_2O und Glyzerin, töteten nach längerer oder kürzerer Extraktion die Bakterien durch Erhitzen ab und filtrierten die Extrakte. Kresling verwendet die nach 10—14tägigem Wachsen bei 36 bis 37^0 abgenommenen Kulturen, welche mit der 10fachen Menge destillierten H_2O übergossen, bei 110^0 sterilisiert und am nächsten Tage durch Chamberlandfilter filtriert werden. Weder der Zusatz von Glyzerin, noch die Extraktion bei höherer Temperatur erhöhen die Wirksamkeit des Malleins, sondern schaffen den Nachteil, eine Menge fremder unwirksamer Stoffe in Lösung zu bringen; das wirksame Prinzip ist durch Verreiben der Bakterien mit Wasser ohne Anwendung der Wärme äußerst leicht zu extrahieren.

Aus Rhinosklerombazillen hat Pawlowsky teils wässerige, teils alkoholische und Glyzerinauszüge hergestellt, mit denen er zwei Fälle von Rhinosklerom mit günstigem Erfolg behandelte; die Wirkung soll eine ähnliche, wie die Tuberkulinwirkung sein.

Haben wir bei der Besprechung der Extraktionsmethoden der durch ihre Hüllen scheinbar sehr resistenten Tuberkelbazillen gesehen, daß eine wirksame Extraktion relativ leicht gelingt, so lehren die Resultate der nun folgenden Extraktionsversuche, daß die allereinfachsten Methoden mehr oder minder Produkte der gleichen Wirksamkeit liefern, wie die auf komplizierte Weise gewonnenen Präparate. Die einfachste Methode, Antigene aus den zu besprechenden Bakterien durch Extraktion zu gewinnen, besteht darin, die meist 24stündigen, aber auch älteren Agarkulturen in physiologischer oder 0,8- oder 1$^0/_0$iger Kochsalzlösung aufzuschwemmen, eine zeitlang (2—24 Stunden) bei Zimmer- oder Bruttemperatur zu halten und durch ein Papier- oder Tonfilter von den Bakterienkörpern zu trennen; das klare Filtrat enthält das Antigen.

Diese einfache Methode hat sich zum ersten Male (1902) bei der Darstellung wirksamer Typhus- und Cholerabakterienkoaguline durch E. P. Pick recht gut bewährt und wurde später bei der Darstellung agglutinierender, bakterizider und toxischer Antigene von verschiedenen Autoren mannigfach modifiziert. Conradi hatte ein Jahr später die gleiche Methode angewendet, stellte sich jedoch, wohl in Analogie mit seinen an Organen ausgeführten Autolyseversuchen, vor, daß bei dem hier als Extraktion bezeichneten Vorgange ein Selbstzerfall der Bakterien infolge fermentativer autolytischer Prozesse eintritt, während Pick nur in alten Bouillonkulturen einem derartigen autolytischen Prozesse für die Entstehung der Antigene (im speziellen Koaguline) eine Bedeutung beilegte. In der Tat scheint es, daß bei der Gewinnung der toxischen Produkte durch Digestion mit Kochsalz, sei es bei Zimmer- oder bei Bruttemperatur, ein etwa nebenher in 24—98 Stunden verlaufender fermentativer Zellzerfall, von dem es ja an und für sich noch fraglich ist,

ob er der aseptischen Autolyse der Organzellen gleich zu setzen wäre, nicht die entscheidende Rolle spielt; denn es gelingt, wie mich eigene Versuche lehrten, und wie sich aus den Arbeiten NEISSERS und SHIGAS mit Hitzeextrakten, bei denen wohl autolytische Prozesse nur in sehr beschränktem Maße mitspielen dürften, und insbesondere aus denen BESREDKAS ergibt, durch kurze $1^1/_2$—2 Stunden dauernde Digestion wirksame Gifte und Antigene zu erhalten. Wie weit bei der Gewinnung bestimmter Toxine auf „natürlichem" Wege, so aus mehrere Wochen wachsenden Bouillonkulturen, wie z. B. bei der Darstellung des Dysenterietoxins nach ROSENTHAL, die „Autolyse" in Betracht kommt, soll natürlich offen gelassen werden*). Es wäre demnach der Ausdruck Autolyse für die hier in Frage kommenden Extraktionsmethoden fallen zu lassen; derselbe ist aber insbesondere dort zu verwerfen, wo es sich, wie bei BERTARELLI und bei STRONG um erhitzte Bakterien oder Bakterienextrakte handelt. Es sollen selbstverständlich dadurch die schönen, von CONRADI auf diesem einfachen Wege gefundenen Tatsachen, die sich für weitere Forschungen so fruchtbringend erwiesen hatten, keine Schmälerung erfahren.

CONRADI verfuhr bei der Darstellung der Giftstoffe der Ruhr- und Typhusbazillen derart, daß er diese Bakterien auf schwach alkalischem, $3\,^0/_0$igem Fleischwasseragar mit $1\,^0/_0$ Tropon-Zusatz 20 Stunden lang wachsen und in $0{,}85\,^0/_0$iger Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 24 bis 98 Stunden bei 37^0 stehen ließ. Die erhaltene Flüssigkeit wurde durch Berkefeldfilter filtriert und im Vakuum bei 35^0 auf $^1/_{10}$—$^1/_{50}$ des Volumens eingedampft. 0.1 ccm steriler Ruhrgiftlösung töten intravenös injiziert ein Kaninchen von 2,5—3 kg in 48 Stunden unter charakteristischen, klinischen und anatomischen Ruhrsymptomen, kleinere Dosen langsamer und rufen dabei charakteristische Darmgeschwüre hervor. 0,2 ccm steriler Typhusgiftlösung töten bei intraperitonealer Injektion Meerschweinchen von 300 g in 24 Stunden.

In gewisser Analogie mit den Versuchen CONRADIS stehen die sog. Autolyseversuche von E. LEVY und PFERSDORFF, welche die von festen Nährböden abgekratzten Bakterien in destilliertem H_2O unter Toluol bei 37^0 extrahierten und so aus asporogenem Milzbrand Gifte zu gewinnen vermochten; es dürfte sich jedoch auch hier, noch viel weniger, wie bei den früheren Versuchen, um eine wirkliche Autolyse handeln, die doch vorzüglich in salzhaltigen Medien und nicht bei der Suspension von Zellen in destilliertem H_2O stattfindet.

Auch CATHCART gibt an, durch Autolyse des Bacillus enteridis GÄRTNER und Paratyphusbazillus unter Toluolzusatz äußerst giftige Präparate erhalten zu haben und findet bezeichnenderweise, daß die Autolyse am besten bei Gegenwart von destilliertem Wasser oder physiologischer Salzlösung verläuft, wobei das „autolysierte", durch Hitze sterilisierte Material toxischer ist, als das nach Autolyse durch Filtration gewonnene, daß ferner durch Schütteln der Gefäße während des Prozesses der „Autolyse" die Giftausbeute wächst. Das Gift des Bacillus enteridis. wie des Paratyphusbazillus verträgt das Erhitzen bei 100^0 durch eine halbe Stunde, während der Kolibazillus ein für Mäuse tödliches Gift liefert, das nicht hitzebeständig ist.

Nachdem HAHN als erster die Autolyse bei Typhus- und Tuberkelbazillen, die nach HAHN kein toxisches Ferment absondern sollen, studiert hatte,

---

*) Siehe DOERR pag. 149.

versuchte er in neuester Zeit durch Anwendung echter, über mehrere Tage und Wochen ausgedehnter Autolyse aus Cholera und Typhusbazillen toxische Produkte, welche immunisierende Eigenschaften besitzen, zu gewinnen; dabei verwendete er, um ein für die Giftbildung möglichst geeignetes Nährmedium zu erlangen, Zusatz von Dünndarmpreßsaft als Digestionsflüssigkeit. Das Verfahren gestaltete sich folgendermaßen: Normale, möglichst frische Dünndarmstücke (ca. 1 m unterhalb des Pylorus abgeschnitten), wurden im laufenden Wasser gut gereinigt, zunächst in der Fleischhackmaschine ausgepreßt, später mit Sand und Kieselgur nach der Buchner-Hahnschen Methode zerrieben und unter der hydraulischen Presse ausgepreßt. Die so gewonnenen, gereinigten Preßsäfte wurden zur Entfernung des Fettes mit Chloroform geschüttelt und nach dem Absetzenlassen im Eisschrank durch Berkefeldfilter filtriert; das Chloroform wird durch längeres Evacuieren während der Filtration entfernt und die Flüssigkeit, wenn nötig, durch Peptonwasserzusatz auf die gewünschte Konzentration gebracht.

Es wurden nunmehr auf Kolleschalen Massenkulturen verschiedener Cholera- und Typhusstämme angelegt und nach 24 Stunden mit dem Darmpreßsaft abgespült, wobei auf je vier Kolleschalen immer je 10 ccm Darmpreßsaft verwendet wurden. Die Flüssigkeit, eingefüllt in enghalsige Röhren, wurde bei 36—37° durch wechselnde Zeiträume digeriert, nach beendeter Digestion von den gesenkten Bakterien abgehebert und durch Berkefeldfilter filtriert. Da selbst nach Hahn jedoch die Digestion mit Darmpreßsaft vor einer mit Kochsalzlösung durchgeführten Digestion, wie sie in ähnlicher, einfacher Weise zahlreiche andere Autoren versuchten, keinerlei Vorzüge gezeigt hat, benützte Hahn später ausschließlich die Kochsalzdigestion. Dieselbe dauerte in der Regel zwei Tage, da nach kürzerer Zeit, so nach 24 Stunden, der höchste Giftwert noch nicht erreicht war; eine über drei, vier und fünf Tage ausgedehnte Digestion hatte nur eine geringe Steigerung, dagegen eine zehn und vierzehn Tage dauernde eine erhebliche Steigerung der Giftigkeit zur Folge. Das benützte klare Filtrat war in der Regel in einer Dosis von 0,5—1,0 ccm für Meerschweinchen von 200 g bei subkutaner Injektion tödlich und lieferte neben den agglutinierenden und bakteriziden Immunseren auch ein an Pferden gewonnenes antitoxisches Präparat, von dem 0,025 ccm die tödliche Minimaldosis neutralisierten. Wichtig ist jedoch dabei die Feststellung Hahns, daß die Injektion von $^1/_4$—$^1/_2$ der tödlichen Typhusdosis gegen die zwei- bis dreifache tödliche Minimaldosis des Choleragiftes schützt und umgekehrt, so daß Hahn die erzielten Toxinwirkungen nach A. Wolff als nicht spezifische Wirkungen des körperfremden Bakterieneiweißes auffassen zu müssen glaubt.

Dem Wesen nach zu dem gleichen, einfachen Verfahren gelangten Brieger und seine Mitarbeiter bei der Darstellung wirksamer bakterizider Impfstoffe, nachdem sie zuvor ein komplizierteres Aussalzungs- und Extraktionsverfahren versucht hatten, das zu der Darstellung eines Typhusagglutinogens ohne schützende bakterizide Eigenschaften geführt haben soll. Brieger und Schütze bedienten sich dabei zunächst folgender, bei der Resistenz der Typhusagglutinogene und bei der Leichtigkeit, dieselben von den Bakterienleibern zu trennen, wohl etwas unnötig schleppender Technik, zumal da die einfache Verwendung von filtrierten Kochsalzagarextrakten und ihre Ausfällung mit Ammonsulfat, wie sie Pick zur Darstellung des Agglutinogens vor Brieger benützte, zu dem gleichen Ergebnis führt.

Möglichst virulente lebende Typhuskulturen werden mit sorgfältig neutralisiertem (nicht saurem) Ammonsulfat bis zu 100% gesättigt, die erzeugte Salzfällung wird ein bis vier Tage, eventuell drei bis vier Wochen in einem dunklen, nicht erwärmten Raume stehen gelassen und dann abfiltriert; der gut zwischen Filtrierpapier abgepresste Niederschlag wird dann in Wasser, dem einige Tropfen äußerst verdünnter Natronlauge zugesetzt sind, suspendiert und nun im Schüttelapparate behufs feiner Verteilung des Niederschlages eine halbe Stunde geschüttelt, eventuell mehrere Tage bei 37° mit schwach alkalischem Wasser extrahiert, wobei eine saure Reaktion sorgfältig vermieden werden muß. Hierauf wird die Flüssigkeit zentrifugiert und wiederholt durch gut ausgekochte Pukallfilter gejagt, wobei jedoch, ähnlich wie bei der Dialyse, ein Teil der wirksamen Substanz verloren geht. Dieselbe gibt die Millonsche Reaktion, ist durch Ammonsulfat aussalzbar, in Wasser leicht löslich, in Alkohol unlöslich und läßt sich im Vakuum trocknen. Aus den beim Abzentrifugieren erhaltenen Bakterien läßt sich die wirksame Substanz wiederholt extrahieren.

In ganz analoger Weise hat M. Mayer, ein Schüler Briegers, aus Choleravibrionen ein Extraktionspräparat gewonnen, welches jedoch im Gegensatze zum Typhusextrakte nur ein schwaches Agglutinogen, dagegen ein gutes bakterizides Antigen lieferte. Da sich Brieger und Mayer überzeugten, daß ein einfacher wässeriger Extrakt, der aus lebenden, in destilliertem Wasser suspendierten Cholerabazillen durch 6—48stündiges Schütteln bei 15° gewonnen und steril filtriert worden war, ganz ähnlich wirkte, verfahren diese Autoren, sowie Bassenge und Mayer auch bei der Darstellung der für praktische Zwecke anwendbaren Typhusimpfstoffe nunmehr in folgender Weise: 48stündige Typhusagarkulturen werden in 10 ccm Wasser suspendiert, sechs Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt und durch Pukallfilter filtriert; von einer Suspension, welche 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur geschüttelt wurde und die einer Bakterienmenge von ca. $^1/_{100}$—$^1/_{200}$ Öse entsprach, genügten bei intravenöser Injektion 0,005 ccm, um einen bakteriziden Titer von 0,004 ccm und ein Agglutinin in der Stärke von 1:160 zu erzeugen. Beim Menschen genügt eine einmalige Injektion, um den bakteriziden Titer des Serums derart zu steigern, daß 0,005—0,0001 ccm Serum ein Meerschweinchen von 200 g vor der 15—30fachen tödlichen Dosis lebender Kulturen schützen. Der Vorteil der nach dieser Methode dargestellten Präparate gegenüber den durch Extraktion bei 37° (durch sogenannte Autolyse) gewonnenen soll in der geringeren, für die Immunität belanglosen toxischen Wirkung, gegenüber dem von Pfeiffer und Kolle empfohlenen Impfstoff (abgetötete Agarkulturen) in der weniger heftigen Lokal- und Allgemeinreaktion liegen, da im letzteren Präparate beim Lagern durch autolytische Prozesse Spaltungen und Bildung toxisch wirkender Produkte vor sich gehen soll (s. Bischoff). Auch Schmidt, der für die Darstellung eines Impfstoffes gegen Schweinepest neben anderen das Briegersche Verfahren anwandte, empfiehlt dasselbe aus den angeführten Gründen und der einfachen Technik wegen.

Ein ganz analoges Verfahren haben Wassermann und Citron zur Darstellung der sogenannten „künstlichen Aggressine" benützt, die nichts anderes darstellen als Bakterienextrakte, welche durch Schütteln wässeriger oder eiweißhaltiger Bakterien-Suspensionen bei Zimmertemperatur gewonnen sind; nach Entfernung der lebenden Bakterien oder Abtötung derselben werden die keimfreien Flüssigkeiten an Stelle der natürlichen Aggressine Bails, mit denen sie alle Eigenschaften teilen sollen, verwendet.

Die Zahl derartiger künstlicher Aggressine, von denen Wassermann und seine Mitarbeiter solche bei der Schweineseuche, Schweinepest, Typhus, Hühnercholera, Wassermann und Kolle solche aus Meningokokken darstellten, ist eine große. Es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß kein Grund besteht, diese Präparate, welche auf Grund ihrer Darstellungsweise und soweit bisher bekannt ist, auf Grund ihrer Wirkungsweise mit den früher geschilderten Bakterienextrakten übereinstimmen, mit einem eigenen Namen zu belegen.

Anschließend sei noch das von E. P. Pick und v. Eisler und Berger geübte Extraktionsverfahren erwähnt, das sich bei der Darstellung toxischer Substanzen aus Staphylokokken, Typhus-, Dysenterie- (Stamm Kruse-Shiga und Flexner), wie auch aus Diphtherie- und Prodigiosuskulturen sehr gut bewährt hat und darin besteht, daß 24stündige Agarkulturen 24 Stunden mit 1 %iger NaCl-Lösung bei Bruttemperatur gehalten, zwei Stunden am Schüttelapparat bei Zimmertemperatur geschüttelt, hierauf auf 0,5 % Karbolsäure-Gehalt gebracht und durch Papierfilter klar filtriert werden. Die erhaltene Flüssigkeit wird durch Ammonsulfatsättigung ausgesalzen; der resultierende, gut zwischen Filtrierpapier zu trocknende Niederschlag, der die wirksame Substanz enthält, kann in beliebiger Konzentration in Wasser gelöst werden.

Eine von den vorhergehenden durch eine Modifikation sich unterscheidenden Methode, die im wesentlichen jedoch dieselben Resultate erzielt, wie die eben geschilderten, ist die Methode der Darstellung sog. „freier Receptoren“ von Neisser und Shiga und ist dadurch charakterisiert, daß sie eine Hitzerextraktion der Bakterien darstellt.

Bereits Buchner und Römer haben bei der Darstellung proteinhaltiger Bakterienextrakte sich der Hitzeextraktion bedient, indem sie auf festen Nährböden gewonnene Kulturmassen durch länger dauerndes Auskochen mit Wasser oder wochenlanges Stehenlassen der mehrmals aufgekochten Suspension im Brutschrank extrahierten; die erhaltenen Extrakte wurden durch Chamberland- oder Kieselgurfilter filtriert. Eine besonders gute Ausbeute an gelöstem Bakterienmateriale wird durch ein vorehriges scharfes Trocknen der feuchten Bakterienmasse vor dem Wasserzusatz erhalten; Buchner konnte auf diese Weise 50,89 % der angewendeten trockenen Masse des Bac. pyocyaneus in Lösung erhalten, wobei ca. $^4/_5$ der gelösten Substanz den Proteinstoffen zugehörten. Die so erhaltenen Produkte zeichnen sich durch ihre auf subkutane Injektion eintretende exquisite positiv chemotaktische Wirkung aus im Gegensatze zu den früher erwähnten Bakterienextrakten, so z. B. den Bailschen Aggressinen und den von Wassermann und Citron untersuchten Präparaten, die eine leukocytenabhaltende Wirkung besitzen.

Neisser und Shiga gingen bei der Darstellung der Antigene folgendermaßen vor. In Kochsalz aufgeschwemmte Typhus- und Dysenteriebazillen werden eine Stunde auf 60° erhitzt und die Emulsion wird nach einiger Zeit durch Reichelkerzen filtriert; das Filtrat in dem auf Grund durchgeführter Bindungsversuche „freie Receptoren“ angenommen werden, ist sowohl bei der Agglutininbildung, als auch bei der Bildung bakterizider Substanzen im Tierkörper immunisatorisch wirksam. Eine Vorbehandlung der Kulturen auf 75° statt auf 60° schwächt die Lysinbildung. Auf diese Weise gelang es auch Neisser und Shiga aus Dysenteriebazillen ein lösliches, durch Alkoholäther fällbares Toxin zu extrahieren, das bei 75° stark abgeschwächt wurde und Shiga verwendete ein Präparat, das aus Typhusbazillen auf Grund derselben Darstellungsweise gewonnen

war — eintägige Agarkultur in 5 ccm Kochsalz aufgeschwemmt, eine Stunde bei 60°, dann zwei Tage bei 37° erwärmt, durch Reichelkerzen filtriert und mit Phenol zu 0,5% versetzt — in Mengen von 0,25 bis 0,5 ccm zur Injektion behufs aktiver Immunisierung von Menschen gegen Typhus. Der Vorteil der so gewonnenen Präparate ist ihre leichte Resorbierkeit und, wie BERTARELLI in einer Nachprüfung der NEISSER-SHIGAschen Befunde bei der Cholera und dem Typhus hervorhebt, die Anwendung eines sicher sterilen Materiales, das frei von nutzlosen oder schädlichen Bakterienbestandteilen ist. Der Nachteil läge in der Notwendigkeit, relativ große Mengen eines nicht rasch präparierbaren Materiales zur Erzielung eines hohen Agglutinationstiters anzuwenden, dessen Herstellungskosten ziemlich hohe wären.

BERTARELLI verfuhr bei der Darstellung der Antigene aus Typhusbazillen in der Weise, daß er dieselben in Flaschen auf Agar 12 bis 24 Stunden bei 37° wachsen ließ, hierauf eine passende Quantität physiologischer Kochsalzlösung zusetzte und solange schüttelte, bis sich die Kulturpatina in eine Emulsion verwandelt hatte. Nun wurden die Keime in einem auf 60° eingestellten Wasserbade abgetötet, hierauf bei 37° zwei Tage lang gehalten, worauf die Flüssigkeit durch Chamberlandkerzen „F" filtriert und das klare Filtrat auf dem 60° Wasserbade auf ein geringes Volumen reduziert wurde. Diese so erhaltene Flüssigkeit wurde endlich im Vakuumexsikator über Calciumchlorid*) eingetrocknet. Die Lösung eines derartigen Pulvers wirkt nach einer bei niedriger Temperatur 24 Stunden lang in einem zylindrischen Cellulosedialysator durchgeführten Dialyse stark agglutinogen, ist stickstoffhaltig, durch Magnesiumsulfatsättigung aussalzbar und zeichnet sich durch einen reichen Phosphorgehalt aus, der nach BERTARELLI für eine Zugehörigkeit dieser Produkte zu den Nukleinen spricht.

Auch WASSERMANN benutzte bei der Darstellung seines Impfpulvers wie NEISSER und SHIGA die keimfreien Filtrate, welche im Vakuumapparate bei 35° zu einem festen Rückstand eingeengt und pulverisiert wurden; das erhaltene sterile Pulver soll nur eine geringe Menge entzündungserregender Leibesbestand teile erhalten, gut dosierbar und lange Zeit haltbar sein. R. P. STRONG hat endlich die gleiche Methode angewendet, indem er abgetötete Cholera-Spirillen extrahieren ließ und durch die Einspritzung der „freien Receptoren" Sera von bakteriziden und agglutinierenden Eigenschaften erhielt; bei der Anwendung derartiger Antigene am Menschen sind keine lokalen Störungen beobachtet worden.

Eine andere Methode, die jedoch ebenfalls nur als eine Modifikation der früheren aufgefaßt werden kann, ist die neueste von BESREDKA geübte Darstellung der löslichen „Endotoxine" des Typhus-**), Pest- und Dysenteriebazillus. Die Technik des Verfahrens ist folgende: Junge Gelatinekulturen (für Typhus und Dysenterie am besten 16 bis 18stündige, für Pest 48stündige) werden in 0,75%iger Kochsalzlösung gelöst, auf 60° eine Stunde lang erhitzt und dann im Vakuum getrocknet; eine bestimmte Menge (1 g) der trockenen Bakterien wird mit festem Salz (0,3—0,45 g) gemischt und im Achatmörser zu einem höchst feinen Pulver zerrieben, eine Operation, welche ca. 1 Stunde in Anspruch nimmt. Ohne das Pistill zu lüften wird Tropfen für Tropfen 1—2 ccm destillierten Wassers zugesetzt, in welchem sich das Salz rasch löst, so daß eine mit konzentrierter Kochsalzlösung durchtränkte Bakterien-

*) Im Original wohl irrtümlich Kaliumchlorid.

**) Siehe v. STENITZER pag. 196.

paste resultiert. Man gießt nunmehr diese Emulsion in eine Eprouvette über, fügt soviel Wasser zu, als nötig ist, die Konzentration physiologischer Kochsalzlösung zu erreichen, schüttelt die so erhaltene Flüssigkeit mehrmals kräftig durch und läßt zwei Tage absetzen, resp. zentrifugiert zur völligen Entfernung der Bakterien; am Boden sammeln sich die ungiftigen Bakterien, und die durchscheinende oder opalescente Flüssigkeit enthält das lösliche Endotoxin. Da das Typhusendotoxin eine Temperatur bis 120° verträgt, kann bei der Darstellung desselben die Bakterienemulsion während zweier Stunden auf 60—62° im Wasserbade erhitzt werden und es genügt 10—12stündiges Stehenlassen, um nach Absetzung der Bakterien eine giftige bakterienfreie Flüssigkeit zu erhalten; bei Pest- und Dysenteriebazillen ist ein längeres Erhitzen wegen der Hitzeempfindlichkeit dieser Toxine zu vermeiden.

Organsäfte als Extraktionsmittel bakterieller Antigene wurden ebenfalls von verschiedenen Autoren benützt, wiewohl der Salzgehalt der Kulturflüssigkeit an sich oder des Extraktionsmittels eine wesentliche Rolle bei dem Erfolg der Methode zu spielen scheint. So verfuhr Besredka bei der ursprünglichen Darstellung der sogenannten Endotoxine des Typhus und der Pest in der Weise, daß er u. a. normales Pferdeserum als Extraktionsmittel verwandte. Das in der vorher beschriebenen Weise nach dem Erhitzen im Wasserbade durch Eindampfen im Vakuum gewonnene Typhus- oder Pestbakterienpulver wurde in bestimmter Menge mit physiologischer Salzlösung und Serum versetzt (z. B. 0,15 g Bazillen, 2 ccm Kochsalzlösung und 8 ccm Serum), $1^1/_2$—2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und hierauf zentrifugiert. Die zentrifugierten Bazillen sind wenig oder überhaupt nicht toxisch, das überstehende Flüssigkeitsgemisch enthält das gelöste, zur Gewinnung eines „Antiendotoxin“ befähigte Endotoxin.

Auch Wassermann und Citron bedienten sich bei der Darstellung ihrer als „künstliche Aggressine“ bezeichneten Bakterienextrakte neben Wasser auch des Serums und tierischer, durch Aleuronateinspritzung erzeugter Exsudate als Extraktionsmittel. Zu erwähnen bleibt, daß auch die Anwendung proteolytischer Fermente zum Aufschließen der Bakterien versucht worden war, freilich mit geringem Erfolge, da diese zumeist die in Betracht kommenden toxischen Bakterienantigene schwer schädigen, wenn nicht vernichten. Nach Gamaleia sind peptische Fermente imstande die Bazillenleiber aufzulösen, ein Vorgang, welchen Gamaleia als Bakteriolyse bezeichnet. Er erhielt durch Einwirkung auf tuberkulösen Eiter eine Auflösung von Tuberkelbazillen, aus der er durch Fällen mit Essigsäure und Lösen des Niederschlages in alkalischem Wasser das tuberkulöse Bakteriolysin erhielt. Nach Baldwin und Levene werden Tuberkelbazillen durch Pepsin, Papayotin und Trypsin verdaut; das Tuberkulin wird durch längere Trypsinverdauung unwirksam, während längere Pepsinverdauung dasselbe nicht ganz zu zerstören vermochte, was nach diesen Autoren für eine einem Neucleoproteid analoge Zusammensetzung des Tuberkulins spricht. So empfindlich auch die verschiedenen toxischen Bakterienprodukte gegen fremde proteolytische Fermente sind, so wenig scheinen dieselben von den häufig äußerst wirksamen, in den eigenen Kulturflüssigkeiten vorhandenen Nukleasen und anderen proteolytischen Fermenten angegriffen zu werden, eine Tatsache, die nicht allein großes theoretisches Interesse, sondern auch praktische Bedeutung mir zu besitzen scheint*).

---

*) Nach einer jüngst erfolgten Mitteilung versuchte Matthes mit Erfolg durch Verdauung der Typhusbazillen wirksame Typhusantigene zu erhalten.

3. Extraktion durch Alkalien.

Als erster hatte Nencki 1879 bei der Darstellung seines Mykoproteins die alkalischen Lösungen angewandt, um den größten Teil der Zelleiber lösen zu können. Er war damals nicht von reinem Materiale ausgegangen, sondern verwendete Kulturen, welche er durch Überimpfen von faulendem Pankreas auf wässerige Gelatine gewann. Die Bakterienhaut wird mit einem feinmaschigen Messingdrahtlöffel abgehoben und die mit Alkohol und Äther extrahierten, eine weißlichgraue etwas verfilzte Materie darstellenden Bakterien werden mit 0,5 %iger Kalilauge auf dem Wasserbade digeriert, wobei sie sich zum größten Teile lösen; die unlösliche Masse wird von den Zellmembranen gebildet. Aus der alkalischen Lösung kann durch Übersättigen mit Salzsäure oder durch konzentrierte Kochsalzlösung oder am besten durch Eintragen von kristallisiertem Steinsalz in die schwach saure Lösung bis zur Sättigung ein Eiweißkörper ausgefällt werden, den eben Nencki als Mykoprotein bezeichnet. In gleicher Weise hat Buchner 1890 aus verschiedenen Bakterien das „Alkaliprotein" dargestellt, wobei er bereits feste Nährböden (Agar und Kartoffel) verwendete; die abgeschabte Masse wurde zunächst mit 0,5 % Kalilauge verrieben, der sich dabei bildende zähe Schleim durch Digestion auf dem Wasserbade verflüssigt und das nach wiederholtem Filtrieren erhaltene schließliche Filtrat mit verdünnter Essigsäure oder Salzsäure ausgefällt. Der auf dem Filter ausgewaschene Niederschlag löst sich leicht in Wasser, dem einige Tropfen Sodalösung zugefügt sind. Von biologischen Eigenschaften dieses Buchnerschen Alkaliproteins, das chemisch den Pflanzenkaseinen am nächsten stand, war insbesondere die intensive chemotaktische Wirkung des Näheren studiert, die Buchner der chemischen Substanz resp. dem Eiweiß der Bakterienzelle selbst und nicht deren Stoffwechselprodukten zusprach. Die Spezifizität irgendeiner Giftwirkung, sofern sie durch das etwas eingreifende Verfahren nicht zerstört worden war, hatte keinerlei besondere Beachtung gefunden.

Erst Lustig und Galeotti haben das alte Nencki-Buchnersche Verfahren zur Darstellung spezifischer Antigene aus Pestkulturen benützt und mit ihrem Impfstoff, wie auch neuerdings die Untersuchungen von Tavel, Krumbein und Glücksmann und Schmitz zeigen, ein praktisch gut verwertbares Mittel geschaffen, das sowohl präventive, wie auch kurative Eigenschaften dem Serum der damit behandelten Versuchstiere verleiht. Der Impfstoff nach Lustig und Galeotti wird derart hergestellt, daß die von 3—4 Tage alten, bei 30° gehaltenen Agarkulturen abgeschabte, feuchte Bakterienmasse mit 0,75—1 %iger sterilisierter Kalilauge (auf den Inhalt von 5—6 großen Agardoppelschalen werden 100 cmm verwendet) 12—24 Stunden bei 10—12° C digeriert, und die geleeartige Masse mit 0,5 %iger Essigsäure oder mit Ammonsulfat ausgefällt wird; der erhaltene Niederschlag wird auf einem Papierfilter gesammelt, mit sterilem Wasser bis zum Verschwinden der saueren Reaktion im Filtrate gewaschen, auf Schalen im Vakuum getrocknet und pulverisiert. Das resultierende Produkt, welches nach Galeotti ein Nukleoproteid darstellt, löst sich bequem in 1 %iger Sodalösung und 2—3 mg desselben liefern die für den Erwachsenen normale Impfdosis, während 1,1 mg für 100 g Körpergewicht pestempfindlicher Tiere die Giftdosis bildet.

Dasselbe Verfahren wurde nahezu unverändert für eine Reihe von anderen bakteriellen Antigenen verwendet. Zunächst hatte Galeotti selbst aus einer Reihe von Bakterien solche Nukleoproteide dargestellt und insbesondere dasjenige aus Reinkulturen des Bac. ranicidus chemisch genauer studiert. Das in der beschriebenen Weise erhaltene Nukleoproteid wurde durch wiederholtes Lösen in Ammoniak, Filtrieren und Fällen mit Säure gereinigt und lieferte bei der Verdauung mit künstlichem Magensaft ein Pepton und einen unlöslichen P-haltigen Rückstand, dessen Spaltung Nukleinbasen ergab. Der N-Gehalt betrug 12—12,1 %, der P-Gehalt 1,01—1,6 %. Der Körper hatte immunisierende Eigenschaften.

Ferner wurde die Methode verwendet für die Darstellung eines Milzbrandnukleoproteids von Tiberti, für ein Diphtherievaccin von Bandi und Gagnoni, für ein Choleranukleoproteid von O. Heller, E. Blell und Schmitz und endlich zur Darstellung von zwei aktiv wirkenden Nukleoproteiden aus dem Bacter. coli von Carega. Tiberti verfährt derart, daß er asporogenen Milzbrand in 3 %iger Kalilauge zerreibt und die Suspension 3—4 Tage bei 25° digeriert und mit verdünnter Essigsäure die immunisierende Substanz ausfällt, Bandi und Gagnoni macerierten Agarkulturen mit physiologischer Kochsalzlösung, welcher 0,25 % kohlensaures Natron beigegeben war bei 55° und Blell bereitete sein Nukleoprotoid genau nach der eben beschriebenen Lustig-Galeottischen Methode. Der von ihm erhaltene Körper ist unlöslich in Wasser, Säuren, Alkohol und Äther, leichtlöslich in Alkalien und gibt sowohl intensive Pentosen als auch Phosphorreaktion; zum Gebrauche wird jedesmal eine 1 %ige Choleranukleoproteidlösung in 1 %iger Sodalösung dargestellt und der Haltbarkeit wegen mit Karbolsäure bis zu einem Gehalt von 0,5 % versetzt. Die Giftigkeit dieses sogenannten Vaccins beträgt soviel, daß 0,03 g des trockenen Präparates intraperitoneal ein Meerschweinchen von 300 g in 24 Stunden töten, während Dosen von 0,01—0,1 g von Kaninchen reaktionslos vertragen werden. Methodisches Interesse beanspruchen die Angaben von Blell über die zeitliche Einwirkung 1 %iger Kalilauge auf Choleravibrionen: Nach fünf Minuten sind die Vibrionen bereits abgetötet und zum größten Teil aufgequollen; nach 30 Minuten sind intakte Vibrionen überhaupt nicht mehr nachweisbar und nach 1 Stunde hat sich die völlige Auflösung vollzogen, so daß mit Sicherheit angenommen werden kann, daß bei der Darstellung im Großen, wo die Lauge nunmehr 2—3 Stunden auf die Bakterien einwirkt, intakte Bakterienleiber nicht mehr vorhanden sind, die etwa die Träger der spezifischen Wirkung des erzeugten Niederschlages sein könnten.

Eine besondere Methode Antigene aus Kolibazillen darzustellen, haben Wheeler und Vaughan angewendet, indem sie dieselben durch Behandlung mit einer verdünnten Lösung von Natriumhydrat in absolutem Alkohol in eine toxische, lösliche und eine ungiftige, in dem Spaltungsmittel unlösliche Substanz zerlegten; von diesen erzeugte nach Vaughan insbesondere die nicht toxische bei Kaninchen und Meerschweinchen eine gegen Kolibazillen gerichtete spezifische Immunität, jedoch keine gegen die isolierte toxische Komponente. Die mit der letzteren erzielte Immunität war gering und der durch Injektion gewisser Eiweiß- und Peptonspaltungsprodukte erzeugten Resistenz vergleichbar.

Alkalien wurden zu wiederholten Malen verwendet, um aus Tuberkelbazillen, sei es Gifte, sei es wirksame Antigene darzustellen. In größeren Mengen verarbeitete zuerst Th. Weyl — er ging von 600 Glyzerinagar-

kulturen aus — auf diese Weise Tuberkelbazillen. Die abgekratzten, getrockneten Bazillen wurden mit warmer, verdünnter Natronlauge behandelt und hierbei schleimige Lösungen erhalten, welche sich in zwei Schichten abschieden. Die obere, gallertige Schichte löste sich in verdünnter Natronlauge, aus welcher Lösung mit Essigsäure ein im Überschusse unlöslicher Körper ausfiel, der N, C, H, S und P enthielt, gegen Säuren sehr resistent war und mit Millons Reagens Gelbfärbung gab; beim Kochen mit verdünnten Säuren entstand keine reduzierende Substanz. Wegen der sehr starken giftigen Wirkung (0,1—0,2 mg riefen bei Mäusen lokale Nekrosen hervor) und der Unlöslichkeit in überschüssigen Säuren nannte WEYL sein Produkt Toxomucin. Indes haben spätere Untersuchungen RUPPELS ergeben, daß dieses Toxomucin WEYLS, die mit Essigsäure aus den Alkali-Extrakten der Tuberkelbazillen fällbare Substanz, nicht zu der Klasse der Mucine gehört, obwohl sie nach RUPPEL beim Erwärmen mit Salzsäure reduzierende Substanz liefert, sondern sie steht, wie aus ihrem P-Gehalt bereits hervorgeht, den Nukleoproteiden nahe und stellt wahrscheinlich ein Gemenge von Nukleoprotamin und anderen Nukleinderivaten dar. Extrahiert man, wie RUPPEL, die getrockneten intakten Tuberkelbazillen mit 0,5—1 %iger Sodalösung in der Kälte so kann man ihnen etwa 15 % des Gesamtgewichtes entziehen und erhält gleichfalls schleimige, fadenziehende, mucinähnliche Lösungen, in welchen Essigsäure einen mit dem von WEYL erhaltenen, identischen Niederschlag erzeugt. Das Filtrat enthält neben geringen Mengen von Nukleinsäure eine schleimige Substanz, die keine Eiweißreaktion gibt, beim Kochen mit Mineralsäuren ein Kohlehydrat abspaltet und von RUPPEL zu der Klasse der Pflanzenschleime gerechnet wird; ähnliche eiweißarme Produkte soll auch die Extraktion mit siedendem Wasser und mit 2—5 %igen Glyzerin aus intakten Tuberkelbazillen liefern. Ganz ähnliche Produkte, wie WEYL und RUPPEL hat auch TATSUSABURO YABÉ auf dieselbe Weise dargestellt. Das von ihm durch Sodaextraktion gewonnene Tuberkulomykoprotein soll das wahre Tuberkulosetoxin darstellen, während ein zweites, aus den mit verdünnter Sodalösung in der Kälte erschöpften Bazillen durch mehrtägige Extraktion mit Schweitzers Reagens (frisch bereitete, ammoniakalische Kupferhydratlösung) gewonnenes Produkt, das als Tuberkulobaktericidin bezeichnet wurde und wahrscheinlich mit RUPPELS Tuberkulinsäure identisch ist, hervorragende immunisierende Eigenschaften aufweisen soll. Nach RUPPEL ist man übrigens imstande durch Extraktion mit Ammoniak allein annähernd die gleiche Menge löslicher Produkte aus Tuberkelbazillen zu erhalten, wie durch Behandlung mit Schweitzers Reagens. In die gleiche Gruppe von Produkten scheinen auch die Körper zu gehören, welche H. v HOFMANN aus den Tuberkelbazillen nach folgendem Verfahren gewonnen hatte. Vier Monate alte Tuberkelbazillenagarkulturen wurden mit kaltem Wasser, dann mit 1 ‰iger Salzsäure und hierauf mit 2 ‰ Kalilauge zunächst 8 Tage in der Kälte, dann durch 36 Stunden in der Siedehitze behandelt; auf diese Weise konnten ca. 23 % des Ausgangsmaterials in Lösung gebracht werden, davon die Hälfte etwa erst durch Kochen mit Kalilauge. Auch hier zeigte der durch Neutralisation des alkalischen Auszuges erhaltene Eiweißkörper am besten die Eigenschaften des Kochschen Tuberkulins, während das durch Kochen mit Lauge gewonnene Produkt weniger wirksam erschien.

Die Untersuchungen KOCHS ergeben, daß aus den Tuberkelbazillen mit starken Alkalien in der Siedehitze, in ähnlicher Weise wie mit Säuren,

zwar resorbierbare Produkte zu gewinnen sind, die jedoch keine immunisierenden Eigenschaften besitzen. Dagegen bewährte sich nach Koch recht gut die Behandlung der Tuberkelbazillen mit $\frac{N}{10}$ Natronlauge, die er 3 Tage lang bei Zimmertemperatur auf dieselben einwirken ließ. Dadurch erhält man nach dem Abfiltrieren der ungelöst gebliebenen Massen und nach Neutralisation des Filtrats eine schwach gelbliche Flüssigkeit, das Präparat „TA“, das Koch jedoch deswegen nicht zur praktischen Verwendung heranzog, weil in der Flüssigkeit vereinzelte, wenn auch abgetötete Tuberkelbazillen enthalten waren, welche nach seiner Meinung bei Darreichung der Substanz in größeren Dosen sterile Abszesse erzeugen. Endlich giebt Aronson an, daß getrockneten Tuberkelbazillen giftige Substanzen durch Kochen derselben mit $^1/_{10}$—$^1/_{50}$ N Natronlauge unter Druck bei einer Temperatur bis zu 130° entzogen werden können.

4. Darstellung der Antigene durch Säuredigestion.

Es wurde bereits erwähnt, daß manche Autoren sich zur Darstellung wirksamer Antigene auch der Extraktion der Bakterien mittels Säuren bedienten; so behandelte bereits v. Hofmann Tuberkelbazillen mit 1 ‰ Salzsäure vor ihrer Extraktion mit Alkalien. Indes eignen sich gerade die Säuren nur schlecht als Extraktionsmittel der eiweißartigen Antigene. Dagegen wurde die Digestion mit Säuren als Aufspaltungsmittel der Bakterien, resp. der aus ihnen extrahierten Stoffe behufs leichterer Gewinnung chemisch reiner Antigene angewendet. Hierher gehört die von Ruppel ausgeführte Ausfällung der wässrigen Extrakte der getrockneten und zerriebenen Tuberkelbazillen des Kochschen Präparates TO mit Essigsäure und Spaltung dieses Niederschlags mit 1 %iger Schwefelsäure zur Darstellung des Tuberculosamins, und einer Nukleinsäure, der Tuberkulonukleinsäure oder Tuberkulinsäure, welche nach Behrings in Gemeinschaft mit Kitaschima ausgeführten Untersuchungen $3^1/_2$—4 mal die spezifische Giftigkeit des Kochschen Tuberkulins übertrifft. Die Reindarstellung der Ruppelschen Produkte wird im 2. Teile dieser Abhandlung ausführlich besprochen.

In letzter Zeit haben zur Aufspaltung der Bakterien vor ihrer Extraktion P. Bergell und Fr. Meyer die wasserfreie flüssige Salzsäure, welche bei —86° siedet, angewendet, ein Reagens, das bei der eiweißartigen Natur der Toxine und ihrer Empfindlichkeit bei gewöhnlichen Temperaturen am wenigsten eingreifend schien. Es kann jedoch vorläufig nicht gesagt werden, ob die Erfolge bei der Anwendung des auf diese Weise gewonnenen Antigens bessere oder andersartige sind, als bei den durch einfache Extraktion ohne vorhergehende Säurebehandlung erhaltenen Antigenpräparaten. Bemerkenswert bleibt bezüglich der physiologischen Wirkung der auf diese Weise behandelten Körper, daß sie selbst in Dosen von 0,5 cm für Mäuse, von 5 cm für Meerschweinchen und von 10 cm für Kaninchen bei intraperitonealer Injektion ungiftig waren und nur eine starke leukocytäre Reaktion hervorriefen, bei intravenöser Injektion von $^1/_2$—10 ccm bei Kaninchen rasch vorübergehende Temperatursteigerungen von 1—$1^1/_2$° zur Folge hatten. Immunisierungsversuche ergaben sowohl einen hohen agglutinierenden, wie auch baktericiden Titer, so daß zu ersehen ist, daß diese beiden Komponenten durch die Behandlung der Bakterien mit flüssiger wasserfreier Salzsäure unter den ge-

gebenen Versuchsbedingungen nicht zerstört werden. Die von den Autoren eingeschlagene Methodik, welche zunächst an Typhusbazillen ausprobiert worden war, gestaltete sich folgendermaßen: zweitägige Ascitesagarmassenkulturen eines virulenten Typhusstammes werden mit einem sterilen, äußerst weichen Haarpinsel abgewaschen; diese Bakterienaufschwemmung wird in Kochsalzlösung in hohen Standgefäßen sedimentieren gelassen, dann ca. $^1/_2$ Stunde auf einer Zentrifuge von 2000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert, gut mit physiologischer Kochsalzlösung auf der Zentrifuge gewaschen und das Sediment endlich im Vakuum unter 40° getrocknet. Diese Masse nun wird mit gut getrockneter, wasserfreier Salzsäure, welche mittels flüssiger Luft kondensiert worden war, behandelt*). Das flüssige Gas wird unter Vermeidung von Wasserzutritt völlig verdampft, der Rückstand mit physiologischer Kochsalzlösung auf der Schüttelmaschine gut extrahiert und durch Berkefeldfilter steril filtriert. Das klare Filtrat stellt nun das spezifische Antigenpräparat dar. A. Wolff-Eisner hat auf Grund der Methode von Bergell und Meyer Tetanustoxin mit wasserfreier Salzsäure bei der Temperatur der flüssigen Luft zu digerieren versucht; während von dem Ausgangsmaterial 1 ccm einer Verdünnung von 1 : 1 000 000 eine Maus von 16 g schon am 2. Tage tötete, hat das der Hydrolyse nach Bergell und Meyer unterworfene Toxin die merkwürdige Eigenschaft aufgewiesen, daß es seine tödliche Wirkung verlor, während es seine tetanuserzeugende Wirkung vollkommen beibehalten hatte. Dabei soll es sich nach Wolff nicht um eine einfache Abschwächung des Toxins handeln, da konzentrierte und verdünnte Lösungen die gleiche Wirkung zeigen; das modifizierte Toxin verliert jedoch in wäßriger Lösung durch weiteren Abbau innerhalb 6—14 Tagen selbst im Eisschrank auch seine krampferregende Wirkung. Wolff ersieht aus seinen Versuchen die Tatsache, daß es beim Tetanustoxin möglich ist, die todbringende Wirkung von der krampferregenden zu trennen.

5. Extraktion mit Alkohol, Äther, Chloroform u. dgl.

Sind durch die bisher angeführten Extraktionsmittel vorzüglich eiweißhaltige wirksame bakterielle Antigene erzielt worden, so ist es ebenso charakteristisch, daß wohl kein wirkliches Bakterienantigen bekannt ist, das durch einwandsfreie Alkohol-, Äther-, Chloroform-, Benzol-Extraktion oder analoge Extraktionsmittel gewonnen worden wäre, wiewohl es möglich erscheint, daß infolge des Überganges gewisser indifferenter Körper z. B. der Lipoide in das Lösungsmittel auch die Löslichkeit des an sich unlöslichen Antigens bedingt werden könnte, wie wir das bei den chloroformlöslichen Lecithiden und wohl auch bei den ätherlöslichen lysinogenen Substanzen, die nach Landsteiner und v. Eisler, sowie Bang und Forsmann aus den roten Blutkörperchen zu extrahieren sind, anzunehmen geneigt sind. Die Angaben über die mit den genannten Lösungsmitteln extrahierbaren bakteriellen Antigene sind äußerst spärlich. So hatte z. B. Nicolle gefunden, daß die „agglutinierende“ Substanz junger Typhus- und Kolibazillen sowohl in absolutem Alkohol, wie auch in Äther löslich ist und E. P. Pick konnte von seinem Koagulin K die Alkohollöslichkeit feststellen; indes gelang es dem Letzteren nicht, mit Hilfe dieser alkohollöslichen Substanz ein wirksames Immunserum herzustellen, während ein nicht mit Alkohol vorbehandeltes Kochsalzextrakt

*) Die nähere Angabe der Behandlungsdauer ist im Originale nicht angegeben.

junger Typhuskulturen rasch dem Serum des damit geimpften Tieres einen Agglutinationstiter von 1:200 verlieh; auch Winterberg vermochte nur mit der alkoholfällbaren Substanz alter Typhusbouillonkulturen eine Immunität zu erzielen. Die Behandlung des alkohollöslichen Koagulins K (Pick) mit Äther beraubte dieses sogar seiner agglutinierenden Eigenschaften. Friedberger und Moreschi gaben analogerweise an, daß bei Abtötung der Cholerabazillen mit Chloroform zwar die lysinogenen Gruppen nur unbedeutend geschädigt, dagegen die agglutinogenen vernichtet würden und erst eine nachträgliche Autolyse aktiviere die agglutinogenen Eigenschaften. Es ist selbstverständlich, daß gerade die Möglichkeit der Darstellung resp. Reinigung der bakteriellen Antigene mit den hier erwähnten Lösungsmitteln von großer methodischer Bedeutung für die genauere Erkenntnis dieser Körper wäre und die bisherigen negativen Resultate scheinen in der Tat darauf hinzuweisen, daß die bakteriellen Antigene nicht zu den Körpern gehören, für welche die genannten Extraktionsmittel charakteristisch sind.

Des methodischen Interesses wegen sei hier noch auf einige Körper hingewiesen, die als alkohollösliche bakterielle Gifte erscheinen, ohne indes vorläufig Antigencharakter beanspruchen zu können. Hierher gehört u. a. die große Zahl der mit den zu besprechenden Ptomaindarstellungsmethoden isolierten Gifte, das Sepsin Fausts und einige insbesondere von italienischen und französischen Autoren aus verschiedenen Bakterien dargestellte giftige Produkte, welche der Vollständigkeit wegen hier Platz finden sollen. So hat Sciolla aus dem Tuberkelbazillus mit Äther ein Nervengift und aus der wässerigen Lösung des Kochschen Tuberkulins einen Stoff ausgezogen, der dem Tuberkulin entgegengesetzt wirkend, die Temperatur herabsetzt und intravenös appliziert Krämpfe erzeugt; das mit Äther behandelte Tuberkulin behält jedoch unverändert seine spezifische Wirkung bei. Auch Hammerschlag fand im Alkoholätherextrakt der Tuberkelbazillen Substanzen, die Kaninchen injiziert Konvulsionen hervorriefen. Carnevale unterscheidet bei den Extrakten verschiedener pathogenen und nicht pathogenen Bakterien die lokale und die allgemeine Wirkung, wobei die lokale in einfacher Leukocyteninfiltration, Abszedierung und Nekrose, die allgemeine in Gewichtsabnahme, Abmagerung und Temperatursteigerung bestehen soll. Während nun wässerige Bakterienextrakte die geringste lokale und allgemeine Wirkung, die alkalischen eine etwas stärkere besitzen sollen, äußern diesem Autor zufolge die äther-alkoholischen Extrakte noch stärkere Wirkungen. Auclair hat aus Bouillonkulturen von Typhus, Streptokokken, Staphylokokken, Gonokokken, Bac. Friedländer, Pneumokokken, Diphtheriebazillen und Actinomyces, nachdem dieselben 5 Minuten auf 100° erhitzt worden waren, die Bazillenleiber abfiltriert und während 24—48 Stunden mit Äther oder Chloroform extrahiert; die erhaltenen Extrakte durch Porzellanfilter filtriert und subkutan intratracheal Versuchstieren eingespritzt, sollen für die betreffenden Bakterien charakteristische lokale Verletzungen hervorbringen, so daß auch Auclair glaubt, daß neben den löslichen Produkten pathogenen Mikroben, von welchen die Allgemeinerscheinungen der Infektionskrankheiten ausgehen, es Gifte gibt, welche den Mikroben anhaften, im Kulturmedium unlöslich, im Äther zum Teile löslich sind, welche die Ursache der spezifischen lokalen Reaktionen sind. In ähnlicher Weise wurden aus Tuberkelbazillen lokal wirkende Gifte isoliert. Der Ätherextrakt derselben soll beim Hunde die plastische tuberkulöse

Meningitis erzeugen und soll dasjenige Gift darstellen, welches die Verkäsung herbeiführt (AUCLAIRS kaseifizierendes Gift), während der Chloroformextrakt das sklerosierende Gift enthalten soll; ähnliche Produkte können auch durch Digestion mit Xylol und Benzin aus den Tuberkelbazillen gewonnen werden (ARMAND-DELILLE, P. RADIGUER, LEON BERNARD und M. SALOMON). Diese toxischen Produkte, die zu den fettähnlichen Körpern oder Wachsen gehören, sollen sich namentlich dann bilden, wenn sich die Bazillen langsam entwickeln. Auch C. STERNBERG konnte aus durch eine halbe Stunde im strömenden Dampfe sterilisierten Tuberkelbazillen durch Extraktion mit Alkohol, Äther und Chloroform eine toxische Substanz gewinnen, welche bei Meerschweinchen und Kaninchen die pathogene Wirkung (Tuberkelknötchen und Tod) lebender Tuberkelbazillen zu erzeugen vermochte. Bemerkenswert bleibt es, daß nach BEHRING gerade der nach sukzesiver Extraktion mit Wasser, 10%iger Kochsalzlösung und Alkohol, Äther zurückbleibende amorphe, keine lebenden Bazillen mehr enthaltende Rückstand, noch Tuberkel hervorzurufen imstande ist, die allerdings zu keiner Verkäsung und Erweichung führen. In jüngster Zeit hat übrigens METALNIKOFF auf Grund der Beobachtung, daß die Raupe der Bienenmotte, Galeria melonella, durch Lösen der Wachshüllen der Tuberkelbazillen diese zu zerstören imstande ist, mit Tuberkulosewachs Meerschweinchen immunisiert, um eine die Hüllen der Tuberkelbazillen lösende Lipase zu erzeugen. Auch aus Milzbrandbazillen versuchte man durch Extraktion mit Alkohol Gifte zu gewinnen. MARMIER gibt an, daß aus den Milzbrandbakterien beim Behandeln mit 20%igem Alkohol ein Extrakt zu gewinnen ist, in welchem ein Milzbrandtoxin enthalten sei, und mit welchem man in steigenden Giftdosen immunisieren könne. BOIDIN versuchte aus Milzbrandbazillen, wie AUCLAIR aus Tuberkelbazillen, durch Äther und Chloroform giftige Fettstoffe zu gewinnen; dieselben sollen, in das Unterhautzellgewebe eingespritzt, dieselbe lokale Reaktion hervorrufen, wie tote Milzbrandbazillen.

Endlich wollen in letzter Zeit zwei türkische Forscher, DEYCKE PASCHA und RESCHAD BEY, in einem krystallisierbaren Fettkörper, Nastin genannt, welcher aus der Leibessubstanz einer aus einem schweren Leprafall gezüchteten Streptothrixart durch Ätherextraktion im Soxhlet dargestellt worden war, ein Antigen gefunden haben, das insbesondere lepröse Prozesse in ihrem Verlaufe begünstigen soll. Die Versuche, aus Tuberkelbazillen eine dem Nastin analoge Substanz zu isolieren, mißlangen. Dagegen konnten mit Streptotrixnastin Kaninchen und Meerschweinchen gegen lebende Tuberkelbazillen geschützt werden.

Anhangsweise sei hier noch ein Verfahren von BUCHNER und GRUBER zur Darstellung des Protoplasma aus Hefe erwähnt, das möglicherweise auch bei der Darstellung von Antigenen aus Bakterien in bestimmten Fällen Anwendung finden könnte. Während die Verarbeitung der Hefe auf Antigene (Agglutinogene) in ähnlicher Weise, wie bei den Bakterien — sowohl durch Salzrefraktion eventuell nach vorhergehender Zertrümmerung (SCHÜTZE) oder durch echte Autolyse (MALVOZ) oder andere ähnliche Eingriffe (DEFALLE) — erfolgte, besteht das Verfahren von BUCHNER und GRUBER darin, daß gut abgepreßte Hefe (z. B. bei 50 Atmosphären gepreßt) mit geringen Mengen (ca. 5% des Gewichtes der feuchten Hefe) Äther, Benzol, Toluol, Chloroform, Essigäther, Schwefelkohlenstoff, Aceton usw. vermischt, sich verflüssigen läßt; sie kann dann unter Zusatz von Wasser zum Sieden erhitzt, filtriert und eingedampft werden. Es genügt sogar statt der Lösungsmittel die Behandlung mit

den Dämpfen derselben. Die Ursache der Verflüssigung scheint dabei nach E. Buchner in einer plötzlichen gegenseitigen Einwirkung des Glykogens und der Zymase zu liegen, die bis dahin getrennt, infolge der pathologischen Veränderung der Zellen in Berührung kamen. Diese Methode, welche gleichsam unter Benutzung physiologischer Zellprozesse die Zellhüllen sprengt und so die Leibessubstanz in Freiheit setzt, leitet uns zu einer Reihe neuer Methoden, welche auf mechanischem Wege eine Zertrümmerung des Zellleibes bezwecken, um eine Gewinnung der scheinbar in der Zelle eingeschlossenen Gifte zu ermöglichen.

6. Methoden zur Gewinnung giftiger Bakterienzellsäfte durch mechanische Zertrümmerung der Zelleiber.

a) Kochs Methode der Darstellung des Neutuberkulins.

Das Verdienst zum erstenmale eine mechanische Zertrümmerung der Bakterien und anderer niedriger Pilze behufs leichterer Extraktion ihrer Bestandteile vorgenommen zu haben, gebührt E. und H. Buchner, welche bereits im Jahre 1893 die Methode der Zerreibung der Mikroorganismen nach Zusatz von Sand zum Patente angemeldet haben; doch erst durch die davon unabhängige Anwendung bei der Herstellung des sogenannten „Neutuberkulins" durch Koch hat die Methode der mechanischen Zerkleinerung ein allgemeines Interesse gefunden. Das Prinzip der von Koch befolgten Methode besteht darin, daß Tuberkelbazillen getrocknet und dann zerrieben werden, um die Fetthülle, welche den Zelleib gegen Eingriffe von außen schützt und ihn der Resorption entzieht, mechanisch zu zerstören; es ist von vornherein klar, daß diese Methode insbesondere dort mit Vorteil Anwendung finden wird, wo es sich um derartige schützende Hüllen, wie eben bei den Tuberkelbazillen, handelt oder wo Bakterieneiweißkörper als solche zur Immunisierung verwendet werden sollen. Aus Ruppels vergleichenden Untersuchungen über die Extraktion intakter und zerriebener Tuberkelbazillen geht hervor, daß während selbst siedendes Wasser, 2—5%ige Glyzerinlösung, 1%ige Sodalösung, ja sogar Pepsin und Trypsinverdauung nur eiweißarme Extrakte liefern, ausgetrockneten und mechanisch zertrümmerten Tuberkelbazillen mit Wasser fast die Hälfte ihres Gewichtes entzogen werden kann, wobei ein großer Teil der wäßrigen Lösung von Eiweißderivaten gebildet wird, darunter von den später zu besprechenden, näher charakterisierten, dem Tuberkulosamin und der Tuberkulinsäure. Hervorzuheben bleibt, daß alle früheren Versuche Kochs mit und ohne Zusatz von harten pulverförmigen Massen die Tuberkelbazillen unverändert ließen, solange dieselben nicht getrocknet worden waren.

Koch verfuhr bei der Darstellung seines Neutuberkulins derart, daß er die Tuberkelbazillen — nicht alte und hoch virulente Kulturen — im Vakuumexsikator sorgfältig trocknete und dann in Mengen von 100 mg im Achatmörser mit einem Achatpistill zu einem feinen Pulver zerrieb; dieses Pulver wurde in Wasser suspendiert und mittels einer Zentrifuge, welche 4000 Umdrehungen in der Minute machte, $^1/_2$—$^3/_4$ Stunden lang zentrifugiert. Nach Trudeau und Baldwin genügt indessen diese Zeit nicht, um die Tuberkelbazillen zu entfernen, und es ist diesen Autoren erst gelungen mit Sicherheit die Bazillen zu entfernen, nachdem sie dreimal 12 Stunden bei 1300 Umdrehungen zentrifugiert hatten.

Der in Lösung gegangene Anteil der Bakterien wird von Koch als Tuberkulinum O (TO) bezeichnet und entspricht in seinen Wirkungen dem alten Tuberkulin, respektive dem alkalischen Extrakte aus den Tuberkel bazillen. Der beim Zentrifugieren zurückbleibende schlammige Bodenbelag, der wiederholt getrocknet, zerrieben, in Wasser suspendiert und zentrifugiert wird, bis die Bazillenmasse sich allmählich vollständig löst, liefert das praktisch zu einer großen Bedeutung gelangte Tuberkulinum R (TR), das nach Koch im wesentlichen die immunisierende Substanz enthält, die nicht allein gegen die Toxine der Tuberkelbazillen, sondern auch gegen diese selbst eine Immunität verleihen soll. Die ursprüngliche Herstellung durch Zerreiben in einem Achatmörser wurde bei der Bereitung im großen wegen der Gefahr einer Infektion verlassen und geschieht gegenwärtig in Höchst durch sorgfältiges Zermahlen in Kugelmühlen, welche mit Porzellankugeln beschickt sind. Es entsteht auf diese Weise ein amorphes Pulver, welches weder im Ausstrichpräparate typischfärbbare oder in ihrer Form erhaltene Tuberkelbazillen enthalten noch kulturell irgend ein Wachstum aufweisen darf. Das Modell einer aus Glas hergestellten, für wenig resistentes Material verwendbaren Kugelmühle mit Turbinenbetrieb, welche ein völlig steriles Arbeiten gestattet, wird durch die nebenstehende Zeichnung, die einen schematischen Schnitt durch eine solche Mahlmühle (nach Csokor) darstellt, illustriert (Fig. 8). Die Mühle besteht aus zwei durch die Wasserturbine T bewegten, scheibenförmigen Pistillen P, welche in den aus dickem Glas hergestellten Schalen S unter Reibung rotieren; den Schalen ist ein Glassturz D gut aufgeschliffen; B und C stellen Wasserzulauf und Ablauf dar.

Fig. 8. Schema einer bequem sterilisierbaren Glasmühle.

Nach neueren Angaben Kochs nun wird dieses Pulver nicht mehr durch die Zentrifuge in zwei Teile getrennt, in die Präparate TO und TR, sondern Koch zieht es vorzüglich auf Grund seiner Agglutinationsversuche vor, die ganze Kulturmasse als solche zu benützen, und nennt dieses neue Präparat „Neutuberkulin“ (Bazillenemulsion). Dasselbe wird hergestellt, indem das Bakterienpulver mit 0,8%iger NaCl-Lösung aufgenommen und im Verhältnis 1:200 mit 5%iger Glyzerinwasserlösung derart versetzt wird, daß 1 ccm des Präparates 5 mg pulverisierter Tuberkelbazillen enthält. Als Konservierungsmittel setzte Koch ursprünglich 20%iges Glyzerin zu, welches jedoch nicht genügt, um Schimmelwachstum zu verhindern; es wird deshalb nach Dechandt dem Tuberkulin etwas Formol zugesetzt. Die Herstellung der in der Praxis nötigen Verdünnungen des Tuberkulins wird mit einer Phenolkochsalzlösung ausgeführt. (0,8% Kochsalz, 0,5% Phenol.)

Die Methode von Koch wurde vielfach zur Darstellung anderer Tuberkulinpräparate verwendet, deren Darstellung, sofern sie ein metho-

disches Interesse bietet, hier kurz erwähnt sein mag. So haben Lingelsheim und Ruppel bei Behring in der Weise gearbeitet, daß sie durch Alkohol, Chloroform und Schwefelkohlenstoff entfettete und energisch zerkleinerte Bazillen mit Glyzerinwasser unter Luftabschluß bei 150° spalteten; beim Abkühlen scheiden sich die unlöslich gewordenen, wirksamen Eiweißkörper ab, von denen 1 g ca. 1250 g Meerschweinchen zu töten vermag. Aus diesem schon hochwirksamen Präparate läßt sich nach Behring durch entsprechende Isolierungs- und Konzentrierungsmethoden ein noch ca. 10mal stärkeres Gift darstellen. Der von Behring angestellte Vergleich der Giftigkeit anderer Präparate ergibt, daß von den gewaschenen und im Exsikator getrockneten Bazillen 1 g imstande ist, 1000—1250 g Meerschweinchen in 30—40 Stunden zu töten, ebenso von den mit Alkohol behandelten, dann getrockneten Bazillen. Ein Präparat, das aus dem alten Kochschen Tuberkulin durch Alkoholfällung hergestellt wurde, ergab ein Gift, von dem 1 g 250 g Meerschweinchen, und ein Präparat, das aus der Kulturflüssigkeit durch Dialyse und nachfolgende Alkoholfällung gewonnen war, ein Gift von dem 1 g 750 g Meerschweinchen zu töten imstande war.

In gleicher Weise wie Koch hat Jrimescu aus einer Reihe von den Tuberkelbazillen nahestehenden Stämmen, so aus dem Butterbazillus Rabinowitsch, dem Thimotheebazillus Moeller, dem Fischtuberkulosebazillus, dem Orvet- und Smegmabazillus sogenannte Paratuberkuline mit ähnlicher physiologischer Wirkung, wie das Tuberkulin, hergestellt; die Paratuberkuline waren für Tiere weniger pathogen als das Kochsche Tuberkulin.

b) Buchner-Hahnsche Preßmethode.

Unabhängig von Koch hatten in H. Buchners Laboratorium Hahn und Bulling die Tuberkelbazillen nach einer prinzipiell anderen, hauptsächlich von E. Buchner und M. Hahn ausgearbeiteten Methode zu zertrümmern versucht. Die Methode, welche durch die mit ihrer Hilfe durchgeführte Entdeckung der Hefezymase ein großes biologisches Interesse erlangt hat, soll auf Grund der Angaben Eduard Buchners hier ausführlich geschildert werden.

Die Methode, zuerst hauptsächlich zur Zertrümmerung der Hefezellen benützt, beruht darauf, daß die Zellmembranen zunächst durch Zerreiben unter Zusatz von Quarzsand zerrissen werden, und der nun freigewordene Zellsaft nach Vermischen mit Kieselgur unter hohem Drucke ausgepreßt wird. Bei der Hefe besteht die ganze Prozedur 1. aus dem Waschen der Brauereihefe, 2. dem Entwässern der gewaschenen Hefe, 3. aus dem Mischen mit Quarzsand und Kieselgur, 4. aus dem Zerreiben unter Zerreißung der Zellmembranen und endlich 5. aus dem Auspressen der erhaltenen teigförmigen Masse, wobei die Prozedur 4 und 5 mehrmals wiederholt werden kann. Das Zerreiben mit Quarzsand (Glaspulver eignet sich nicht wegen seiner Wirkung als schwaches Alkali) muß sorgfältig durchgeführt sein, da nur auf diese Weise durch Zerreißen der Zellen der Zellsaft gewonnen werden kann; die nun resultierende schleimige Masse kann nicht als solche gleich ausgepreßt werden, sondern sie erhält erst durch Zusatz von Kieselgur jene glasige Beschaffenheit, die zur Gewinnung des Preßsaftes erforderlich ist, indem die Infusorienerde durch ihren feinen Gerüstbau mit großer Oberfläche den Zellsaft aufnimmt. Bei der Entfaltung der Druckwirkung wird das Gerüst zusammengepreßt und der flüssige Teil des Zellinhaltes tritt als Preßsaft hervor; das Kieselgur

funktioniert dabei gewissermaßen als Filter, indem es die festen Bestandteile zurückhält. Zum Auspressen des Saftes ist ein sehr hoher Druck nicht nötig, dessen Anwendung ist nur zur Erzielung guter Ausbeuten erforderlich.

Im einzelnen werden die Manipulationen mit Hefe folgendermaßen ausgeführt: 1000 g vorher ausgewaschener und durch Auspressen mit der hydraulischen Presse gut entwässerter Hefe werden mit 1000 g Quarzsand und 200—300 g weißer, geschlemmter, gemahlener und calcinierter Infusorienerde oder Kieselgur in einer großen Schale gemengt und kommen hierauf in Portionen von 300—400 g in einer Porzellanreibschale mit einem großen Pistill zur gründlichen Zerreibung; es muß solange zerrieben werden, bis die teigförmige Masse sich von selbst zusammenballt und von den Wandungen der Reibschale ablöst. Die stattgehabte Zertrümmerung der Hefezellen soll dabei stets mikroskopisch kontrolliert werden. Geschieht die Zerreibung ohne Quarzsandzusatz nur mit Kieselgur, so wird die zur völligen Zerreibung der Hefe nötige Zeitdauer verlängert und die endliche Ausbeute an Preßsaft verringert.

Um nun die teigförmige Masse auszupressen, wird dieselbe in ein starkes baumwollenes, nicht appretiertes Preßtuch (wasserdichtes Segeltuch) eingeschlagen, das vorher mit kaltem Wasser gut durchtränkt und hierauf in der hydraulischen Presse von dem überschüssigen Wasser wieder befreit worden war. Die benützte hydraulische Presse ist auf nebenstehender Abbildung (Fig. 9) ersichtlich und besteht aus zwei Spindeln, einer vertikalen *a*, durch ein Kurbelrad *b* auf- und abwärts zu bewegenden, am unteren Ende eine Platte tragenden, und einer horizontalen *c*, welche in den Glyzerinbehälter *e* mittels einer Handkurbel *d* eingeschraubt werden kann; der auf das Glyzerin ausgeübte Druck wird auf den hier eintauchenden Kolben übertragen, der die untere Preßplatte *f* trägt, wodurch diese entsprechend dem durch die horizontale Schraube ausgeübten Drucke gehoben und gegen die auszupressende Masse bei herabgedrehter

Fig. 9. BUCHNERsche Presse.

vertikalen Spindel angepreßt wird. Der ausgeübte Druck kann an einem Manometer abgelesen werden. Die Manipulation erfolgt derart, daß die auszupressende Masse in das Preßtuch eingeschlagen, auf die untere Preßplatte *f* gelegt und mit einem vielfach durchlochten Preßkorb *g* (der auf der beigegebenen Photographie an der Vertikalspindel hochgezogen ist) aus verzinntem Stahlblech umgeben wird; ein Blechmantel *h* mit Abflußrohr soll das Verspritzen des Saftes verhindern. Nunmehr wird zunächst die vertikale Spindel *a* durch möglichst kräftiges Drehen des Handrades herabgezogen und gegen die Masse angepreßt; ist dies geschehen, so wird erst die horizontale Spindel *c* angedreht und so die hydraulische Presse in Tätigkeit versetzt. Die Steigerung des Druckes soll langsam erfolgen, damit das Preßtuch nicht reißt. Der auf die Preßkolben ausgeübte Druck beträgt bei einem Querschnitt des Preßkolbens von 60 qcm und der angewendeten Spannung von 300 Athmosphären 18 000 kg, so daß sich bei einem Flächeninhalte der kreisrunden Preßplatte von 200 qcm auf 1 qcm ein Druck von 90 kg ergibt (sog. spezifischer Druck).

Die Ausbeute an Preßsaft aus 1 kg Hefe beträgt ca. 320—460 ccm; um die Ausbeute zu vergrößern, wird die ausgepreßte Hefe nochmals ohne Wasserzusatz zerrieben und abermals ausgepreßt; dieses Verfahren kann 4—5 mal wiederholt werden ohne eine völlige Erschöpfung des Preßkuchens herbeizuführen. Die endliche Ausbeute schwankt dann zwischen 450—500 ccm Preßsaft. Derselbe ist am zweckmäßigsten aus aus der Presse direkt in einem Faltenfilter aufzufangen, durch welches er in ein in Eiswasser stehendes Gefäß filtriert.

Die Gewinnung der Zellsäfte aus Bakterien, welche H. Buchner als Plasmine bezeichnet hat, gestattet nach H. Buchner und Hahn die Verarbeitung frischen und feuchten Bakterienmaterials, ist weniger chemisch eingreifend und wegen Fortfalls der Staub- und Infektionsgefahr auch weniger gefährlich als die nach Koch geübte Zermalmung getrockneter Bakterien. Buchner und Hahn bedienten sich dabei zur Züchtung der betreffenden Bakterien entweder der mit Nähragar beschickten Kolleschen Schalen oder der mit Bouillon in niederer Schichte gefüllten Erlenmeyerkolben. Die von den Massenkulturen abgeschabten Bakterienmassen wurden mit Quarzsand und Kieselkur zerrieben und durch Zusatz von Wasser, 20 $^0/_0$ igem Glyzerin oder physiologischer Kochsalzlösung in einen Teig verwandelt, der dann wiederholt unter erneutem Flüssigkeitszusatz mit der hydraulischen Presse ausgepreßt worden war. So konnten aus Cholera-, Typhus- und Milzbrandbazillen, ferner aus Staphylokokken leicht Zellsäfte erhalten werden, die deutliche Mengen auch koagulierbaren Eiweißes enthielten, welches zum größten Teil aber aus Nukleoalbumin bestand. Mit derartigen Typhus- und Choleraplasminen, deren Giftigkeit übrigens eine geringe war, gelang es Tieren eine spezifische Immunität zu verleihen. Das Serum hatte sowohl schützende wie auch agglutinierende Eigenschaften. Die gleichen Resultate erzielte Hahn auch wenn er mit der Alkoholfällung oder der Essigsäurefällung (Nukleoproteid) der betreffenden Plasmine immunisierte. Die aus Milzbrand und Staphylokokken dargestellten Präparate hatten nur eine geringe immunisierende Wirkung. Das Tuberkuloplasmin wurde aus jungen Tuberkelbazillen gewonnen, welche als Häute auf Glyzerinbouillon gezüchtet, mit Quarzsand und Kieselgur zerrieben und nach dem Auspressen noch durch Kieselgurfilter bakterienfrei filtriert worden waren. Das Tuberkuloplasmin zerlegt H_2O_2, verliert diese katalytische Wirkung

sowohl beim Erwärmen auf 60° als auch nach Zusatz von Blausäure; erst Luftdurchleiten oder Erwärmen lassen sie wieder hervortreten. Es scheint, daß auch im Tuberkuloplasmin, ähnlich, wie im Hefepreßsaft ein proteolytisches Ferment enthalten ist. Das Tuberkuloplasmin hatte bei tuberkulösen Meerschweinchen immunisierende Eigenschaften und stellt, vereinigt mit dem aus der Nährlösung gewonnenem Toxin, das LANDMANNsche „Originaltuberkulosetoxin" dar.

Die Anwendung der BUCHNER-HAHNschen Preßmethode war bei der Darstellung der verschiedensten Antigene eine recht mannigfache, doch spielten dabei gerade die bakteriellen Antigene eine geringere Rolle, als die verschiedenen aus Zellen höher organisierter Pflanzen und Tiere gewonnenen, die mannigfachsten physiologischen Wirkungen aufweisenden Preßsäfte. Es bleibt noch übrig, darauf zu verweisen, daß HELLER und BERTARELLI mittels der Preßmethode den Versuch unternahmen, aus Lyssagehirnen toxische Substanzen zu gewinnen; doch war mit den so erhaltenen Substanzen weder eine konstante toxische, noch aber, selbst bei wiederholter Injektion, eine immunisierende Wirkung zu erzielen.

c) BUCHNERs Gefriermethode und deren Modifikationen.

Ein anderes Verfahren der Zertrümmerung von Zellen ohne Anwendung der hydraulischen Presse hat E. BUCHNER bei der Gewinnung von Hefepreßsaft anzuwenden versucht. Während Hefe für sich, ohne Sandzusatz bei gewöhnlicher Temperatur nicht zerrieben werden kann, ebensowenig wie auch die Anwendung der Kälte für sich, so z. B. Gefrierenlassen bei — 16° und rasches Wiederauftauen die dehnbare Zellmembran zum Platzen bringt, gelingt es leicht bei niedriger Temperatur. Die ersten Versuche, die darin bestanden, daß Hefe in einer Reibschale unter flüssiger Luft zerrieben wurde, mußten wegen Explosionsgefahr — da durch Verdunsten des Stickstoffs an der Luft allmählich flüssiger Sauerstoff zurückbleibt — aufgegeben werden und die weiteren Versuche wurden mit fester Kohlensäure ausgeführt, indem 500 g entwässerter Bierhefe mit 500 g Kohlendioxydschnee in der Reibschale zerrieben wurden. Die zuerst hart gefrorene Masse wird allmählich weich und dünnflüssig; nach ½ stündigem Zerreiben wird durch ein gehärtetes Filter abgesaugt, wodurch auch die in der Flüssigkeit gelöste Kohlensäure zugleich größtenteils entfernt wird. Man erhält so nach 1½ stündigem Absaugen eine im durchfallenden Lichte ziemlich klare, im auffallenden graue und undurchsichtige Flüssigkeit, die beim Erhitzen gut koaguliert und starke Gärwirkung aufweist. Die quantitative Ausbeute bleibt jedoch hinter dem BUCHNER-HAHNschen Verfahren zurück.

Diese für die Gewinnung des Hefesaftes angewandte Methode wurde auch für die Darstellung von bakteriellen Giften resp. Antigenen benützt und dabei von den Autoren hie und da leicht modifiziert. Insbesondere waren es BASSENGE und M. MAYER, dann auch LÜDKE, welche zur Gewinnung von Zellsäften aus Typhus und Dysenteriekulturen sich dieses Verfahre nsbedienten, dabei jedoch nicht wie BUCHNER, um die Explosionsgefahr auszuschalten, sich fester Kohlensäure bedienten, sondern flüssige Luft verwendeten. BASSENGE und M. MAYER benützten als Ausgangsmaterial 24—36stündige Typhusagarkulturen, welche abgekratzt und in möglichst wenig Bouillon aufgeschwemmt wurden, so daß die Bakterienemulsion eine syrupartige Konsistenz aufwies. Diese dickflüssigen Kulturmassen wurden mit flüssiger Luft im Mörser übergossen, wodurch starre Eisklümpchen entstanden, die unter großem Kraftaufwande mit dem Pistill zertrümmert werden mußten. Dieses Verfahren wurde nach jedes-

maligem teilweisen Auftauen 3—4 mal wiederholt; doch wiesen diese Flüssigkeiten stets noch kulturell und mikroskopisch im hängenden Tropfen nachweisbare lebende Typhusbazillen auf, so daß die mit Bouillon oder physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten Massen erst durch Pukallfilter steril filtriert werden mußten. Diese Technik wurde später derart abgeändert, daß die Typhusbakterien, um die manuell schwer zu zerkleinernden großen Eisklumpen zu umgehen, vor dem Gefrierenlassen 24—48 Stunden im Exsikkator getrocknet und hierauf wie früher behandelt wurden; zur bequemen Zertrümmerung wurde hie und da auch steriler Quarzsand zu gleichen Teilen zugefügt. Die endlich erhaltene dickbreiige Masse wurde aufgeschwemmt und durch Pukallfilter gejagt, eventuell, wenn sie mit Quarzsand vorher gemischt war, zentrifugiert; in manchen Fällen wurde die Aufschwemmung mehrere Stunden im Schüttelapparate geschüttelt. Die resultierende filtrierte Flüssigkeit, die einen leichten Spermageruch aufwies, Biuret und Millonsche Reaktion gab, dagegen keine Pentosenreaktion und Fehlingsche Reaktion zeigte, war nur wenig giftig; die wiederholt eingedickte Flüssigkeit lieferte ein Toxin, dessen sicher letale Dosis für Meerschweinchen von 200 bis 300 g 1 ccm nicht überschritt; 1—5 ccm Kaninchen intravenös injiziert, brachten eine vorübergehende Störung des Wohlbefindens und eine Gewichtsabnahme bis zu 200 g innerhalb 24 Stunden hervor. Die auf diese Weise unternommene Darstellung der Präparate ist jedoch nicht allein wegen der Explosionsgefahr, sondern auch wegen der Infektionsgefahr wenig empfehlenswert.

Im Wesen der gleichen Methode bediente sich auch H. Lüdke, um aus Dysenteriekulturen ein spezifisches Gewicht darzustellen. Er erhielt auf diese Weise Gifte, von denen 0,5—0,2 ccm genügten, um 1500 g schwere Kaninchen in etwa 18—24 Stunden zu töten, ja sogar 0,1 bis 0,05 ccm waren imstande, in einigen Fällen innerhalb 48 Stunden den Tod herbeizuführen, in anderen die bei der Infektion mit lebenden Kulturen auftretenden charakteristischen Symptome zu erzeugen. Doch war die Wirkungsfähigkeit dieser sterilen Zellsäfte eine stark begrenzte, indem bereits nach achttägigem Stehen im Eisschrank alle Wirkungen zurückgingen. Bakterizide oder antitoxische Wirkungen konnte Lüdke nach Immunisierung mit seinen Giften nicht beobachten.

d) Methode von Macfadyen und Rowland.

Ein ganz ähnliches Prinzip, wie das oben von E. Buchner befolgte, benützten schon 1900 A. Macfadyen, G. H. Morris und S. Rowland, um zunächst Hefezellen zu zertrümmern; sie bedienten sich einer damals nicht näher beschriebenen mechanischen Vorrichtung, durch welche die Hefe mit zugefügtem Silbersand derart durchgeschüttelt wurde, daß durch die schnell aufeinander folgenden Zusammenstöße der Hefe und Sandteilchen die Zellwandungen zerrissen wurden uud der Zellinhalt heraustrat; die mikroskopische Kontrolle ergab die völlige Zertrümmerung der Hefezellen. Während der Operation wurde das Material durch Zirkulation einer Salzsole von — 5° abgekühlt, da sonst durch die Reibung der Substanzteilchen gegeneinander eine bedeutende Temperaturerhöhung der Masse einträte.

Dieses Verfahren von Macfadyen und seinen Mitarbeitern ist der Vorläufer für das spätere Zerreibungsverfahren, das Macfadyen und Rowland zur Gewinnung sogenannter intracellulären Toxine unter Benützung flüssiger Luft ohne Sand und Kieselgur ausgearbeitet haben. Die

Fig. 10. Zerreibungsapparat nach MACFADYEN und ROWLAND. (Links Gefäße zur Aufnahme flüssiger Luft.)

Vorteile des Macfadyen- und Rowlandschen Verfahrens sollen in der möglichst schnellen Zerkleinerung der frischen Gewebe und Zellen, sodann in der Vermeidung von Wärme und anderen modifizierenden Faktoren während des Prozesses und schließlich in der sofortigen Verwendbarkeit der gewonnenen, von verunreinigenden Substanzen freien Zellsäfte bestehen. Die Verwendung der flüssigen Luft scheidet dabei nicht nur jede Wärme, sondern auch jede chemische Veränderung in dem betreffenden Materiale aus; die Bakterien behalten bei der Temperatur der flüssigen Luft (gegen -190^{0} C) sogar nach mehrmonatlichem Aufenthalt ihre volle Lebenstätigkeit bei. Aus den im gefrorenen Zustande ohne fremden Zusatz zerkleinerten Bakterien läßt sich binnen 2—3 Std. eine nahezu quantitative Ausbeute an Bakterienplasma gewinnen, so daß nach Macfadyen zehn flache Agarkulturen genügendes Bakterienmaterial für ein Experiment liefern, das durch Zerreiben mit Quarzsand und Kieselgur gewonnen, wenigstens 100 Agarkulturflaschen und viel mehr Zeit erfordern würde.

Die Prozedur bei der Verarbeitung pathogener Bakterien gestaltet sich folgendermaßen: Die Bakterien werden, wenn möglich, auf Agar gezüchtet, die entstandene Kultur wird von der Agaroberfläche mit physiologischer Salzlösung abgewaschen und die erhaltene Bakterienemulsion auf einer Zentrifuge von großer Umdrehungsgeschwindigkeit (8000—10 000 Touren in der Minute) mit physiologischer Kochsalzlösung gründlich gewaschen. Behufs Eindickung des Bakterienmaterials wird dasselbe an der Oberfläche von Pasteur-Chamberlandkerzen unter Luftdurchsaugung gesammelt und so eine teigartige Konsistenz desselben erzielt; dabei sollen auch die Zellen so gut als möglich vom anhaftenden Wasser befreit sein. Man erhält auf diese Weise von jeder Kulturfläche ca. 0,15 g der feuchten Bakterienmasse, welche nunmehr dem von S. Rowland konstruierten Zerkleinerungsapparat übergeben werden kann. Derselbe besteht (Fig. 10) aus einen verschließbaren Metallgefäß (A), in welches die schleimige Bakterienmasse eingefüllt wird und welches während der Operation in einen Behälter voll flüssiger Luft (B), der seinerseits wieder mit einem Mantel (C) umgeben, durch einen Träger (D) fixiert wird, eintaucht. Die Zerkleinerung wird durch einen Metallstößer (E), der die Form eines Doppelconus hat, und, wie aus der beigegebenen Zeichnung ersichtlich ist, sowohl drehende als auch auf- und absteigende Bewegungen vollführen kann, besorgt; derselbe wird von einem Elektromotor in Bewegung erhalten. Den wesentlichsten Teil des Zerkleinerungsapparates stellt das Metallgefäß A dar, dessen genauere Einrichtung Fig. 11 wiedergibt; dasselbe ist zusammengesetzt aus der horizontalen Platte a, welche mit den Stangen b die runde Platte c trägt, den eigentlichen Deckel des konischen Behältnisses d, in welches der drehbare Stempel e von E eingepaßt

Fig. 11. Metallgefäß des Zerreibungsapparates nach Macfadyen-Rowland.

ist. Das Gefäß *d* ist frei beweglich und kann von dem mit zwei Verschlußbolzen versehenen Deckel *c* behufs Einfüllung des Bakterienmaterials weggeschoben werden. In die Verschlußplatte *c* ist gleichzeitig der Stempel *g* eingefügt, welcher eine feste Asbestpackung trägt, durch welche der Stab *E* geführt ist. Der dichte Verschluß zwischen *c* und *d* ist durch einen eingeschobenen Papierring gesichert. Bei Beginn der Operation wird das Metallgefäß bis zu der Höhe *h* in die flüssige Luft des Behälters *B* eingetaucht und der Mechanismus gestaltet sich folgendermaßen: Bei rotierendem Abstieg von *E* wird *e* unter großem Druck gegen die konische Wand von *d* gepreßt, so daß das Bakterienmaterial, das zwischen die fein geriefte Fläche des Stempels *e* und die Wand von *d* kommt, zu einem groben Pulver zerrieben wird, in welchem Zustande es den Weg gegen die oberen Flächen des Konus von *e* findet. Bei drehendem Aufstieg des Metallstößers *E* fällt das grobe Pulver wieder auf den Boden von *d* und wird beim nächsten Abstieg von *E* wieder zwischen dem Konus *e* und dem Boden von *d* zermahlen. Diese Aufeinanderfolge von Operationen wird so lange fortgesetzt, bis bei mikroskopischer Prüfung keine intakten Mikroorganismen mehr gefunden werden, ein Resultat, zu dem man in $1^1/_2$—2 Stunden gelangen kann, wenn man mit $^1/_2$—1 g der Substanz arbeitet. Die resultierende Masse stellt, wenn man bei 190° C. gearbeitet hat, ein trockenes Pulver dar, das aufgetaut nach Macfadyen mit dem lebenden und chemisch unveränderten Protoplasma der lebenden Zellen indentisch ist und außerdem den Vorzug einer konstanten Zusammensetzung genießt. Die Masse wird gewogen, mit 0,75 $^0/_0$iger Kochsalzlösung durch Zerreiben in einem Achatmörser gemischt und schließlich zentrifugiert, um von suspendierten Verunreinigungen befreit zu werden. Es ist in dieser Weise möglich, vollkommen sterile Preßsäfte, welche die intrazellularen Zellbestandteile darstellen, zu erhalten; sie sollen einer 10 $^0/_0$ Lösung der intrazellularen Bestandteile in physiologischer Kochsalzlösung gleichwertig sein.

Auf diese Weise stellte Macfadyen aus zahlreichen Bakterien, so aus Typhus-, Diphtherie-, Tuberkelbazillen und Eiterkokken und später aus Schweineseuche- und Hogcholerabazillen giftige Preßsäfte dar, von denen sich insbesondere die des Typhus als bakterizide und antitoxische Antigene erwiesen. Von Interesse ist es auch, daß die Zerkleinerung von Lyssagehirnen in flüssiger Luft das Tollwutvirus völlig vernichtet, was nach Macfadyen für die organisierte Natur dieses Virus spricht; die Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den früher erwähnten wenig erfolgreichen Versuchen von Heller und Bertarelli, mit der Buchnerschen Preßmethode ein wirksames Lyssaantigen zu isolieren.

Überblickt man die bisher mit den im letzten Kapitel angeführten Zertrümmerungsmethoden erreichten Erfolge bei der Darstellung spezifischer bakterieller Antigene, so muß man ohne weiteres zugeben, daß dieselben vor den einfachen Extraktionsmethoden, was die Wirksamkeit der erhaltenen Präparate anlangt, nur in wenigen Fällen einen Vorzug verdienen; dieselben scheinen vielmehr erst dort von besonderem Wert zu sein und ausgezeichnete Dienste zu leisten, wo es sich um die Gewinnung enzymatisch wirkender Substrate, sei es aus Pflanzen, sei es aus tierischen Zellen handelt.

7. Zertrümmerung der Zellen durch biologische Methoden.

Es wurde bereits bei der Besprechung der Alkoholätherextraktion erwähnt, daß es unter Umständen gelingt, pflanzliche Zellen, im speziellen die Hefezellen nach Buchner und Gruber durch Behandeln mit Äther und ähnlich wirkenden Extraktionsmitteln infolge der Einwirkung der Zymase auf das Glykogen zu sprengen und durch den Protoplasmaaustritt die Hefe in eine zerfließliche Masse umzuwandeln. Anhangsweise mögen hier noch andere Methoden*) der Saftgewinnung aus Hefe wegen ihres technischen und biologischen Interesses in Kürze erwähnt werden, wiewohl sie vorläufig zur Antigendarstellung keine Anwendung gefunden haben. Ähnlich wie Buchner und Gruber hat M. Hahn durch Behandlung der Hefe mit Chloroform dieselbe in eine flüssige Masse umgewandelt, De Meulmestre versetzte Hefe mit gepulvertem Gummiarabicum und van Laer, sowie C. J. Lintner verwendeten Salz, der erstere 2 %ige Kochsalzlösung, der letztere feste Salze, um die Hefe zu verflüssigen. Eine biologisch interessante Methode benützte Overton, um Algenzellen zu zersprengen. Die Algen werden in eine Glyzerinlösung von solcher Konzentration gebracht, daß gerade noch keine Plasmolyse eintritt. Nachdem die Glyzerinlösung durch Stehen an der Luft langsam eingedickt worden war, taucht man sie plötzlich in reines Wasser, wobei die Zellwand durch den großen osmotischen Druck des Zellsaftes sofort zersprengt wird. Ob ähnliche Methoden auch bei den Bakterienzellen zur Gewinnung des Zellsaftes anwendbar wären, müßten erst diesbezügliche Versuche ergeben.

B. Gewinnung von Antigenen aus höheren Pflanzen**).

Die Gewinnung der hierher gehörigen Antigene im rohen Zustande ist in der Regel eine höchst einfache und besteht nahezu ausnahmslos in der Extraktion mit Wasser oder Salzen des vorher präparierten Ausgangsmaterials. Die Vorbereitung wird je nach dem Ausgangsmaterial eine verschiedene sein. Da nach unseren bisherigen Kenntnissen die toxischen, resp. die antigenen Körper stets am reichlichsten, wenn nicht ausschließlich durch die Extraktion der eiweißhaltigen Bestandteile zu gewinnen sind, so ist es zumeist die erste Aufgabe nach eventueller Entschalung der pflanzlichen Samen oder Bohnen, die in denselben enthaltenen Fette oder Öle, die unter Umständen ätzende Säuren oder schwere, nicht antigen wirkende Gifte (Alkaloide) enthalten, zu entfernen. Ebenso haben sich bisher auch die Stärkekörner der verschiedenen pflanzlichen Bestandteile niemals als Träger der antigenen Substanzen erwiesen. Die Reinigung von anhaftenden Fetten und Ölen geschieht in der Regel durch Extraktion mit Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol, Toluol usw. und diese Prozedur wird gewöhnlich als beendet angesehen, wenn der Alkoholätherextrat farblos abfließt; dann ist zumeist auch die Fett- oder Ölextraktion beendigt. Diese Prozedur hat gleichzeitig den Vorteil, daß die nunmehr bei Zimmer- oder Brutschranktemperatur getrockneten, von dem haftenden Alkohol oder Äther oder anderen Extraktionsmitteln befreiten Materialen leichter einer mechanischen Zertrümmerung, sei es in Mühlen, sei es in Reibschalen, zugänglich sind. Doch ist in vielen Fällen eine solche Fettextraktion nicht unbedingt

*) Dieselben sind dem vortrefflichen Werke E. u. H. Buchners und M. Hahns über Zymasegärung entnommen.

*) Siehe Jacoby pag. 311.

nötig, wenn auch zumeist empfehlenswert. Die getrockneten und zerkleinerten Substanzen werden entweder bei Zimmertemperatur oder bei Bruttemperatur, entweder mit Wasser allein oder mit Salzlösungen verschiedener Konzentration oder mit Glyzerin, in seltenen Fällen auch mit Laugen oder Säuren digeriert. Von diesen Extraktionsmitteln sind im allgemeinen physiologische oder 2—10 %ige Kochsalzlösungen am meisten in Verwendung und liefern in der Regel bessere Resultate an wirksamer Substanz als die bloße Extraktion mit Wasser oder die Extraktion mit Glyzerin. Die Verwendung konzentrierter Salzlösungen hat bei der Extraktion der Pflanzenbestandteile, die als Antigene wirken, keine besonderen Vorteile und sie ist geradezu unzweckmäßig dort, wo die betreffenden Extrakte gleichzeitig zur biologischen Reaktion, wie z. B. bei der Präzipitin-, Hämagglutinin- oder Hämolysinreaktion benützt werden sollen. Hier genügt sowohl zur Antigenwirkung in vivo, wie auch in vitro die einfache Extraktion der betreffenden Pflanzenbestandteile mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung, insbesondere dort, wo bereits, wie z. B. bei der Präzipitinreaktion verschiedener Getreidearten sehr geringe Antigenmengen zur Erzeugung von Immunkörpern genügen. So hatte z. B. Kowarski als Präzipitinogene kalte, wässerige Auszüge aus Weizenmehl, aus welchem das Albumin sogar durch Erhitzen und nachheriges Filtrieren entfernt worden war, verwendet; die antigenen Substanzen waren in diesem Falle die im Filtrate zurückgebliebenen Albumosen, welche bei intravenöser Applikation Präzipitine lieferten. A. Schütze hat sich in ähnlicher Weise der in dem Pflanzeneiweißpräparat „Roborat" enthaltenen Eiweißkörper bedient, wie auch neuerdings Lusini eines Opiumextraktes in physiologischer Kochsalzlösung. Zu dem gleichen Zwecke haben jüngst Magnus und Friedenthal Preßsäfte aus Pilzen und höheren pflanzlichen Organismen mit gutem Resultate benützt.

Dort wo es sich um die Darstellung toxischer Antigene handelt, ist es zumeist nötig, mittels irgendeines Verfahrens die Gifte in der Extraktionsflüssigkeit zu konzentrieren; als solche Konzentrierungsverfahren wurden zumeist Ausfällungen der Extraktionsflüssigkeit mit Alkohol resp. Alkoholäther, Aceton oder verschiedenen Neutralsalzen, wie Natriumsulfat, Magnesiumsulfat oder Ammoniumsulfat verwendet. In geeigneten Fällen kann sich auch die Ausfrierungsmethode als Konzentrierungsmethode von Vorteil erweisen neben der selbstverständlich auch hier verwendeten Methode der Konzentrierung durch Eindampfen im Vakuum. Alle diese Verfahren müssen natürlich dem zu verarbeitenden Material resp. dem zu gewinnenden Antigen angepaßt sein und wir werden daher in Kürze die allgemeinen Gewinnungsmethoden bei einigen der wichtigsten pflanzlichen Gifte oder Phytotoxine zu besprechen haben.

I. Gewinnung der antigenwirkenden Substanzen aus den Samen von Abrus precatorius (Semina Jequirity).

Während Wurzel, Zweige und Blätter dieser Papilionacee ein ungiftiges Glycosid (Glycyrrhicin) enthalten, sind die spezifischen antigenwirkenden und giftigen Prinzipien in den Samen anzutreffen. Nachdem etwa im Jahre 1882 die Gift- und Heilwirkung des Wasseraufgusses der Jequiritysamen in Europa bekannt geworden war, schrieben die ersten Untersucher, wie Sattler, Cornil, Berlioz u. a. die Giftwirkung Bakterien zu, bis erst Bruylants und Wenneman nachwiesen, daß es

sich nicht um Bakterienwirkung handle; sie glaubten, daß das wirksame Prinzip ein Enzym sei, das während der Keimung gebildet wird und nannten es „Jequiritin". Kurze Zeit darauf zeigten Warden und Waddell in Kalkutta unter Leitung R. Kochs, daß ein albuminoider Körper, den sie Abrin nannten und mit Ovalbumin und den vegetabilischen Albuminen verwandt hielten, der Träger der Giftwirkung sei. Sie behandelten die pulverisierten Samen mit Chloroform und Weingeist, um die Farbstoffe und Fette zu entfernen, extrahierten den Rückstand mit Wasser und fällten die wässerigen Extrakte mit Alkohol.

Auch C. Nikolai fand die im Jequirity-Jnfus enthaltenen Bakterien unwirksam und stellte das wirksame Prinzip nach einer von Brücke bei der Pepsingewinnung eingeschlagenen Methode dar, welche in der Digestion mit Phosphorsäure und nachträglicher Präzipitation mit Kalk bestand; auch dieser Autor betrachtete die wirksame Substanz als Enzym, während Stokvis es als wahrscheinlich bezeichnet, daß sie in einem ätherischen Öl gesucht werden müsse, ähnlich wie Senföl, das durch Fermentation unter dem Einflusse des Myrosins aus dem Senfsamen entstünde.

Sydney Martin und S. Martin und R. N. Wolfenden fanden, daß das von Warden und Waddell dargestellte Albumin ein Gemisch mehrerer Körper, vor allem eines Globulins und einer Albumose sei, welch letztere Martin derart vom Globulin zu trennen versuchte, daß er die konzentrierten wässerigen Extrakte mit überschüssigem absolutem Alkohol fällte, den nach einigen Tagen abfiltrierten Niederschlag in Wasser löste, wieder mit Alkohol fällte und diese Fällung mehrere Monate unter Alkohol aufbewahrte, um das mitgefällte Globulin unlöslich zu machen. Die wässerige Lösung des Niederschlages gibt Albumosenreaktionen (keine Fällung beim Kochen, mit Essig- und Salpetersäure entstehen in der Wärme lösliche Niederschläge) und 6,6 mgr der festen Substanz sind pro kg Ratte tödlich. Die von Martin und Wolfenden bei ihren Versuchen eingeschlagene Gewinnungsmethode der wirksamen Präparate war folgende: Das wirksame Globulin, das nach den Autoren ein vegetabilisches Paraglobulin ist, wurde aus den entschalten und zerkleinerten Samen mit 15%iger Kochsalzlösung extrahiert, die mit Essigsäure angesäuerte Lösung mit Kochsalz oder Ammonsulfat ausgefällt, der Niederschlag in destilliertem Wasser gelöst, und das Globulin durch Dialyse ausgefällt; dasselbe wurde mit Wasser gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet. Zu den Versuchen diente eine Lösung in 15%iger Kochsalzlösung. Das Globulin ist auch in 10%iger Magnesiumsulfatlösung löslich und kouguliert zwischen 75° und 80°, wobei es seine Giftigkeit, die dem Schlangengifte ähnlich sein soll, verliert.

Endlich wäre die von Kobert angegebene Darstellungsmethode der wirksamen Präparate zu erwähnen, die von E. Merck in Darmstadt geübt wird und sich im übrigen an die von Martin und Wolfenden benützte Methode anlehnt; sie besteht darin, daß die pulverisierten und entfetteten Samen mit 10%iger Kochsalzlösung extrahiert, und die Extrakte hierauf mit Natriumsulfat oder Magnesiumsulfat oder Ammoniumsulfat gefällt werden. Die Lösungen der Niederschläge können durch Dialyse gereinigt werden. Dieses Präparates bedienten sich die meisten späteren Untersucher, so insbesondere Ehrlich bei seinen grundlegenden Arbeiten und Hausmann bei den Isolierungsversuchen der wirksamen Substanz. Auf die Methoden der Reindarstellung wird im zweiten Teile dieser Abhandlung eingegangen.

II. Gewinnung der antigenwirkenden Substanzen aus den Samen von Ricinus communis.

Die Giftigkeit der Samen der Ricinuspflanze ist seit lange bekannt; bereits WERNER hat 1870 gefunden, daß der Giftstoff vorzugsweise im Embryo des Samens, auch im Endosperm, dagegen nicht in der Schale sich vorfinde; die Natur des Körpers war strittig, indem man die giftige Substanz bald für ein Alkaloid, bald für ein Glukosid hielt. RITTHAUSEN und nach ihm VINES waren die ersten, welche die Eiweißkörper der Ricinussamen darstellten und als Bestandteile eine Albumose und in ansehnlicher Menge ein Globulin fanden, welches letztere RITTHAUSEN in schönen Ortaedern, ganz ähnlich wie das des Edestin aus Hanfsamen, zur Krystallisation zu bringen vermochte; auch OSBORNE hatte die chemische Natur dieses krystallisierten Ricinglobulins näher untersucht. Die Darstellung desselben erfolgt derart, daß die entölten und entfetteten, von ihren Schalen befreiten Samen mit 10 %iger Kochsalzlösung extrahiert werden, und die erhaltene Lösung, klar filtriert, ca. 60 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert wird. Man erhält auf diese Weise einen Globulinniederschlag, der der Hauptmasse nach aus Spheroiden und Krystallen besteht, die durch wiederholte Umkrystallisation gereinigt werden können.

Indes ist RITTHAUSEN die Giftwirkung der Ricineiweiße entgangen und erst DIXSON fand in Schmiedebergs Laboratorium, daß man aus Ricinussamen einen äußerst giftigen Körper erhalten kann, wenn man den salzsauren Auszug mit kohlensaurem Natron neutralisiert, wobei eben die giftwirkende Fällung entsteht, oder wenn man den wäßrigen Auszug mit Alkohol fällt; eine weitere Reinigung durch wiederholte Alkoholfällung empfiehlt sich nicht, da nach neuen Untersuchungen von OSBORNE, MENDEL und HARRIS ein großer Teil, wenn nicht alles wirksame Albumin derart verändert wird, daß es seine Giftwirkung verliert. DIXSON hat daher eine Darstellung und Reinigung in der Weise versucht, daß er den wäßrigen Auszug mit Bleiessig und Ammoniak fällte und erst das mit Schwefelwasserstoff entbleite Filtrat mit Alkohol behandelte, wodurch ein eiweißreicher giftiger Niederschlag erhalten wurde.

STILLMARK, der den giftigen, von ihm als Ricin bezeichneten Eiweißkörper für eine Albumose ähnlich der von S. MARTIN im Papayasaft gefundenen Phytalbumose hielt, verfuhr bei dessen Darstellung derart, daß er die mit Alkohol und Äther entfetteten Samen mit Wasser Kochsalzlösung oder Glycerin extrahierte und in diesen Extrakten mit eiweißfällenden Reagentien Niederschläge, die sich als giftig erwiesen, erzeugte. Das am meisten benützte Präparat wurde derart gewonnen, daß die von ihren Schalen befreiten Samen mit 10 %iger Kochsalzlösung zu einer Emulsion verrieben und dann filtriert wurden; das Filtrat wurde mit $MgSO_4$ in Substanz gefällt, die Fällung durch Dialyse von den Salzen gereinigt und in sodahaltigem Wasser, mitunter in Kochsalz, wieder gelöst. Die wäßrigen Samenextrakte konnten auch unvollständig mit essigsaurem Blei, vollständig mit Essigsäure und Ferrocyankalium in den wirksamen Bestandteilen ausgefällt werden; ebenso gelang es auch STILLMARK, die wirksame Substanz aus den Samen mit verdünnter Natronlauge auszuziehen und mit Essigsäure niederzuschlagen, und andererseits mit verdünnten Säuren zu extrahieren und mit Ferrocyankalium zu fällen. Die wirksame Substanz wird beim Kochen unwirksam, wird von Wasserstoffsuperoxyd nicht angegriffen, wohl aber, wenn selbst langsam, von den Verdauungsfermenten.

Cushny, der eingehende Studien über die Reindarstellung des Ricins unternahm, stellte dasselbe derart dar, daß er die Preßkuchen extrahierte (das Lösungsmittel ist nicht angegeben) und durch Sättigung mit Magnesiasulfat aus dem Extrakte das Gift ausfällte; der Niederschlag wurde gelöst, dialysiert und die klar filtrierte Lösung verwendet. Die wirksame Substanz wurde von Cushny als Globulin angesehen, jedenfalls aber für einen Eiweißkörper oder mit dem Eiweiß in einer für gewöhnliche Methoden nicht zu zerlegenden Verbindung gehalten. Neben dem Globulin fand auch Cushny eine unwirksame, durch Pergament relativ leicht diffundierende Albumose. Von besonderem Interesse sind Cushnys Versuche, das Ricin durch Erzeugung von anorganischen und organischen kolloiden Niederschlägen aus seinen Lösungen auszuscheiden. So reißt ein Niederschlag von Baryumkarbonat, erzeugt durch Eintragen von Barythydrat in die kohlensäurehaltige Ricinlösung, das Ricingift mit, ebenso die durch Eiweißausfällung, Serumeiweiß oder Eiereiweiß, mit Säuren (Kohlensäure oder Salzsäure) in einer Ricinlösung entstandenen Niederschläge. Aus verdünnten wäßrigen Lösungen kann nach demselben Autor das Ricin gewonnen werden, indem man Fibrinflocken in diese einträgt, auf denen sich das Ricin niederschlägt; die mit Wasser gewaschenen Flocken werden dann mit Sodalösung behandelt, wobei das Gift in Lösung geht. Auf diese interessanten Versuche Cushnys wird noch später im anderen Zusammenhange verwiesen.

Die von Kobert angegebene Darstellungsweise des bei Merck erzeugten Ricinpräparates ist folgende: Die pulverisierten Samen werden mit Äther, dann mit Alkohol erschöpft, um Fette, Lecithin, Cholestearin, Alkaloide etc. zu entfernen, hierauf mit 11 $^0/_0$iger Kochsalzlösung bei 37—40° C 24 Stunden maceriert und das Filtrat der Maceration durch Eintragen von Ammonsulfat bis zur Sättigung gefällt. Der bei Zimmertemperatur getrocknete Niederschlag kann jahrelang aufbewahrt werden, wobei er allerdings allmählich unlöslich und unwirksam wird. Die so dargestellten Handelspräparate enthalten noch reichliche Mengen von Kochsalz und Ammonsulfat, welche durch Dialyse entfernt werden können. Dieses Merck sche Präparat hatte zahlreichen Autoren, so Ehrlich, Jacoby und anderen bei ihren Untersuchungen als Ausgangsmaterial gedient.

Brieger verfuhr bei der Darstellung des Ricins derart, daß er die enthülsten und möglichst feingestoßenen Samen von Ricinus communis mittels Kaliumbicarbonats extrahierte und nachträglich mit Ammoniumsulfat fällte; diese Darstellungsmethode enthebt der Mühen, den öligen Samen zu entfetten. Ein derart dargestelltes Präparat war in der Menge von 0,0005 g imstande, 1 kg Kaninchen innerhalb 24—48 Stunden zu töten und hatte nach 10jähriger Aufbewahrung nur wenig von seiner Wirksamkeit verloren, wiewohl etwa der 10. Teil desselben unlöslich geworden war.

In jüngster Zeit haben Osborne, Mendel und Harris sehr eingehende Untersuchungen über die Natur der Ricinantigene angestellt. Sie gingen aus von der Species des Ricinus zanzibarensis, welche Ricinusart wegen der Größe der Samen eine leichte Entfernung der Schalen mit der Hand gestattet. Hat man eine größere Menge davon zu verarbeiten, so ist wegen einer eventuell möglichen Giftwirkung Vorsicht nötig. (Schutz durch Handschuhe.) Die entschalten Samen werden gemahlen und hierauf mit Äther so lange gewaschen bis der größte Teil des Öles entfernt ist. Das nahezu ölfreie Mehl wird mit 10$^0/_0$iger Kochsalzlösung ausgezogen

und die klare Flüssigkeit dialysiert; der entstandene Niederschlag, der das Globulin enthält, wird behufs weiterer Bearbeitung abfiltriert und das Filtrat mit Ammoniumsulfat gesättigt; dasselbe enthält ein Gemenge verschiedener Körper. Durch die Fraktionierung mit Ammonsulfat und Magnesiumsulfat und die Dialyse konnten diese Autoren feststellen, daß die im Ricinussamen enthaltenen Eiweißkörper 1. aus einem in reichlichen Mengen vorhandenen in Oktaedern krystallisierenden Globulin; 2. aus einem in kleineren Mengen sich vorfindenden zwischen 60 und 70° koagulierenden Albumin und 3. aus Albumosen bestehen; die giftige und agglutinierende Wirkung findet sich nur in den koagulablen Eiweißkörpern und ist niemals enthalten in Präparaten, die frei von Albumin sind. Das Albumin ist der Träger der physiologischen Wirkungen des Ricins, von dem es auch durch die Trypsinverdauung, welche das Ricin schädigt oder zerstört, nicht zu trennen ist. Die von den Autoren mit dem Ricinalbumin erzeugte Giftwirkung war ungleich höher als die eines früher jemals von anderen Forschern „rein" dargestellten Präparates und betrug bei subkutaner Applikation für Kaninchen pro Kilogramm Tier 0,0005 mg.

Dem Ricin schließen sich zwei in ihrer Antigenwirkung ihm scheinbar sehr nahestehende Körper an, das Robin und Curcin. Das erstere Antigen, von Ehrlich benannt und wegen seiner geringen Giftwirkung und der ricinneutralisierenden Wirkung der damit erzeugten Immunsera als Toxoid des Ricins von ihm aufgefaßt, stammte aus der Rinde der falschen Akazie, der Robinia Pseudoaccacia und wurde hier von Power als Phytalbumose gefunden. Man kann dieselbe darstellen, indem man den wässerigen oder salzhaltigen Auszug der Rinde mit Eiweißfällungsmittel behandelt. Das Gift läßt sich sowohl mit Säuren als auch mit Alkohol ausfällen. Beim Erhitzen der wässerigen Lösung, die alle Eiweißkörperreaktionen gibt, tritt Koagulation ein.

Das wegen seiner Zersetzlichkeit noch wenig bearbeitete Curcin, welches in seinen Wirkungen nach Kobert und Siegel sowohl dem Ricin wie dem Crotin nahesteht und immunisierende Eigenschaften haben soll, entstammt dem Samen der schwarzen Brechnuß, Jatropha Curcas, in dessen entölten Anteilen es sich findet.

III. Gewinnung der antigenwirkenden Substanzen aus Crotonsamen.

Das aus dem Samen von Croton tiglium dargestellte giftige Antigen, das Stillmark und Elfstrand nach dem Vorschlage Koberts als Crotin bezeichnet haben, läßt sich in derselben Weise, wie das Ricin, dem es auch in der Wirkung nahe steht, darstellen. Elfstrand, dem wir ausführliche Untersuchungen über die physiologischen Wirkungen der in diesen Samen vorhandenen Eiweiße und diese selbst verdanken, ist bei der Darstellung folgendermaßen vorgegangen: die von ihren Schalen befreiten Samen werden zerstoßen, äußerst fein zerrieben und mit der ungefähr 10 mal größeren Gewichtsmenge 96 %igen Alkohols verrieben; diese dünnflüssige Mischung wird etwa 15 Minuten stehen gelassen und der von dem aufgenommenen Crotonöl gelbgefärbte Alkohol abfiltriert. Der Rückstand wird solange mit Äther gewaschen, bis er von dem extrahierten Ol nicht mehr gelbgefärbt ist. Petroläther empfiehlt sich nicht zur Extraktion, da er den im Öle befindlichen giftigen Anteil nicht vollständig entfernt. Die auf diese Weise entölten Samen werden bei

Zimmertemperatur oder bei gelinder Wärme getrocknet und liefern dann bei vollständiger Extraktion eine weiße, mehlige, geschmacklose Masse, die neben Cellulose und anorganischen Salzen hauptsächlich aus Eisweißstoffen besteht, welche mehr oder minder vollständig entweder mit Wasser, Kochsalz oder Glyzerin in Lösung gebracht werden können. Der mit wasserfreiem Glyzerin hergestellte Extrakt ist am wenigsten wirksam, hat jedoch vor dem Wasser oder Kochsalzextrakt den Vorzug der längeren Haltbarkeit: die wirksame Substanz kann übrigens aus ihm durch Alkoholfällung dargestellt werden. Aus den wässerigen und den Kochsalzextrakten stellte Elfstrand durch Sättigung mit Ammonsulfat oder Magnesiumsulfat, Fällung mit Essigsäure, Alkohol und durch Dialyse wirksame Eiweißpräparate dar, von denen die durch Aussalzen mit Neutralsalzen dargestellten die kräftigste Wirkung entfalteten, während die Säure- und Alkoholfällungen sich als schwächer erwiesen. Von den zwei Eiweißkörpern, welche Elfstrand in dem Gemenge unterschied, war der eine ein Globulin, das Crotonglobulin, der andere ein Albumin, Crotonalbumin, die sich beide, wenn auch möglicherweise in ungleicher Stärke, als giftig erwiesen. Das Gemenge dieser giftigen Crotoneiweiße bezeichnet Elfstrand als Crotin. Albumosen ließen sich nicht nachweisen. Ein kräftig wirkendes und crotonsäurefreies, obwohl nach Elfstrand unreines Crotinpräparat bekommt man, wenn man einen Wasser- oder Kochsalzextrakt aus Crotonsamen, die mit Alkohol und Äther vollständig entölt worden sind, mit Ammonsulfat in Substanz fällt und den Niederschlag bei Zimmertemperatur trocknet. In dieser Weise dürften nach Kobert auch die von der Firma Merck in den Handel gebrachten Präparate dargestellt sein.

Die charakteristischen Wirkungen der beiden Eiweißkörper werden beim Albumin durch die bei 69—70° eintretende Koagulation vernichtet, beim Globulin merkwürdigerweise bei der gleichen Temperatur, wiewohl die Koagulation dieses Eiweißkörpers erst bei 85° C eintritt. Digestion mit Pepsinsalzsäure, sowie mit Salzsäure allein (0,1 %), wie auch mit nicht zu schwachen Alkalien zerstören oder schwächen bedeutend die Crotinwirkung. Wie Jacoby fand, ist das käufliche Pepsin Grüblers bereits in der Kälte und bei neutraler Reaktion imstande, die hämolytische Wirkung des Crotins aufzuheben, ebenso wie der Preßsaft der Magenschleimhaut des Schweines. Dieses Pseudoanticrotin, das von Lust näher untersucht wurde, ist hitzebeständig, pepsinbeständig, nicht dialysabel und gibt keine Biuretreaktion; es ist jedoch nicht imstande antitoxisch zu wirken. Auch die in alten Samen enthaltenen Eiweißkörper können mitunter ihre volle Giftigkeit bewahren. Zu bemerken ist, daß Elfstrand in Crotinlösungen mittels Calciumchlorids wirksame Niederschläge erhielt, die jedoch, sobald sie eiweißfrei gewaschen worden waren, auch ihre Wirkung einbüßten.

IV. Darstellung der Antigene aus Heufieber erregenden Pflanzen*).

Im Blütenstaub einer großen Zahl von Gramineen findet man nach Dunbar ein Gift, das durch Auftragen auf die Schleimhäute des Auges und der Nase bei für Heufieber empfindlichen Individuen einen Heufieberanfall hervorzurufen imstande ist. Es gibt mehr als 100 Arten

*) Siehe Prausnitz pag. 317.

von Gramineen, so wie der ihnen nahestehenden Riedgräser, ferner Maiglöckchen, deren Pollenkörner und zwar sterile sowohl wie getrocknete, bei Heufieberpatienten wirksam sind, während sie auf den Schleimhäuten Normaler wirkungslos bleiben. Dunbar und seine Schüler Prausnitz, Lübbert und Kammann haben dieses Heufiebergift, das als Pollentoxin bezeichnet wird, näher studiert. Während Dunbar ursprünglich glaubte, daß die in den Roggenpollenkörnern vorhandenen Stärkestäbchen die Träger der spezifischen giftigen Substanz sind, stellte sich durch die Untersuchungen von Dunbar selbst und seinen Schülern heraus, daß auch hier die spezifische Wirkung den Eiweißkörpern anhaftet. Die Alkohol- oder Alkoholätherextrakte der Körner sind wirkungslos, das spezifische Gift bleibt in ungeschwächter Kraft im extrahierten Rückstand; die ätherischen Öle wirken andersartig und vor allem auch bei normalen Menschen. Die Pollenstärke ist unwirksam und auch die Pollenkörner, die keine Stärke enthalten, sind wirksam; selbst dann, wenn die Stärkestäbchen, wie bei längerem Lagern von Mais oder Roggenpollen unlöslich werden, läßt sich das spezifische Gift leicht extrahieren. Die Darstellung desselben erfolgt nach Prausnitz derart, daß die Pollen zertrümmert, mit 2,5 $^0/_0$iger Kochsalzlösung ausgezogen werden und diese Aufschwemmung nun zentrifugiert wird. Das Gift befindet sich dann in der überstehenden, leicht opaleszierenden Flüssigkeit; Kammann extrahiert dasselbe aus den Pollen mit 5 $^0/_0$iger Kochsalzlösung bei 37^0. Aus dem Salzextrakte läßt sich das Gift mit Alkohol und durch Ganzsättigung mit Ammonsulfat ausfällen. Durch Kochsalz werden den Roggenpollen alle Eiweiskörper entzogen, welche nach ihrer Löslichkeit in Wasser nach der Fällbarkeit mit Alkohol, Magnesiumsulfat und Ammoniumsulftat in drei Körper zerfallen und zwar in zwei Globuline und einen dritten Körper, der der Menge nach am kleinsten, Albumincharakter besitzt, da er nicht mehr durch Magnesiasulfat, sondern erst durch Ammonsulfat bei voller Sättigung aussalzbar ist. Dieser Körper ist der Träger der spezifischen toxischen Wirkung. Von Interesse ist es, daß dieses Toxin thermostabil ist — es verträgt das Erhitzen bei 70^0 —, und wird durch $^1/_2$stündige Erhitzung auf 75^0 nur um $^1/_4$ geschwächt, daß auch Säurezusatz dasselbe nicht schädigt und daß es sowohl gegen selbst länger dauernde Pepsin-, wie auch Trypsinverdauung relativ resistent ist; es wird geschwächt, jedoch nicht vernichtet. Gegen Alkalizusatz ist das Gift empfindlich und wird von Karbolsäure zerstört. Das Pollentoxin ist sowohl in der Tränenflüssigkeit, als auch im Nasenschleim und im Speichel, wie auch im Blutserum leicht löslich und liefert sowohl bei subkutaner, als auch intravenöser Einspritzung in steigenden Dosen ein bei Heufieberkranken gut wirksames Antitoxin (Pollantin); vom Bindehautsack aus ist jedoch nach Prausnitz keine Immunität zu erzielen.

Billard und Mallet benützten als Antigene Lycopodiumsporen. Dieselben wurden in Seifenwasser gelöst und einer Ente intraperitoneal wiederholt injiziert; das Serum des Tieres hatte bei Heufieberkranken gute Wirkungen. Es erübrigt, zu erwähnen, daß Wolff-Eisner dem Pollengift die Toxinnatur abspricht und dasselbe nur als einen lytisch wirkenden Körper ansieht, der eine Zerstörung der Pollenkörner im Organismus bei Vorhandensein eines passenden Komplements beschleunigt.

V. Darstellung der Antigene aus Amanita phalloides s. Agaricus phalloides.

(Knollenblätterschwamm oder Schierlingspilz.)

Die Giftwirkung dieses Pilzes hat seit jeher großes Interesse erweckt, das sich in den letzten Jahren noch dadurch gesteigert hat, daß Kobert im Jahre 1891 in den wässerigen und Kochsalzauszügen der getrockneten Pilze ein äußerst intensiv wirkendes hämolytisches Gift entdeckt hat, das sogar die am stärksten hämolytisch wirkenden Saponinsubstanzen in der Intensität der Wirkung übertraf. Kobert gibt in der neuesten Auflage seines Buches an, daß das Vorkommen dieses Hämolysins in dem Knollenblätterschwamm entgegen den eigenen früheren Angaben nicht häufig, sondern sogar selten ist, indessen scheinen hier nach Abel und Ford, welche in den von ihnen untersuchten amerikanischen Pilzen regelmäßig das Hämolysin fanden, Speciesschwankungen vorzuliegen. Neuere von Calmette und Ford ausgeführte Untersuchungen zeigen, daß man mit den giftigen Produkten des Pilzes Kaninchen immunisieren könne und daß das Blutserum derart vorbehandelter Tiere sowohl antihämolytische als auch antitoxische Eigenschaften habe; ein besonderes Interesse verdienen diese Gifte durch die in der jüngsten Zeit von Abel und Ford ausgeführten Isolierungsversuche des hämolytischen Prinzips, das sie für ein eiweißfreies, stickstoffhaltiges Glukosid halten.

Die Darstellung des Ausgangsmaterials kann sowohl aus getrockneten, wie aus frischen Pilzen erfolgen, da es sich gezeigt hat, daß entgegen den Angaben Seiberts, eines Schülers von Kunkel, auch die frischen Pilze und zwar sowohl Amanita phalloides als auch eine Abart, Amanita citrina, äußerst kräftige hämolytische Extrakte liefern. Abel und Ford verfuhren bei der Darstellung des empfindlichen Hämolysins aus frischen Pflanzen derart, daß sie drei kleine Pflanzen in einem Mörser unter Zusatz von 15 ccm destillierten Wassers verrieben; das vollkommen farblose, etwas trübe Filtrat wirkt bereits intensiv auf rote Blutkörperchen, zumal, wenn es vor der sekundär auftretenden sauren Reaktion durch Neutralisation bewahrt wird. Diese eiweißhaltige Lösung kann durch Eiweißfällungsmittel noch weiter gereinigt werden. Die meisten Präparate wurden jedoch durch Verarbeitung der getrockneten Pilze erhalten, welche ebenfalls im Mörser mit destilliertem Wasser zerrieben wurden. Diese Digestion wurde zwei Tage am Eis stehen gelassen, hierauf durch Leinen, dann durch Papier und endlich durch Berkefeldkerzen filtriert, um die trockenen Pflanzenreste zu entfernen. Die erhaltenen klaren Filtrate wurden im Vakuum bei einer 35 ° nicht überschreitenden Temperatur eingedampft und das so konzentrierte Extrakt durch partienweise zugesetzten absoluten Alkohol gefällt, so lange noch ein Niederschlag entstand; von dem Niederschlage wurde der überstehende Alkohol so rasch als möglich entfernt, um durch längeren Kontakt keine Schädigung der physiologischen Wirkung herbeizuführen. Der Niederschlag enthält die hämolytisch wirkende Substanz, während sich in dem strohgelbgefärbten alkoholischen Filtrat der tödlich und toxisch wirkende Körper befindet*). Das hämolytische Gift wurde von Kobert als Phallin,

*) Auf Grund dieser Darstellung scheint es mir nicht ausgeschlossen, daß in dem Amanita-Toxin auch das von Kobert beschriebene, für Katzen, Hunde und Kaninchen in sehr geringer Menge bereits tödlich wirkende Alkaloid enthalten war, das ja in die alkoholischen Extrakte nach Kobert übergeht.

von ABEL und FORD als Amanita-Hämolysin, das toxisch wirkende von den beiden letzteren Autoren als Amanita-Toxin bezeichnet. KOBERT, welcher die beiden giftigen Substanzen für alkoholunlösliche Toxalbumine hält, stellt dieselben dar, indem er die zerkleinerten Pilze durch kurzdauernde Extraktion mit Alkohol und dann mit Äther von Fett, Cholin, Lecithin und dem Alkaloid befreit und sie hierauf mit physiologischer Kochsalzlösung, welche die Gifte aufnimmt, digeriert. Die erhaltene Lösung kann durch Dialyse gereinigt werden. Die beiden Gifte, das Phallin oder Amanitahämolysin und das Amanitatoxin, unterscheiden sich nach ABEL und FORD chemisch voneinander, indem das Amanitahämolysin sowohl durch schwache Säuren — eine 0,3 %ige Salzsäure zerstört in zwei Stunden bei 37,5 ° das Hämolysin — als auch durch schwache Alkalien, freilich etwas weniger, als durch Säuren, geschädigt wird; durch Pepsin und Trypsinverdauung, sowie durch halbstündiges Erhitzen auf 65 ° wird es zerstört. Auf Grund dieser Eigenschaften läßt sich schließen, daß das Phallin oder Amanitahämolysin bei den Pilzvergiftungen keine Rolle spielen könne. Dagegen ist das Amanitatoxin viel weniger empfindlich gegen die Einwirkung von schwachen Säuren und Hitze und kann nach ORÉ in den mit schwacher Essigsäure aus getrockneten, sowie aus frischen Pilzen gewonnenen Auszügen gefunden werden; der zurückbleibende Rest der Pilze ist ungiftig. Dieses Gift, das sich auch durch eine große Resistenz gegenüber selbst länger dauernder Einwirkung von Pepsin und Trypsin auszeichnet, ist dasjenige Gift des Pilzes, welches allein bei der tödlichen Wirkung desselben in Betracht kommt.

Der hämolytischen Wirkung des Phallins sind durchaus vergleichbar, wenn auch nicht als Antigene vorläufig erprobt, die aus der Lorchel, Helvella esculenta dargestellte Helvellasäure, welche nur der frischen Lorchel durch heißes Wasser entzogen werden kann und die aus dem Lärchenschwamm, Boletus edulis oder Polyporus offic. stammende Agaricinsäure, deren Wirkung nach NOGUCHI in ähnlicher Weise wie die hämolytische Saponinwirkung aufgehoben werden kann.

VI. Körper pflanzlichen Ursprungs, deren Antigenwirkung nicht feststeht (Saponin Solanin).

Waren die bisher angeführten aus Pflanzen stammenden Körper echte Antigene im Sinne der am Eingange gegebenen Definition, so gibt es Produkte pflanzlichen Ursprunges, welche nach den bisher vorliegenden Tatsachen wohl nicht als Antigene im strengen Sinne des Wortes gelten können, aber in ihren Giftwirkungen mit den bakteriellen Antigenen zahlreiche Beziehungen und Ähnlichkeiten aufweisen und deren Darstellung daher umsomehr von Interesse ist, als gerade die Verwendung dieser Produkte bei dem Studium mancher Immunreaktionen (Hämolyse) sehr viel zu deren Klärung beigetragen hat. Die hier in Betracht kommende Gruppe ist die der stickstoffreien Glykoside, welche auch dadurch bemerkenswert ist, weil in neuester Zeit manche der echten Antigene von einigen Forschern in die Gruppe der Glykoside gerechnet (Amanita-Hämolysin) resp. als diesen nahe stehend aufgefaßt werden (Ophiotoxin). Hier sind auch die Angaben von POHL und KOBERT, daß nach wiederholter Subkutaninjektion von Solaninum hydrochloricum und nach intravenöser Injektion von Quillajasäure und Sapotoxin eine Erhöhung der

natihämolytischen Wirkung respektive eine Resistenzerhöhung eintritt, zu verzeichnen. Von den uns hier interessierenden Glykosiden seien nur angeführt das Saponin respektive Sapotoxin und das Solanin, welche beide zu den am stärksten hämolytisch wirkenden Blutgiften gehören.

Die Zahl der saponinhaltigen Pflanzen beläuft sich auf mehr als 200 und die Saponine finden sich in allen Pflanzenteilen, so in den Wurzeln, Knollen, Rinden, Früchten, Samen und Blättern. Die bekanntesten sind die aus Senegawurzeln, aus Quillaja und Guajakrinden und den Samen der Kornrade (Agrostemma Githago) dargestellten Präparate. Die meisten Saponine sind in Wasser löslich, unlöslich in Äther, Benzol, Schwefelkohlenstoff und Chloroform; in kaltem absoluten Alkohol sind sie zumeist ebenfalls unlöslich, während sie sich im warmen, verdünnten Alkohol sehr gut lösen. Auf dieses letztere Verhalten gründet sich auch vielfach ihre Darstellung, indem die getrockneten, zerkleinerten Produkte, wenn nötig, behufs Entölung mit Äther ausgezogen und mit wasserhaltigem 70%igen Alkohol in der Hitze oder bei tagelangem Stehen (zwei bis drei Tage) in der Kälte erschöpft werden. Der alkoholische Auszug wird auf dem Wasserbade zu einem dickflüssigen Rückstand eingedampft und mit absolutem Alkohol angerührt, wobei nach allmählichem weiteren Alkoholzusatz sich das feste Sapotoxin ausscheidet. Die Reinigung dieses Rohproduktes kann entweder erfolgen nach der Schraderschen Methode, indem aus den heißen alkoholischen Lösungen durch Abkühlen das gereinigte Produkt abgeschieden wird oder indem man nach Rochleder die konzentrierten, wässerigen Saponinlösungen mit heißgesättigter Baryumhydroxydlösung ausfällt, wobei der erhaltene Niederschlag das betreffende Saponin als Barytverbindung enthält. Eine sehr häufig angewandte Reinigungsmethode ist die nach Kobert und besteht in der Abscheidung des Saponins mit Bleiacetat, wobei manche Saponine mit neutralem, manche mit basischem Bleiacetat ausgefällt werden können. Ein weiteres von Kobert vorgeschlagenes Reinigungsverfahren ist das Aussalzen der wässerigen Lösungen durch Ammonsulfat, wobei die verschiedenen Saponine ein verschiedenes Aussalzungsvermögen aufweisen, so daß sich analog den Eiweißkörpern auf diesem Wege ebenfalls eine Trennung der mannigfachen Saponinpräparate erzielen läßt. Die meisten Saponinsubstanzen kristallisieren nicht und scheinen kolloide Körper von großem Molekül zu sein, die auch nur schwer dialysieren; das Schäumen in wässeriger Lösung ist für sie charakteristisch; selbst bei mehr als 10000facher Verdünnung tritt dasselbe noch auf. Alle Saponinsubstanzen lassen sich beim Erhitzen ihrer Lösungen mit verdünnten Mineralsäuren in eine oder mehrere Zuckerarten, sowie in einen in kaltem Wasser unlöslichen Stoff, Sapogenin, spalten, dem unter Umständen, wie z. B. dem von Brandl und Vierling erzeugten Agrostemma-Sapogenin, sowohl eine toxische, wie auch eine hämolytische Wirkung anhaften kann; derselbe ist noch immer ein hochmolekulärer Körper. Die von Brandl und seinen Mitarbeitern ausgeführten Molekulargewichtsbestimmungen bei dem eben genannten Sapogenin ergaben Zahlen von 605—662, und die aus Quillajasäure, sowie aus Quillajasapotoxin dargestellten Sapogenine solche von 561—591, Zahlen, welche für die Größe des intakten Sapotoxinmoleküls eine Vorstellung geben.

Die hier am meisten interessierende physiologische Wirkung dieser Körper besteht in der bei verschiedenen Saponinpräparaten verschieden ausgesprochenen Hämolyse. Sarasaponin der Sarasaparilla ist nach Schulz noch in einer Verdünnung von 1 : 125 000, Dioscin der Dioscorea nach Honda bei 1:400000, Cyclamin nach Bashford bei 1:300000 bis

1:900000 wirksam, während z. B. Solanin nach KOBERT bei 1:8300 seine Wirkungsgrenze findet und Guajaksaponin eine kaum merkliche hämolytische Wirkung nach Friebös aufweist. Nach RANSOM ist die hämolytische Wirkung zurückzuführen auf eine Bindung des Saponins durch das Cholestearin des Stromas der roten Blutkörperchen, wodurch das Gerüst derselben eine irreparable Schädigung erfährt; nach KOBERT tritt auch die Lecithinsubstanz des Stromas mit dem Saponin zu einer in gleicher Weise deletär wirkenden löslichen Verbindung zusammen, und auch die originellen Versuche von O. PASCUCCI, nach denen Saponin und Solanin die aus einem Gemisch von Cholestearin und Lecithin hergestellten Membranen zu lösen vermögen, deuten in dieselbe Richtung. Dagegen ist das im Serum befindliche Cholestearin durch die Bindung der hämolytischen Komponente des Saponins, des Solanins, Cyklamins und Digitalins (RANSOM, HEDON, NOGUCHI) als antihämolytisches Agens wirksam, wobei die Cholestearinnatur insofern für die Wirkung maßgebend ist, als HAUSMANN zeigen konnte, daß die Besetzung der OH-Gruppe und die Lösung der Doppelbindung im Cholestearin die schützende Wirkung entweder völlig aufhebt oder dieselbe bedeutend beeinträchtigt; ähnliches konnten auch ABDERHALDEN und LE COUNT feststellen. In ähnlicher Weise, jedoch in stärkeren Konzentrationen wie auf rote Blutkörperchen, wirken die Saponine auch auf die weißen Blutkörperchen, auf isolierte Zellen der Leber, Niere, die männlichen Geschlechtszellen der Sipunculiden, die Zellen des Gehirns und Rückenmarks ein; auch hier scheint vielfach der Mechanismus der Wirkung nach KOBERT in Lösung des Cholestearins und Lecithins zu beruhen.

Von der rein hämolytischen ist die allgemeine Giftwirkung zu trennen; sie tritt nach einer Inkubationszeit von vier bis sechs Tagen ein und beruht nach RANSOM auf der Lähmung des cholestearinhaltigen Nervensystems. KOBERT konnte die für Saponine besonders empfindlichen Fische noch in einer Verdünnung von 1:200000 töten.

Zu bemerken bleibt noch, daß es KOBERT gelungen ist, durch 24stündiges Kochen des chemisch reinen Sapotoxins mit Cholestearin ein wasserlösliches, sauer reagierendes Cholestearinsapotoxin herzustellen, das völlig ungiftig ist und sowohl mit verdünnten Säuren, wie auch mit gesättigter Ammonsulfatlösung und Alkohol Niederschläge gibt, welche Reaktionen das von KOBERT verwendete reine Saponin nicht gab. Nach MADSEN und NOGUCHI ist die von diesen Autoren durch Eindampfen zum Trocknen dargestellte, ursprünglich für das Blut unwirksame Saponin-Cholestearinverbindung nur eine höchst lockere, aus der durch Chloroform Cholestearin ausgeschüttelt werden kann, während der zurückbleibende Rest, der mit Säure gespalten, Zucker liefert, hämolytisch wirkt. Eine analoge Saponin-Lecithinverbindung wirkt dagegen sowohl hämolytisch als auch protoplasmatötend.

Das mit den Saponinen eng zusammenhängende Solanin ist ein stickstoffhaltiges alkaloidisches Glycosid, das gut kristallisiert und dem die empirische Formel $C_{52}H_{93}NO_{18}$ zukommt. Doch scheint die Zusammensetzung des Präparates je nach der Provenienz zu wechseln: so besitzt das aus Solanum sodomaeum von ODDO und COLOMBANO dargestellte krystallinische Präparat die Formel $C_{27}H_{47}O_9N$ und ein Molekulargewicht von 543. Bei der Säurespaltung zerfällt das Solanin in einen nicht näher bekannten Zucker, in Galaktose, Rhamnose und Solanidin, welches noch Giftwirkungen besitzt. Es findet sich in den verschiedenen Solanumarten, vor allem in den beerenartigen Früchten der Kartoffel und auch in der Kartoffel selbst

unmittelbar unter der Schale, sowie in den schwarzen Flecken derselben. Die Darstellung erfolgt in verschiedener Weise entweder durch Extraktion mit Alkohol oder mit Säuren, so z. B. nach Oddo und Colombano durch Maceration der zerriebenen Solanumbeeren mit 25 %iger Schwefelsäure. Aus dem Filtrat fällt man mit Natronlauge oder Kalilauge den solaninhaltigen Niederschlag aus, der getrocknet und gepulvert, mit Alkohol ausgekocht wird; aus letzterem fällt dann beim Abkühlen das krystallinische Solanin in Nadeln aus, welches durch wiederholte Kristallisation aus 80 %igem Alkohol gereinigt werden kann.

Von großem Interesse ist die Beobachtung von W. Hausmann und O. Wozasek, daß die hämolytische Wirkung des Solanins durch Einleiten von Kohlensäure aufgehoben werden kann, wobei sich Solaninchlorhydrat und Solanincitrat gleich verhalten. Dagegen wird Sapotoxin durch Kohlensäure nicht entgiftet; das Vertreiben der Kohlensäure durch Luft stellt die hämolytische Wirkung wieder her. Daß die saure Reaktion des Milieus die Hämolyse durch das Solanin behindert, während Alkali die Wirkung fördert, geht aus den Untersuchungen von Hedon, Pohl und Bashford hervor. Saures phosphorsaures Natron, saures schwefelsaures Natron, verschiedene freie Säuren, sowie die sauer reagierenden Aminosäuren Glykokoll und Asparagin stören die Solaninhämolyse; durch die Aufnahme der sauren Produkte wird nach Hedon das Stroma der Blutkörperchen derart verändert, daß es für das Solanin in jenen Dosen, welche noch bei neutraler Reaktion die Wirkung auszuüben vermögen, impermeabel wird.

C. Gewinnung der Antigene aus tierischen Zellen, Säften und Geweben.

Unter die hier zu besprechenden Antigene sind zu zählen die aus den roten und weißen Blutkörperchen und Blutplättchen dargestellten, ferner die aus den verschiedenen tierischen Sekreten und Gewebsflüssigkeiten gewonnenen, teils giftigen, teils ungiftigen, z. T. auch fermentativen Antigene, und endlich die aus einzelnen Organen und Organzellen, respektive aus ganzen tierischen Organismen durch verschiedene Extraktionsmittel erhaltenen antigenen Substanzen. Auch hier handelt es sich, soweit unsere bisherigen Kenntnisse reichen, zumeist um kolloide Stoffe von Eiweißcharakter, wenn es auch nicht bei manchen, so bei den aus roten Blutkörperchen dargestellten antigenartigen Substanzen und bei manchen tierischen toxischen Antigenen an Isolierungsversuchen fehlt, deren Resultate diese Substanzen scheinbar in andere Körperklassen einreihen. Da bei vielen hierher gehörenden Antigenwirkungen bereits sehr kleine Substanzmengen genügen, um immunisatorische Effekte hervorzurufen, so reichen meistens auch hier wässerige oder salzhaltige Extrakte der betreffenden Zellen aus, welche in der Regel eine ausreichende Menge an den entsprechenden Antigenen besitzen. In den meisten Fällen aber verwendet man direkt die Aufschwemmungen der betreffenden Zellen, welche zumeist vorher von der Gewebsflüssigkeit durch Waschen mit isotonischer Salzlösung und durch Zentrifugieren gereinigt worden sind; handelt es sich um Antigene, welche in den Gewebssäften, respektive Sekreten vorkommen, so werden diese im sterilen Zustande gewonnen, als solche zur Vorbehandlung der Versuchstiere verwendet, wie z. B. die verschiedenen tierischen Eiweiße, die zur Erzeugung der Präcipitine dienen, oder die giftigen Sekrete, wie z. B. das Schlangengift. Die Gifte erfahren, wie bereits früher erwähnt wurde, um praktisch bequem als Antigene verwendet zu werden, auch

hier vielfach eine vorhergehende Abschwächung durch chemische oder physikalische Methoden.

Bezüglich einzelner seltener Methoden, welche bei der Darstellung der hier einschlägigen Antigene zuweilen verwendet worden sind, muß natürlich auf die speziellen Kapitel dieses Handbuches verwiesen werden*); hier sollen in großen Umrissen nur diejenigen physikalischen und chemischen Darstellungsmethoden beschrieben werden, welche bei der Verarbeitung der hierher gehörenden Substrate auf Antigene im allgemeinen in Betracht kommen. Es ist von vornherein klar, daß es sich auch hier in den meisten Fällen nicht um die Erzeugung eines einzigen Antigens handelt, sondern daß durch die Verwendung von Substraten, die keineswegs chemische Individuen darstellen, immer eine ganze Reihe von antigenwirkenden Substanzen zur Wirkung im Organismus kommt.

1. Darstellung der Antigene aus roten Blutkörperchen.

Für die Darstellung der roten Blutkörperchen verwendet man gewöhnlich Blut, das auf irgend eine Art defibriniert wurde. Das Defibrinieren des Blutes kann entweder durch Schlagen mit einem Holz- oder Glasstab stattfinden oder durch Schütteln in verschlossenen Kolben, welche entweder mit Glasperlen, mit Bleischrot oder mit kleinen Ballen von Eisendrehspänen beschickt worden waren. Diese Materialien können vorher auch sterilisiert werden. Man kann auch statt des Defibrinierens in besonderen Fällen gerinnungshemmende Agentien verwenden, welche insbesondere bei der Darstellung der Leukozyten aus dem Blute eine große Rolle spielen und daher an dieser Stelle genauer besprochen werden sollen. Hier sei erwähnt, daß insbesondere die Anwendung kalkfällender Mittel, so des oxalsauren Natrons oder Ammons oder Kaliums in 0,5—1 %iger Lösung und des von E. Freund eingeführten zitronensauren Natriums oder Kaliums in ca. 0,4 %iger Lösung sehr gute Dienste bei der Isolierung der roten Blutkörperchen leisten kann; von diesen Mitteln ist das zitronsaure Natrium vorzuziehen, da die Oxalate bei den Immunreaktionen vielfach störend wirken; nach Petterson z. B. hemmt das Oxalat die Alexinwirkung. Ehrlich benützt zitronsaures Natron in der Weise, daß er das Blut in eine mit zitronsaurem Natron gemischte Kochsalslösung einfließen läßt.

Sind die Blutkörperchen auf die eine oder andere Art dargestellt worden, so müssen sie von dem anhaftenden Serum befreit werden; dies geschieht in der Weise, daß sie in isotonischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und dann zentrifugiert werden; die abgeheberte Waschflüssigkeit wird durch eine frische Kochsalzlösung ersetzt, und die so hergestellte Blutkörperchensuspension abermals zentrifugiert; dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt. Die Isotonie richtet sich natürlich nach der verwendeten Blutkörperchenart; für Säugetierblutkörperchen gilt im allgemeinen ein Gehalt von 0,9 % als isotonisch; nach Morgenroth zeigen Hunde und Pferdeblutkörperchen sehr häufig bei einem Kochsalzgehalt von 0,85 % bereits eine geringe spontane Hämolyse; stärkerer Salzgehalt hindert anderseits nach Markl u. a. (siehe den 2. Teil dieser Abhandlung) die spezifischen hämolytischen Phänomene. v. Dungern ging bei der Isolierung von Taubenblutkörperchen so vor, daß er das defibrinierte Taubenblut wiederholt nach Zusatz der 10fachen Menge einer etwa 2 %igen Lösung von Natriumsulfat zentrifugierte. Man kann selbst für

*) Siehe Sachs dieses Handbuch pag. 244.

hämolytische Versuche Blutkörperchen einige Zeit — bis zwei Tage — auf Eis gut brauchbar erhalten.

Die einzelnen Bestandteile der roten Blutkörperchen, das Stroma und das Hämoglobin, wurden von zahlreichen Forschern getrennt zur Antigenerzeugung benützt, um festzustellen, ob den verschiedenen Komponenten auch verschiedene Wirkungen zukämen. Derartige Untersuchungen haben u. A. v. Dungern, Sachs, Nolf, Ford und A. Klein ausgeführt und insbesondere der letztere suchte eine Trennung der verschiedenen, aus den roten Blutkörperchen extrahierbaren Antigene (Agglutinogene, Präzipitinogene und hämolytischer Antigene) zu ermöglichen.

Das Hämoglobin wird dabei in der Weise dargestellt, daß die in der früher beschriebenen Weise isolierten Blutkörperchen einfach unter Umrühren im destillierten Wasser gelöst werden; dabei soll, wie Nolf dies tut, etwa das drei bis vierfache desjenigen Volums an Wasser verwendet werden, als die ursprüngliche Blutmenge betrug, aus welcher die roten Blutkörperchen stammten, um die Bildung von Klümpchen zu verhindern, welche sich sonst schwer lösen und das Hämoglobin hartnäckig festhalten. v. Dungern verwendet die sechsfache Wassermenge, wobei die Stromata und die Kerne (der Taubenblutkörperchen) sich schön abscheiden, was durch Schütteln mit etwas Äther beschleunigt werden kann. Die Darstellung des Hämoglobins kann weiter zweckmäßig durch wiederholtes Gefrierenlassen und Auftauen der gewaschenen roten Blutkörperchen oder nach der alten Hoppe-Seylerschen Methode in der Weise erfolgen, daß die gewaschenen Blutkörperchen mit zwei Volumen Wasser angerührt und dann mit Äther geschüttelt werden. Man kann auf diese Weise leicht aus Pferde- eventuell Hundeblut das Hämoglobin kristallinisch gewinnen, indem man nach Abgießen des Äthers und Verdunstenlassen des von der lackfarbigen Blutlösung zurückgehaltenen Äthers in offenen Schalen die Lösung bei 0° C abkühlt und mit $^1/_4$ des Volumens ebenfalls bei 0° C abgekühlten Alkohols unter Umrühren versetzt; aus dieser Lösung, die einige Tage bei 5 bis 10° C stehen bleiben soll, scheiden sich Hämoglobinkristalle ab, die aus wässeriger Lösung durch erneuerten Alkoholzusatz leicht umkristallisiert werden können. Ide benützte als präcipitinogenes und hämolytisches Antigen ein Rinderhämoglobin, das er analog der Methode von Hofmeister-Schulz reinigte, indem er die nach den eben gegebenen Vorschriften (Lösen der gewaschenen roten Blutkörperchen in destilliertem Wasser unter Ätherzusatz) hergestellte Blutlösung mit festem Ammonsulfat sättigte. Die Lösung dieses Niederschlags wird der Dialyse unterworfen. Verwendet man Pferdehämoglobin, so kann man nach der Methode von Schulz leicht Hämoglobinkristalle erhalten, wenn man, am besten unter Eiskühlung, das halbgesättigte globulinfreie Filtrat zu Kristallisation hinstellt; die Kristallisation tritt manchmal bereits nach wenigen Stunden, manchmal nach 24 Stunden ein, manchmal erst nach zwei bis drei Tagen. In gleicher Weise, wie das Pferdehämoglobin kristallisiert auch leicht das Kaninchenhämglobin, während Gänsehämoglobin nur unvollkommen und Ochsenhämoglobin gar nicht kristallisiert (Schulz). Das durch Aussalzen mit Ammonsulfat erhaltene Oxyhämoglobin geht nach Dittrich allmählich in Methämoglobin über. Neben den bisher genannten Methoden, Hämoglobin aus roten Blutkörperchen darzustellen, hat auch die nach Schuurmans-Stekhoven Interesse, bei welcher die Zerstörung der roten Blutkörperchen rein mechanisch, nämlich durch Schütteln mit Astbestflocken erfolgt. Auch hat Klein durch Zerreiben von roten Blutkörperchen, die mit der vier- bis achtfachen Menge 0,85 $^0/_0$igen

Kochsalzlösung aufgeschwemmt worden waren, mit Quarzsand Hämoglobinlösungen hergestellt und als Antigen verwendet. Eine weitere Methode, Hämoglobinlösungen zu erzeugen, ist endlich die durch hämolytisch wirkende Sera oder hämolytisch wirkende Organextrakte (Pankreas), Methoden, welche von KLEIN u. a. ebenfalls zur Antigendarstellung benützt worden sind.

Wenn auch das Hämoglobin als Antigen vielfache Verwendung fand, so ist für den Ablauf und den Mechanismus der theoretisch interessantesten Reaktionen, im speziellen der Hämolyse, das Stroma der roten Blutkörperchen das ungleich wichtigere Substrat, da der Hämoglobinaustritt in nahezu allen Fällen der spezifischen Hämolyse nichts anderes ist als der Ausdruck einer Veränderung im Stroma. Daß es auch eine spezifische Stromaagglutination gibt, geht aus A. KLEINs Versuchen zur Evidenz hervor.

Die Methoden der Darstellung der Stromata sind folgende: Nach WOOLDRIDGE werden die isolierten und gut mit 1—2 %iger Kochsalzlösung gewaschenen roten Blutkörperchen mit dem fünf bis sechsfachen Volumen Wasser vermischt und dann etwas Äther zugesetzt, bis anscheinend volle Lösung eingetreten ist; die Leukocyten setzen sich ab und können abzentrifugiert werden. Die von diesen getrennte Flüssigkeit wird nunmehr vorsichtig mit einer 1 %igen Lösung von $KHSO_4$ versetzt, bis sie so dickflüssig, wie das ursprüngliche Blut wird. Die sich nun ausscheidenden Stromata werden auf einem Filter gesammelt und gewaschen. Die verschiedenen Autoren verwendeten mehr oder minder modifiziert diese Methode. UHLENHUT hat das mit Wasser und Äther gewaschene Stroma in 5 %iger Magnesiumsulfatlösung gelöst oder in 1 ‰ HCl, um es als Antigen zu verwenden. NOLF verwendete die von der Hämoglobinlösung abzentrifugierten und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Stromata in Suspension und ähnlich verfuhr auch A. KLEIN.

BULLOCH verfuhr derart, daß er zu den gewaschenen Blutkörperchen das acht- bis zehnfache Volumen destillierten Wassers hinzufügte und dann $^1/_5$ bis $^1/_6$ Volumen Äther; die Mischung wurde in einem Scheidetrichter durchgeschüttelt. Wenn sich die Stromasubstanz auf der Oberfläche der Wasserschichte gesammelt hat, kann die Hämoglobinlösung abgelassen werden. Das Stroma wird mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zentrifugiert.

BORDET isolierte die Stromata derart, daß er 3 ccm der mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Blutkörperchensuspension in 15 ccm destillierten Wasser löste und zu dieser Lösung 1 ccm physiologischer Salzlösung, welcher noch 0,0975 g Chlornatrium zugefügt wurden, hinzusetzte, so daß die gesamte Lösung einen Gehalt von 0,65 % Kochsalz hatte. In dieser Salzlösung scheiden sich die Stromata langsam in weißlichen Flocken ab.

Während bei der gewöhnlichen Auflösung des Blutes in destilliertem Wasser, das Abzentrifugieren der mit Kochsalz verdichteten Stromata äußerst schwierig und selbst bei den günstigen Blutarten nur eine sehr geringe Ausbeute ergibt, hat sich nach H. SACHS in einer vorausgehenden Erhitzung des Blutes ein Mittel gefunden, das wohl durch gewisse Coagulation der Blutzellen das nachherige Zentrifugieren erheblich erleichtert und ein stets reichliches Stromatasediment sichert. Das Verfahren nach SACHS gestaltet sich folgendermaßen: Das zur Verwendung kommende Blut wird im Wasserbade bei 50—60° (die Erwärmungstemperatur wechselt je nach der Blutart, für Ochsenblut bei 60°, für Kaninchen- und

Meerschweinchenblut bei etwa 54°) ½ Stunde lang erhitzt, bis bei dunkelrotbrauner Farbe eben das Lackfarbigwerden des Blutes beginnt. Die nun mit Wasser auf das 6—10fache Volumen gebrachte und geschüttelte Blutlösung wird nach Zusatz von soviel Kochsalz, daß der Gesamtgehalt 1% beträgt, scharf zentrifugiert. Die Stromata sitzen jetzt am Boden des Gefäßes als gelblich-weiße Masse und können durch Zusatz von 0,85%iger Kochsalzlösung und wiederholtes Zentrifugieren mehrmals gewaschen werden. Die so gewonnenen Stromata haben ihre Rezeptoreneigenschaft beibehalten, indem sie sowohl spezifische Serumhämolysine binden als auch im Organismus spezifische hämolytische Immunkörper erzeugen.

Für die Darstellung entfetteter Stromata verfahren Dautwitz und Landsteiner folgendermaßen: 500 ccm frisches geschlagenes Rinderblut wird mit 150 ccm Toluol versetzt, im Scheidetrichter 15—20 Minuten stark geschüttelt und dann absetzen gelassen; nach ein bis drei Tagen bildet sich eine obere rosarote Schicht, die aus einem Magma von Blutkörperchen mit Toluol besteht und gegen die untere wässerige tiefdunkelrote Schicht scharf abgegrenzt ist; diese wird abgelassen und das Magma durch Schütteln mit größeren Wassermengen gewaschen, so daß es rein weiß wird. Man versetzt dann die erhaltene Emulsion mit einem Gemisch von 300 ccm Äther und 150 ccm Alkohol, worauf sich bei kräftigem Schütteln größere braune Flocken als untere Schicht ausscheiden; das lichtgefärbte Äther-Alkohol-Gemisch wird abgehoben. Die Waschung mit Äther-Alkohol wird wiederholt bis die Stromata nur wenig gefärbt sind; dieselben können dann in 0,9%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt verwendet werden.

Nach Pascucci kann man in bequemer Weise die Stromata darstellen, wenn man den aus defibriniertem Blute erhaltenen Blutkörperchenbrei mit dem 15—20fachen Volumen ⅕ gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt und gut umrührt. Man läßt die Blutkörperchen absetzen, hebert die Flüssigkeit ab, zentrifugiert anhaltend und läßt den Bodensatz, auf flachen Porzellanschalen ausgebreitet möglichst rasch bei Zimmertemperatur trocknen. Derselbe wird dann in viel kaltem Wasser verteilt und endlich mit destilliertem Wasser farblos gewaschen. Nach Pascucci stellt das Stroma eine hauptsächlich aus Lecithin und Cholestearin bestehende Membran dar, die den Blutfarbstoff einschließt. Die Hämolyse kommt wahrscheinlich durch Anätzung resp. Auflösung dieser Blutscheibenmembran zustande; diese Möglichkeit hat der Autor an „künstlichen Stromata" geprüft, indem er sich Cholestearinlecithinmembranen herstellte, die durch Verschließen dünner Glasröhrchen durch Seidenstoff bereitet waren, welcher mit Cholestearin, Lecithin oder einem Gemisch beider durchtränkt war. Als Farbstoff diente Hämoglobin oder Cochenille; Saponin, Solanin, Kobragift und Tetanotoxin haben die Membran, wie die natürlichen Blutkörperchen, für den Blutfarbstoff durchgängig gemacht.

Die von den verschiedenen Autoren angestellten Versuche bezüglich der Verschiedenheit der aus den roten Blutkörperchen darzustellenden Antigene, zeigten offenbar in Abhängigkeit von der Darstellung des Materials und der Injektionsdauer, vielfach nicht übereinstimmende Resultate; Nolf hat nach Injektion der Stromata ein agglutinierendes, nach Injektion von Hämoglobin ein hämolytisches Serum erhalten; Ide nach Injektion von Hämoglobin sowohl Hämolyse als auch Präzipitation, Bulloch nach Injektion der Stromata kräftige Hämolysinbildung und Klein bei Immunisierung mit Hämoglobinlösungen (Erythrocytenextrakten) sowohl Hämolysine, als auch Erythropräcipitine und Erythrocytenagglutinine, dagegen keine

Serumpräcipitine und Stromataagglutinine; das gleiche Resultat wird auch mit roten Blutkörperchen bei der Injektion erzielt. Die Immunisierung mit Stromata lieferte Hämolysine, Erythropräcipitine, Erythrocyten- und Stromataagglutinine, dagegen keine Serumpräcipitine; die Stromata wurden durch Serumpräcipitine nicht agglutiniert; Serumpräcipitine und Erythropräcipitine (Hämoglobinpräcipitine) sind nach Klein nicht identisch. Endlich erhielt auch Ford nach Injektion von Kaninchenblutkörperchen bei Meerschweinchen sowohl Blutkörperchenagglutinine als auch Präcipitine auf Lösungen der roten Blutkörperchen.

In bezug auf die Einwirkung von Säuren und Basen auf rote Blutkörperchen verdienen die Versuchsresultate von Landsteiner und v. Eisler einer besonderen Erwähnung; diese Autoren konnten zeigen, daß verschiedene Blutkörperchenarten im allgemeinen gegen Säuren und Basen eine ungleiche Resistenz haben, so daß z. B. Blutkörperchen der Ziege leichter durch sehr verdünnte Säure, aber schwerer durch schwache Lauge gelöst werden als Kaninchen oder Taubenblutkörperchen, so daß die Basen- und Säurenresistenz gewissermaßen spezifische Indices der Blutarten darstellen.

Der Bedeutung der fettartigen Bestandteile der roten Blutkörperchen bei der Antigenbildung und -Wirkung entsprechend wurden von verschiedenen Autoren die Ätherextrakte der roten Blutkörperchen und des Blutes immunisierter Tiere untersucht. So digerierte Martin Hahn Blut von Ziegen und Kaninchen, welche mit Pferde- resp. Rinderblut längere Zeit vorbehandelt worden waren, durch 24 Stunden bei 37 ° und untersuchte die Menge der in die Petrolätherextrakte übergegangenen fettartigen Substanzen*). Während normales Blut nach der Digestion regelmäßig eine Zunahme des Extraktes zeigte, war bei dem Immunblute eine solche Differenz in den zwei darauf untersuchten Fällen nicht zu konstatieren. Präziser konnten Landsteiner und v. Eisler an Petrolätherextrakten gewaschener Blutkörperchen vom Menschen, Pferde, Schweine und Meerschweinchen eine Spezifität der hemmenden Wirkung auf hämolytische Sera nachweisen. Man erhält nach Landsteiner und v. Eisler bei einmaliger Extraktion mit 20 ccm Petroläther aus den Blutkörperchen von 10 ccm Blut beim Eindampfen des Petrolätherextraktes auf dem Wasserbade einen Rückstand im Gewichte von etwa 0,004 g; dieser mußte behufs weiterer Verwendung in 2 ccm frischen Kaninchenserums ca. $1^1/_2$ bis 2 Stunden bei 37 ° C digeriert werden. Später haben Bang und Forssmann gefunden, daß eingetrocknete Ätheraxtrakte aus Blutkörperchen vom Ochs, Pferd und Meerschweinchen eine typische spezifische Hämolyse bedingen, ebenso wie die Ätherextrakte der Stromata. Diese hämolysinbildende Substanz, „der Immunisator“, wird durch Aceton gefällt, ist unlöslich in Alkohol und nach Reinigung mit Aceton auch in Äther, während sie in Chloroform und Benzol löslich ist; dabei verträgt diese Substanz Kochen bei 100 ° und zwar sowohl bei alkalischer, wie auch bei salzsaurer Reaktion. Die Injektion des Immunisators hat keine Agglutinbildung zur Folge. Neben dem Immunisator konnte noch eine zweite alkohol- und acetonlösliche Substanz aus den roten Blutkörperchen gewonnen werden, welche, wie die von Landsteiner und v. Eisler gewonnenen Extrakte, eine die Komplemente neutralisierende Wirkung hatte und sich von dem Immunisator durch Aceton leicht trennen ließ;

*) Auf die Methodik der quantitativen Untersuchung kann hier nicht näher eingegangen werden.

auch diese Substanz, welche als „Neutralisator“ bezeichnet wird, ist kochbeständig. Frouin hat in letzter Zeit Acetonextrakte von Hundeblutkörperchen als spezifische hämolytische Antigene benützt.

Mit dem Namen „Protectine“ hat Noguchi ähnliche, jedoch anscheinend nicht spezifisch wirkende Substanzen bezeichnet, welche sowohl aus frischem Serum als auch aus roten Blutkörperchen, selbst aus solchen Materialien, welche einer Trockenhitze von 150° C ausgesetzt waren, durch Extraktion mit verschiedenen fettlösenden Mitteln (Äther, Benzol, Aceton) gewonnen werden können. Dieselben haben eine antikomplementäre Wirkung, lösen sich auch in 0,9 %iger Kochsalzlösung und sind hitzebeständig.

Es sei endlich an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß Landsteiner und Jagič sowohl die intakten gewaschenen rothen Blutkörperchen als auch die Stromata dazu benützten, um durch Absorption Normal- wie auch Immunagglutinine dem Serum zu entziehen und dieselben so zu reinigen. Durch Digestion der mit Agglutinin beladenen roten Blutkörperchen mit Kochsalz bei 45° lassen sich derartige reine Agglutininlösungen gewinnen und durch Eindampfen im Vakuum, sowie durch Fällung mit Ammonsulfat konzentrieren. In ähnlicher Weise kann man auch aus beladenen Bakterien die Bakterienagglutinine gewinnen und konzentrieren.

Was die quantitative Bestimmung der Hämolyse anlangt, so wurden verschiedene physikalisch-chemische Methoden in Anwendung gebracht, wiewohl in der Regel die einfache makroskopische Feststellung der eingetretenen oder beginnenden Lösung, wie sie Ehrlich und Morgenroth einführten, genügt. Es sei deshalb hier nur angeführt, daß von verschiedenen Autoren (Schur, Halpern) die verschiedenen Hämoglobinbestimmungsmethoden, wie jene nach Fleischl oder Gowers u. a. verwendet worden sind; Centanni konstruierte ein eigenes Hämolysimeter und Petterson suchte die hämolytische Wirkung dadurch sichtbar zu machen, daß er die roten Blutkörperchen mit Gelatine mischte.

2. Darstellung der Antigene aus weißen Blutkörperchen.

Die weißen Blutkörperchen spielen in ihren verschiedenen Formen sowohl bei der Antigenbildung, wie auch bei der Antigenwirkung, sei es direkt oder indirekt, eine so große Rolle, daß es zweckmäßig erscheint, hier die Gewinnung verschiedener, bei der Immunkörperbildung beteiligten und aus den Leukocyten dargestellten Substanzen zu besprechen, wenn sie auch hie und da nicht zu dem engeren Begriffe der Antigene gehören. Bei der Darstellung derartiger Substanzen kann man zumeist die durch die Morphologie streng geschiedenen einzelnen Typen der weißen Blutkörperchen nicht unterscheiden und man verwendet einfach entweder die im Blute der Versuchstiere vorhandenen Leukocyten, die man von den anderen Blutbestandteilen trennt, oder experimentiert mit leukocytenreichen Flüssigkeiten, welche man durch Injektion positiv chemotaktischer Substanzen in der Pleura oder Peritonealhöhle künstlich erzeugt hatte.

A. Technik der Gewinnung von Leukocyten*).

Die Gewinnung der Leukocyten auf dem ersteren Wege findet entweder derart statt, daß man mit Blut arbeitet, welches durch Zusatz gerinnungshemmender Mittel flüssig erhalten wird oder mit Blut, das vorher künstlich defibriniert worden war. Den ersten Weg schlug Lilienfeld ein bei seinen chemischen Leukocytenstudien.

*) Siehe Levaditi II. Band.

Die Methode von LILIENFELD besteht darin, daß dem Aderlaßblut Histon beigemischt wird, welches die Gerinnung verhindert und die Leukocyten intakt erhält; beim Stehenlassen des Blutes setzen sich die roten Blutkörperchen rasch zu Boden. Über der Schicht der roten Blutkörperchen sammeln sich die weißen Blutkörperchen und bilden, insbesondere beim Zentrifugieren eine scheibige Masse, die sich gut isolieren läßt.

Die zweite Methode, wie sie in neuester Zeit von HAMBURGER bei seinen gemeinsam mit HEKMA ausgeführten Studien über Phagocytose benutzt worden war, wird folgendermaßen ausgeführt: Das durch Aderlaß aus der Vena jugularis des Pferdes strömende Blut wird in mit Glasscherben beschickten Flaschen aufgefangen und so lange geschüttelt, bis das Fibrin sich abgeschieden hat; gewöhnlich genügen hierzu 10 Minuten. Das ausgeschiedene Fibrin samt den darin eingeschlossenen Glasscherben wird durch Gaze koliert, das Blut in hohe Zylinder gebracht und $^1/_2$ bis 1 Stunde absetzen gelassen. Nach dieser Zeit bilden sich drei Schichten, von denen die untere, ca. die $^1/_2$ der ganzen Flüssigkeitssäule ausmachende, hauptsächlich aus roten Blutkörperchen besteht. Auf diese Schicht folgt eine schmale weiße, welche nahezu nur aus weißen Blutkörperchen zusammengesetzt ist, und als letzte, oberste Schicht folgt das trübe Serum, in welchem sehr viele rote und weiße Blutkörperchen enthalten sind. Sowohl diese Schicht, wie auch die mittlere werden mit einer mit Gummischlauch versehenen Pipette abgehoben, was deshalb kurz nach der eben erfolgten Schichtenbildung geschehen soll, weil bei längerem Stehenlassen durch Senken von zahlreichen Leukocyten die mittlere Schicht zu kompakt wird und sich dann nur schwierig abhebern läßt. Die abgeheberte trübe Flüssigkeit wird zentrifugiert, wobei jedoch kräftiges und zu langes Zentrifugieren deshalb vermieden werden soll, weil sonst die Leukocyten zu sehr zusammenkleben. HAMBURHER und HEKMA wenden ein 5 Minuten langes Zentrifugieren an bei einer gewöhnlichen Runneschen Wasserzentrifuge von 600—800 Touren in der Minute. Das über dem gebildeten Sedimente stehende mehr oder minder klare Serum wird abgegossen und in dem geringen zurückbleibenden Rest der Bodensatz, der noch Erythrocyten neben den die Hauptmasse bildenden Leukocyten enthält, aufgeschwemmt. Diese aus verschiedenen Zentrifugiergläsern in gleicher Weise erhaltenen Suspensionen werden zusammengegossen und $^1/_2$ bis 1 Stunde stehen gelassen; dadurch senken sich die roten Blutkörperchen zu Boden, während die Leukocyten suspendiert bleiben. Auf diese Weise wird eine Leukocytensuspension erhalten, welche drei Arten von Leukocyten enthält: 1. große Zellen mit großen Kernen (Mastzellen), 2. mittelgroße Zellen und 3. kleine Zellen (Lymphocyten). Nur die mittelgroßen Zellen sind phagocytär.

HAMBURGER und HEKMA haben mit diesem Leukocytenmateriale quantitative Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Agentien auf die Phagocytose angestellt. Die von ihnen dabei angewandte Methode, bezüglich deren Einzelheiten auf das Original verwiesen werden muß, beruht darauf, daß fein pulverisierte Holzkohle der Phagocytose durch die Phagocyten ausgesetzt wird und die mit Kohle beladenen Phagocyten in mikroskopischen Präparaten mittels Okularnetzmikrometers auf verschiebbarem Objekttisch gezählt werden. Dabei zeigt sich, daß ein Wasserzusatz, welcher einer geringen Herabsetzung des osmotischen Druckes der Blutflüssigkeit entspricht, bereits eine deutliche Abnahme der Phagocytose erzeugt, jedoch daß durch Zurückführen der so geschädigten Zellen in ihr eigenes unverdünntes Serum das phagocytäre Vermögen wieder

hergestellt wird; die dabei beobachtete Resistenz gegen über dem Wasserzusatze ist größer als bei den Erythrocyten.

Die zweite Methode der Leukocytendarstellung wurde in den zahlreichen Versuchen verwendet, welche einerseits den Nachweis bakterizider, von den Leukocyten produzierter Substanzen zum Ziele hatten, andererseits die Leukocyten als Testobjekte zum Nachweise spezifischer toxischer Wirkungen, so der Leukocidine von van de Velde und Denys, benützten*). Zur Anreicherung der Leukocyten in der Brust- oder Bauchhöhle dienten neben abgetöteten Kulturen und Bakterienproteinen verschiedene Eiweißkörper, wie Glutenkasein aus Weizenkleber, Legumin aus Erbsen, deren positiv chemotostische Wirkung durch Buchner und Roemer nachgewiesen worden war. Während in den ersten Arbeiten van de Velde einfach bei 120° abgetötete Staphylokokkenkulturen in die Brusthöhle von Kaninchen injizierte, um leukocytenreiche Exsudate für die Prüfung seiner Leukocidine zu erhalten, wurde später nach dem Beispiele Buchners zumeist das als Handelspräparat bequem erhältliche, aus Weizenkleber dargestellte Aleuronatpräparat (Glutenkasein) zur Injektion verwendet. Dasselbe ist in trockenem Zustande fast wasserunlöslich, löst sich dagegen, zumal in frisch aus der Laugedigestion mit verdünnter Salzsäure hergestellter Fällung, leicht bei Zusatz von einigen Tropfen Soda; ein oder einige wenige Kubikzentimeter einer 5—10 $^0/_0$igen schwach alkalischen Lösung dieses Präparates rufen bei intrapleuraler oder intraperitonealer Injektion ein äußerst leukocytenreiches Exsudat hervor. Die Technik dieser Methode gestaltet sich nach der von Gengou gegebenen Vorschrift folgender maßen: Glutenkasein wird fein zerrieben, dann in Dosen von 1:10 in 0,5 $^0/_0$iger Soda auf 100° erhitzt. Nach $^1/_2$ Stunde wird das Gemisch auf 2—3 Stunden auf ein bei 55° gehaltenes Wasserbad gesetzt; die hier erhaltene gelbliche, sehr trübe Flüssigkeit, die eine große Menge des Kaseins gelöst enthält, wird 2 Tage hintereinander durch $^1/_4$ Stunde bei 100° sterilisiert und hierauf zur Injektion benützt. Davon genügen 2—4 ccm bei Kaninchen und 10—14 ccm bei Hunden für jede Pleura, um reichliche Leukocytose zu erzielen. Doch wechseln die Leukocyten, je nach der Zeit, wann das Exsudat entnommen wird, indem nach den ersten 24 Stunden hauptsächlich polynukleäre, nach 2—3 Tagen hauptsächlich mononukleäre Leukocyten vorhanden sind. Durch Injektion gewaschener roter Blutkörperchen vom Meerschweinchen in die Pleura des Kaninchens kann man nach ca. 2 Tagen (die injizierte Menge beträgt 2 ccm pro Pleura) ein außerordentlich visköses Exsudat erhalten, das neben Fibrin eine reiche Anhäufung großer, einkerniger Leukocyten (Macrophagen) zeigt. Die weitere Verarbeitung des aseptischen Exsudats geschieht derart, daß dasselbe zunächst zentrifugiert wird; die abgeschiedenen Leukocyten werden mit physiologischer Kochsalzlösung zweimal gewaschen und nach dem letzten Zentrifugieren in der ihrem ursprünglichen Volumen entsprechenden Bouillonmenge oder in einer für ihre weitere Verarbeitung zweckentsprechenden Flüssigkeit aufgeschwemmt. Tarrasséwitsch erhielt Exsudate mit polynukleären Leukocyten u. a. auch durch subkutane Injektion von Silbernitrat, dagegen an mononukleären Leukocyten reichen Eiter bei subkutaner Injektion von Terpentinöl; die reichlichste Produktion — bis zu 50 ccm und mehr — beginnt am dritten und vierten Tage. Opie, der sich vor kurzem mit der Darstellung von Enzymen aus Leukocyten beschäftigt

*) Siehe Levaditi pag. 222.

hat, gibt an, besonders leukocytenreiche Exsudate durch intraperitoneale Injektion von einer Mischung von 5 g Aleuronat, 15 g Stärke und 100 ccm Wasser erhalten zu haben.

Eine andere Methode, um Leukocyten möglichst vom Serum isoliert zu erhalten, hat M. Hahn angewendet: derselbe hat Schwämme oder Wattebäusche, welche mit chemotaktischen Substanzen durchtränkt waren, so mit Aleuronatstärkebrei, Glutenkasein oder einer 5 %igen Lösung von zimmtsaurem Natron unter aseptischen Kautelen in die Bauchhöhle von Kaninchen eingeführt und nach 24 Stunden wieder herausgenommen; die mit der Darmwand meist verlöteten Schwämme, die sich in der Regel steril erwiesen, enthielten eine große Menge von Leukocyten, die denselben durch Extraktion mit steriler Kochsalzlösung entzogen werden konnten.

Neben den genannten Stoffen wurde eine große Zahl anderer Substanzen zur Herstellung von Hyperleukocytose und Hypoleukocytose verwendet, um die Beeinflussung der Antigenbildung und Wirkung durch die Leukocyten experimentell zu studieren. Da die Kenntnis der verschiedenen Substanzen, welche auf die Leukocyten einwirken, sowohl bei chemischen als auch experimentellen Arbeiten mit Antigenen von Wichtigkeit ist, mögen einige der sowohl positiv wie negativ chemotaktischen hier angeführt sein. Wir verdanken die Kenntnis der hierher gehörigen Substanzen insbesondere den Arbeiten von Massart und Bordet, Gabritschewsky und Buchner. Die betreffenden Substanzen sind in nachfolgender Tabelle übersichtlich zusammengestellt:

Substanzen mit positiver Chemotoxis:

Glutenkasein aus Weizenkleber in 5—10 %iger Lösung nach Buchner.
Legumin aus Erbsenmehl in 5—10 %iger Lösung nach Buchner.
Alkalialbuminate in 5—10 %iger Lösung aus Muskel, Lungen-, Nieren- und Lebergewebe . . . . nach Buchner,
Hefenuklein resp. Nukleinsäure . . . . nach Hahn,
Leucin . . . . nach Massart und Bordet und Buchner,
Glykokoll . . . . nach Buchner,
Papayotin 1 % (für Kaninchen) . . . . . nach Gabritschewsky,
Kulturen von Staphylokokken, Milzbrand, Typhus, Hühnercholera (bei Fröschen), Bacillus pyocyaneus, prodigiosus, Schweinerotlaufbazillen } nach Massart und Bordet und Gabritschewsky,
und nach Buchner die Proteide des Pyocyaneus in 8 %iger Lösung; die vorher genannten in lebendem, wie abgetötetem Zustande;
Choleraspirillen (abgetötet) Finkler-Prior-Bacillus . . nach Borissow,
Diplokokkenkultur (abgetötet) . . . . nach Mata Coco.

Substanzen mit negativer Chemotoxis oder ohne Wirkung.

1 % Eiweißpepton (Albumosen) (Grübler) nach Buchner und Gabritschewsky,
Kreatin . . . . , ... nach Massart und Bordet,
Kreatinin . . . . nach Massart und Bordet,
Allantoin . . . . nach Massart und Bordet.
Bouillon,
Galle, Blut, Humor aquaeus, Glykogen . . . nach Gabritschewsky,
Papayotin 1 % (für den Frosch) . . . . . nach Gabritschewsky,
10 %ige Lösungen der Salze des Natr. und Kalium nach Gabritschewsky,
Glyzerin 1—10 %; Alkohol 10 % . . . . . nach Gabritschewsky,
Chinin 0,5 %ige Lg., Antipyrin 1 % . . . . nach Gabritschewsky,
Phloridzin 1 %; Jequirity (wässerige Maceration) nach Gabritschewsky.
Desilliertes Wasser,
Milchsäure von 0,1—10 %; Karbolsäure . . nach Gabritschewsky,
Karminpulver in H_2O aufgeschwemmt nach Gabritscewsky u. Bordet,
Tyrosin (1 %), Skatol (1 %), Harnstoff (5 %), Trimethylamin (2 %); buttersaures, valeriansaures, harnsaures Ammoniak (1 %), Ammoniak (2 %) . . . . } nach Buchner,
Hühnercholera . . . . nach Gabritschewsky,
Tuberkelbazillus (beim Hunde) . . . . . nach Borissow.

Zahlreiche von diesen Mitteln und noch andere, hier nicht angeführte, wurden angewendet, um einerseits durch die Leukocytenvermehrung, andererseits durch die eintretende Verminderung eine eventuelle Steigerung oder Abnahme der Antigenproduktion (Bakterizidie, Agglutination usw.) zu prüfen; viele von den angeführten Mitteln erzeugen allgemeine Leukocytose, sei es bei subkutaner, sei es bei bei intravenöser Applikation. So erfolgt nach Buchner bei täglicher intravenöser Injektion von 2 ccm einer 8 %igen Lösung von Pyocyaneusprotein eine ca. siebenfache Vermehrung der weißen Blutkörperchen, bei subkutaner Injektion von Glutenkasein (täglich 5 ccm einer 10 %igen Lösung) eine Vermehrung um das 3,2fache und bei intravenöser Injektion von Alkalialbuminat aus Kalbsmuskel um das dreifache. Eine wiederholte Anwendung zur Erzeugung von allgemeiner Hyperleukocytose in ihrem Zusammenhange mit der Antigenwirkung und Bildung hat das Pilokarpin, Spermin und Hetol, d. i. zimmtsaures Natron gefunden (siehe u. a. Loewy und Richter, P. Th. Müller). Endlich wäre noch an die durch Blumreich und Jacoby erzielte Hyperleukocytose und nachfolgende Erhöhung der Bakterizidie des Blutes nach Milzexstirpation zu erinnern, andererseits an die von Levy und Steinmetz durch Injektion von Milzextrakt herbeigeführte Hyperleukocytose.

Eine entgegengesetzte Wirkung tritt bei intravenöser Injektion und zwar im unmittelbaren Anschluß daran auf, wenn man die im Wittepepton oder anderen Albumosengemengen (früher Peptone) vorhandenen leukolytisch wirkenden Substanzen verwendet; dieselben wirken insbesondere intensiv beim Hunde, wo sie in Mengen von 0,3 g pro Kilogramm Tier verwendet, neben Hypoleukocytose auch noch andere schwere Giftwirkungen (Gerinnungshemmung, Blutdrucksenkung usw.) herbeiführen. Nach Jacob genügen zur Erzeugung von Hypoleukocytose bei Kaninchen 0,1—0,5 g bei subkutaner, 0,02—0,08 g bei intravenöser Einführung von Albumosen; doch tritt in vitro, wie auch Tchistowich findet, keine leukolytische Wirkung derartiger „Peptonlösungen“ ein. Nach Bordet ist ein ungemein wirksames Mittel zur Erzeugung von Hypoleukocytose die intravenöse Injektion von Bakterien; nach anderen ein längerer Aufenthalt der Versuchstiere in kaltem Wasser; doch scheint letzteres kein zuverlässiges Mittel zu sein. Dagegen ist, wie ebenfalls die Versuche Bordets zeigen, die intravenöse Injektion von Karminpulver in vielen Fällen — nicht in allen — imstande, eine intensive Hypoleukocytose zu erzielen; dabei wurden 0,5 g Karmin in 10 ccm einer 0,6 %igen Kochsalzlösung gelöst und 0,1 ccm davon genügt, um die Zahl der Leukocyten innerhalb 2 Stunden von 11000 auf 3000 herabzudrücken. Nach Untersuchungen Eisenbergs ist die negative Chemotaxis, welche einige Mikroben ausüben, auf ein Leukocidin zurückzuführen, das unter bestimmten Bedingungen von diesen sowohl in vitro, wie im Organismus abgeschieden wird und insbesondere menschliche Leukocyten, weniger Kaninchenleukocyten und nahezu gar nicht Meerschweinchenleukocyten beeinflußt.

Während die eben angeführten Mittel, im speziellen die Albumosen, nach den Angaben von Delezenne u. a. die Leukocyten in vivo schädigen, sowie dieselben auch im defibrinierten und geronnenen Blute zugrunde gehen, giebt es auch Substanzen, welche eine ausgezeichnete konservierende Wirkung auf dieselben sowohl in vivo, wie auch in vitro ausüben und welche bei den Untersuchungen über die Rolle der Leukocyten bei der Baktericidie und Immunität hie und da verwendet worden

sind. Dazu gehört vor allem das LILIENFELDsche Histon, das bereits HAHN zur Konservierung der Leukocyten im direkt aus der Carotis entnommenen, durch die Histonwirkung ungerinnbaren Blut benützte, und ferner nach WRIGHT, BOSC und DELEZENNE auch Blutegelextrakt, dessen Zusatz zum Blute den Leukocyten durch mehrere Tage, ja Wochen deren volle Beweglichkeit bewahrt. Es ist dazu freilich nötig, alle anderen schädigenden Einflüsse fernzuhalten, so z. B. keine an Alkalien reichen Glassorten zu derartigen Versuchen zu benützen (Verwendung von Quarzgefäßen oder Geräten aus Jenaer Glas).

B. Technik der Darstellung antigenwirkender Substanzen aus Leukocyten.

Die Verarbeitung der mit Hilfe der früher beschriebenen Methoden gewonnenen Leukocyten kann in verschiedener Weise stattfinden. Die hier anzuführenden Darstellungsweisen wurden zumeist gelegentlich der Erzeugung bakterizider Substanzen aus den Leukocyten eingeschlagen und sind folgende:

Verfahren von BUCHNER: Dasselbe beruht auf der Sprengung der Leukocyten, welche eintritt, wenn man die gefrorenen Zellen rasch bei einer höheren Temperatur wieder auftauen läßt, und wird ausgeführt, indem man die mit Bouillon hergestellte Suspension der Leukocyten in eine Eiskochsalzmischung auf 2 bis 3 Stunden versenkt. Hierauf wird die nunmehr gefrorene Leukocytensuspension so rasch als möglich in einen Brutschrank bei 37 ^{0} gebracht, woselbst sie durch 24 Stunden belassen wird; auf diese Weise können die Alexine in Freiheit gesetzt werden. Nach SCHATTENFROH kann auch eine wirksame Extraktion erzielt werden, wenn die Zellen 1 — 2 Tage in der Kälte mazeriert werden.

Das Verfahren von SCHATTENFROH besteht darin, daß die in der früher geschilderten Weise gewonnenen und gründlich gewaschenen Leukocyten in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt entweder durch halbstündiges Erwärmen auf 60^0 extrahiert werden, oder indem die zerriebenen Zellen durch 2—3 Stunden bei 37^0 mit physiologischer Kochsalzlösung digeriert werden. Die Zellen müssen vorher getrocknet werden und können dann mit Quarzsand zerrieben werden ohne ihre bakterienfeindlichen Eigenschaften einzubüßen.

Das Verfahren von LÖWIT ist ebenso wie das von SCHATTENFROH ein Extraktionsverfahren der möglichst sorgfältig isolierten Leukocyten, welche mit feinem Glaspulver derart zerrieben werden, daß bei mikroskopischer Untersuchung keine intakten Leukocyten nachweisbar bleiben. Dieses Gemenge wird in 5—10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, und die festen Partikelchen werden durch die Zentrifuge entfernt; man erhält eine trübe, von Zellelementen völlig befreite Flüssigkeit, welche auch nach der Filtration durch Filter oder poröse Wände trüb bleibt; sie reagiert leicht alkalisch, enthält nur wenig hitzekoagulable Eiweißkörper und giebt mit Essigsäure eine flockige Fällung, welche in verdünnter Salzsäure löslich ist. Diese Flüssigkeit sollte nach LÖWIT bakterizide Eigenschaften, welche selbst bei Kochhitze bestehen bleiben, aufweisen. Doch ist nach SCHATTENFROH das Zerreiben mit Glaspulver infolge der schädigenden Alkaliwirkung des Glases auf die Bakterien und der Wirkung der kieselsauren Salze nicht empfehlenswert.

Bail hatte sich zur Extraktion der Leukocyten der Wirkung des Leukocidins bedient: ein mit Äther sterilisiertes Staphylokokkenexsudat wurde mit dem abzentrifugierten Bodensatze eines Aleuronatexsudats, also mit lebenden Leukocyten 1 Stunde bei 37° digeriert; man erhält auf diese Weise eine stark auf Typhus, Kolibazillen usw. wirkende Flüssigkeit; die Wirkung ist stärker als die einer Flüssigkeit, in welcher die lebenden Leukocyten mit bei 60° inaktiviertem Leukocidin gemischt waren. Die nach Extraktion mit Leukocidin verbleibenden Zellreste haben keine bakterizide Wirkung.

Andere biologische Extraktionsmethoden sind die von van de Velde und Latschtenko und bestehen darin, daß Kaninchenleukocyten mit aktivem Serum (aktives Hundeserum van de Velde) oder bei 60° inaktiviertem Serum (Latschtenko) extrahiert werden. Diese letztere Extraktion resp. Übertragung von aktivierenden, bakteriziden Substanzen aus den Leukocyten auf das inaktivierte Serum erfolgt bereits bei einem 5 Minuten währenden Kontakt bei 37°. Diese Extraktion gelingt bezüglich der Alexinwirkung nur mit bestimmten Serum- und Leukocytenarten, so z. B. wirken inaktivierte Sera von Kaninchen, Kalb, Pferd, Ziege, Schwein und Schaf auf Kaninchenleukocyten, dagegen nicht jene von Kaninchen, Hund, Pferd, Kalb auf Meerschweinchenleukocyten und jene von Kaninchen, Ziegen, Schweinen und Rindern auf Hundeleukocyten (siehe auch Trommsdorff).

Hier wären auch die seinerzeit von Jacob dargestellten „Leukocytenextrakte“ zu erwähnen, welche derart präpariert wurden, daß das direkt aus der Carotis, am geeignetsten nach eingetretener Hyperleukocytose, aufgefangene Blut zunächst behufs Hintanhalten der Gerinnung mit 0,5% Soda in entsprechender Menge versetzt wurde; hierauf fügte man im Verhältnis von 1:100 Chloroform hinzu, um die Flüssigkeit steril zu erhalten und ließ das Ganze 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen; die hierauf filtrierte, mit etwas Chloroform versetzte Flüssigkeit stellt Jacobs „Leukocytenextrakt“ dar.

Endlich wäre zu erwähnen, daß Weleminsky versucht hat, mit Hilfe der Buchnerschen Presse wirksame Stoffe aus den Leukocyten, freilich vergeblich, zu gewinnen.

Im Anhange möge hier einer Methode noch gedacht werden, welche unter dem Namen der bioskopischen Methode hauptsächlich zur Prüfung der Leukocidinwirkung von Neisser und Wechsberg ausgearbeitet wurde, jedoch zur Beobachtung der Schädigung lebender Zellen überhaupt Verwendung finden kann und daher ihres großen biologischen Interesses wegen hier angeführt werden soll. Van de Velde hatte die Prüfung der Wirkung seiner Leukocidine mikroskopisch in der geheitzten Zeissschen Kammer vorgenommen. Dieses Verfahren ist jedoch bei wechselnder Zahl der Leukocyten wenig brauchbar und daher benützten Neisser und Wechsberg ein makroskopisches Verfahren, welches auf dem Nachweise der Reduktion von Methylenblau durch lebende Leukocyten beruht. Das Verfahren wird folgendermaßen ausgeführt: Durch Injektion von Aleuronat in die Kaninchenbrusthöhle wird ein leukocytenreiches Exsudat erzeugt, welches nach 24 Stunden entnommen und zu gleichen Teilen mit 1%iger Lösung von oxalsaurem Natron verdünnt wird. Von diesem Gemisch wird zunächst die Dosis minima reducens bestimmt, indem durch Zusatz von einigen Tropfen einer Methylenblaulösung zu abfallenden Mengen des Exsudats festgestellt wurde, in welcher Verdünnung noch nach 2 Stunden bei 37° eine Reduktion eintritt. Ist dies nun festgestellt,

so werden fallende Mengen des Leukocidins oder einer anderen die Zellen schädigenden Substanz zu der als Minimaldosis gefundenen Exsudatmenge zugefügt und 2 Stunden im Brutschrank bei 37° beobachtet. Die zweckmäßigste Versuchsanordnung ist dabei folgende:

Man nimmt z. B. $^1/_2$ ccm Aleuronatexsudat, füllt mit $1^1/_2$ ccm physiologischer Kochsalzlösung auf 2 ccm Gesamtvolumen auf, mischt, fügt einen Tropfen einer sehr dünnen Methylenblaulösung (0,04 g Methylenblau in 100 ccm Kochsalzlösung) zu und verschließt die Flüssigkeit durch aufgegossenes Paraffinum liquid. gegen die Luft ab; das Ganze wird in ein enges Reagensröhrchen (von 6—7 mm lichten Durchmesser) gebracht und in den Thermostaten eingestellt. Sind die Leukocyten lebend, so tritt nach kurzer Zeit vollständige Entfärbung ein, tötet man sie dagegen durch Leukocidin oder durch Erwärmen oder Chinin ab, so bleibt die Flüssigkeit blau als Zeichen, daß ihr das Reduktionsvermögen verloren gegangen ist. So läßt sich leicht die Schädigung der Leukocyten quantitativ verfolgen. Als Beispiel sei hier ein Versuchsprotokoll der Bestimmung der Dosis minima reducens aufgeführt:

Bestimmung der Dosis minima reducens:

Menge der Leukocyten-Aufschwemmung	Farbe der Flüssigkeit
1,0 ccm	farblos
0,75 ccm	„
0,5 ccm	„
0,25 ccm	etwas blau
0,1 ccm	völlig blau
0,075 ccm	„ „
0,05 ccm	„ „

Auf Grund dieser Methode ergab sich, daß Diphtherie-, Tetanus- und Staphylokokkentoxine nicht reduzieren, ebensowenig wie auch verschiedene Fermente (Pepsin, Papayotin, Pankreatin, Invertin, Emulsin, Diastase).

3. Darstellung von Antigenen aus Blutplättchen.

Die Bedeutung der Blutplättchen für die Physiologie der Gerinnung ist seit langem erkannt und neuerdings durch die Arbeiten von Morawitz geklärt; Morawitz konnte die Blutplättchen darstellen und sie im Gegensatze zu allen anderen bisher untersuchten Zellen als Träger des Thrombogens neben der auch anderen Zellen zukommenden Thrombokinase feststellen. Die Blutplättchen wurden in neuester Zeit durch Gruber und seine Schüler Futaki und Schneider auch als baktericide Antigene erkannt und scheinen insbesondere für die rätselhafte Milzbrandbaktericidie gewisser Blutarten die alleinige Ursache abzugeben. Solche Anthrakocidine sind enthalten in den Blutplättchen des Kaninchens und der Ratte, während das Blutplasma dieser Tiere gegen Milzbrand völlig wirkungslos ist; dagegen enthalten die Blutplättchen des Meerschweinchens und des Hundes keine derartige Substanz. Dieselbe wird bei der Blutgerinnung von den Blutplättchen abgegeben und bewirkt dann die Baktericidie des Serums der Kaninchen und Ratten. Ebenso besitzen auch Extrakte aus Blutplättchen eine äußerst kräftige baktericide Wirkung und man kann sowohl Plättchenaufschwemmungen wie Plättchenextrakte als Antigene zur Herstellung eines Antiplättchenserums benützen. Die aus den Plättchen stammende baktericide Substanz unterscheidet sich von dem thermolabilen Alexin dadurch, daß sie bei 56° thermostabil ist und keine Wirkung auf

Typhusbazillen und Erythrocyten ausübt. Die gewaschenen Blutplättchen des Kaninchens geben weder an Zitratplasma, noch an physiologische NaCl-Lösung das Anthrakocidin ab; dasselbe läßt sich aber durch frische, wie bei 65° inaktivierte Lymphe und durch bei 65° inaktiviertes Blutserum extrahieren.

Die Darstellung der Plättchen gestaltet sich folgendermaßen: Mosen verfuhr derart, daß er einfach die oberste Schicht des beim Zentrifugieren von Oxalatblut erhaltenen Sedimentes vorsichtig abpipettierte, und so reine Blutplättchen, die sich in der obersten Schicht gesammelt hatten, erhielt. Morawitz verwendete als zweckmäßigeres Verfahren die fraktionierte Zentrifugierung in nachfolgender Weise an: Einem großen Hunde wird aus der Carotis Blut entnommen, das in Fluornatrium oder Natriummetaphosphatlösung aufgefangen wird und zwar so, daß die Salzkonzentration ca. 0,3 resp. 2% beträgt. Dabei ist es am besten, das Blut nicht in ein großes, sondern in mehrere kleine Gefäße zu je 100 ccm Inhalt mit eingeschliffenem Glasstöpsel aufzufangen, um sofort durch Umstülpen des Gefäßes eine möglichst vollständige Mischung des Blutes und des Salzes herbeizuführen. Das Blut wird nunmehr sofort durch 1—1½ Stunden auf einer Zentrifuge von 1600 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert, wobei sich die geformten Elemente mit Ausnahme der Blutplättchen absetzen. Dies geht beim Fluoridplasma rascher als beim Metaphosphatplasma vor sich. Die abgesetzte über den Erythrocyten liegende weiße Schichteenthält indessen neben den Leukocyten stets bereits einen großen Teil der Blutplättchen. Der andere Teil der Plättchen ist in dem überstehenden weißlich getrübten Plasma enthalten und kann völlig frei von den Leukocyten erhalten werden, wenn das Plasma ca. 2 cm über dem Sediment abgehebert und jetzt neuerdings drei bis vier Stunden bei etwa 2000 Touren in der Minute zentrifugiert wird. Dann ist das Plasma völlig klar, während am Boden des Glases ein ziemlich festhaftender weißer Plättchenbelag bis zu 1 mm Dicke sich abgesetzt hat. Die Verluste bei diesem Verfahren sind recht große und können mehr als 75% betragen.

4. Methoden bei der Antigengewinnung aus dem Blutplasma.

Die möglichst schonende Gewinnung des Blutes erscheint für viele Untersuchungen zweckmäßig, und insbesondere spielte die Darstellung des Plasma bei dem Nachweise der Alexine und Hämolysine des öfteren eine Rolle. Die gewöhnlichsten Methoden das Blut in ungeronnenem Zustande zu erhalten, nämlich jene, durch Zusatz gerinnungshemmender Mittel Plasma zu erzeugen, spielen im allgemeinen eine geringere Rolle, als jene, welche ohne Zusatz von fremden Stoffen die Gerinnung hintanhalten. Von der ersten Gruppe der gerinnungshemmenden Agentien sind viele für die Darstellung sehr labiler Immunkörper nicht immer geeignet. So haben unter anderen Buchner und Lingelsheim angegeben, daß das so häufig verwendete Oxalat die Alexinwirkung schwächt; von den verschiedenen anderen Mitteln, welche durch ihre Salzwirkung die Gerinnung hindern, sind viele wenig empfehlenswert, da bei der angewandten Konzentration auch die Reaktionen der Immunkörper beeinträchtigt werden können, wie z. B. bei dem Eisensulfatplasma oder bei den in relativ hohen Konzentrationen gerinnungshemmenden Neutralsalzen; von jenen Mitteln, wie dem in den Albumosengemengen enthaltenen Peptozym (E. P. Pick und K. Spiro), oder wie den diesem nahe-

stehenden, im Blute der Muraeniden (Mosso, Delezenne) vorhandenen Giften, welche anscheinend eine komplizierte, bisher ungeklärte Wirkungsweise besitzen, ist wegen der allgemeinen Giftwirkung derselben und der Applikationsweise eine nur sehr begrenzte Anwendung denkbar. Dagegen verdient das von E. Freund und Alex. Schmidt als gerinnungshemmendes Agens eingeführte zitronensaure Natron in der bereits früher erwähnten, von Ehrlich geübten Anwendungsweise besonders bevorzugt zu werden. Vielfach wurde auch das von Lilienfeld eingeführte Histon als gerinnungshemmendes Mittel zur Darstellung des Blutplasma benützt und in gleicher Weise kann auch das diesem ähnlichwirkende Blutegelextrakt, das unter dem Namen Hirudin in ungemein wirksamen Präparaten von E. Sachse & Co., Leipzig fabriksmäßig erzeugt wird, verwendet werden. Da für bestimmte Versuchsanordnungen auch die Kenntnis der weniger gebräuchlichen gerinnungshemmenden Stoffe erwünscht sein kann, so mögen dieselben in der folgenden Zusammenstellung auch Berücksichtigung finden. Zunächst wäre hier anzuführen, daß bereits freie Alkalien und freie Säuren die Gerinnung unterdrücken können, so z. B. ein Zusatz von kohlensaurem Natron, der das aufgefangene Blut auf einen Gehalt von 0,5 % Soda bringt (Jacob). Das Auffangen von Blut in verschiedenen Lösungen von Neutralsalzen, wie in Kochsalz, schwefelsaurem Natron, schwefelsaurer Magnesia, salpetersaurem Kalium heben die Gerinnung völlig auf. Dabei ist von Chlornatrium ein gleiches Volumen einer 10 %igen Lösung, von schwefelsaurem Natron das gleiche Volumen einer gesättigten Lösung, von schwefelsaurer Magnesia, die besonders von A. Schmidt empfohlen worden war, der vierte Teil der Blutmenge an gesättigter Lösung nötig. Nach Schmidt fängt man Blut in dem 3.—4. Teil seines Volumens gesättigter Lösung von schwefelsaurer Magnesia auf, hebt, nachdem die Blutkörperchen sich gesenkt hatten, das überstehende Plasma ab und filtriert dasselbe durch eine doppelte Lage Filtrierpapier, wodurch man, da die roten Blutkörperchen ihre Elastizität verloren haben und die Poren des Filters nicht mehr passieren, ein klares, von zelligen Elementen freies Plasma (Salzplasma) enthält, welches auch bei Verdünnung mit Wasser ungeronnen bleibt; es kann daher im Vakuum getrocknet aufbewahrt werden und nach längerer Zeit wieder in Wasser gelöst werden. Auch Zusatz des gleichen Volumens einer 0,5 %igen Rohrzuckerlösung, ferner Eiereiweiß und Glyzerinlösungen verzögern die Gerinnung um ca. eine Stunde (J. Müller, Grünhagen cit. nach E. Freund). Die Gerinnungshemmung durch Eisensalze wird derart herbeigeführt, daß nach Gaglio 0,3—0,4 g pro Kilo Tier von milchsaurem, weinsteinsaurem resp. schwefelsaurem Eisenoxyd in die Blutgefäße oder unter die Haut von Hunden, Katzen und Kaninchen eingespritzt werden muß; damit wird die Gerinnungsfähigkeit des Blutes auch außerhalb des Tierkörpers für immer aufgehoben. Weinsteinsaures Kupfer, Manganchlorür, die Doppelsalze von zitronensaurem Natron und Mangan, Cobaltchlorür hemmen, in ½ bis 1 %igen Lösungen zu gleichen Teilen dem Blute zugesetzt, ebenfalls die Gerinnung. Ebenso glycocholsaures und taurocholsaures Natron in 1—2 %igen Lösungen.

Wichtiger als die eben genannten Agentien sind die kalkfällenden Salze, darunter insbesondere das oxalsaure Natron, Kalium und Ammonium. Man stellt das Oxalatplasma in der Weise dar, daß das aus der Ader strömende Blut direkt in einer Lösung von den eben genannten oxalsauren Salzen aufgefangen wird. Diese Lösungen müssen derart

konzentriert sein, daß 0,15 bis 0,6 g bis 1,0 g des Salzes in einem Liter Blutes gelöst sind; verwendet man festes Salz, so muß das Blut kräftig gerührt werden, um eine möglichst rasche Lösung desselben in dem Plasma zu bewerkstelligen. Der gleiche Effekt kann auch nach ARTHUS erzielt werden, wenn man statt der oxalsauren Salze Fluoride, insbesondere das Natriumfluorid, oder Seifen, so jene des stearinsauren oder ölsauren Natrons verwendet. Beim Auffangen des Blutes in Natriumfluorid muß man 1,5 g bis 2,0 g des Salzes, bei den Seifen 5 g bis 10 g pro Liter Blut behufs Gerinnungshemmung verwenden.

An diese Mittel schließen sich die zitronensauren Salze an, welche, wenn auch nicht kalkfällend, doch durch Beeinflußung der Kalksalze wirken; von zitronensaurem Natrium oder Kalium sind ca. 4—5 g pro Liter Blut nötig. Sowohl das Oxalat wie auch das Zitratplasma kann durch Kalkzusatz zur Gerinnung gebracht werden; diese Gerinnung tritt jedoch nicht ein, wenn die Phosphorsäure durch Zusatz von Ammoniak und Magnesiamixtur dem Blute entzogen worden war (E. FREUND).

Von Albumosen, welche bei intravenöser Injektion an Hunden Ungerinnbarkeit des Blutes bewirken (FANO, SCHMIDT-Mühlheim), sind ca. 0,25—0,3 g pro kg Tier nötig; bei Kaninchen tritt entweder überhaupt keine Gerinnungshemmung ein oder erst bei viel größeren, schwer toxisch wirkenden Dosen.

Das Histon kann sowohl intravenös, als auch als Zusatz zu extravasculärem Blute gerinnungshemmend wirken; dasselbe kann durch Säurespaltung aus dem Nukleohiston gewonnen werden, einem Körper, der aus Wasserextrakten der verschiedensten zelligen Elemente und der Leukocyten durch Essigsäurefällung und weitere Reinigung durch Lösen in Soda und Fällen mit Säure dargestellt werden kann; das Nukleohiston zerfällt bei der Spaltung mit 0,8%iger Salzsäure nach KOSSEL und LILIENFELD in Histon und Leukonuklein. Vom trockenen Histonchlorhydrat genügen 0,3 g pro Kilogramm Tier bei intravenöser Injektion zur Erzeugung der Gerinnungshemmung.

Ein ungemein wirksames, gerinnungshemmendes Agens stellt das von HAYKRAFT zum erstenmale geprüfte Blutegelextrakt dar, das aus den Vorderteilen der Blutegel derart gewonnen wird, daß dieselben nach DICKINSON in 95%igen Alkohol durch einige Tage eingelegt, dann getrocknet und hierauf per Blutegelkopf mit 5—10 ccm Wasser extrahiert werden. (Siehe auch die in dem Kapitel über Blutegel-Antigene angeführte Methode von WENDELSTADT.) FRANZ hat die wirksame, hitzebeständige Substanz, Hirudin genannt, gereinigt dargestellt; dieselbe hält bereits in Dosen von 0,001 g 7,5 ccm Blut flüssig; von dem wässerigen Extrakte genügt der Zusatz von einigen Tropfen zu 10 ccm Blut, um dasselbe durch mehrere Tage an der Gerinnung zu hindern. Das Blutegelextrakt wirkt nicht allein bei intravenöser Einführung, sondern auch in vitro und zwar auf die verschiedensten Blutarten, wie auf das Blut vom Hund, Kaninchen, Katze, Schaf, Rind, Pferd u. a.

Als eine interessante biologische Methode, das Blut ungerinnbar zu machen, mag noch die von BORDET und GENGOU durchgeführte Immunisierung gegen das Fibrinferment angeführt werden; Tiere, welche mit Plasma oder Serum einer fremden Tierart vorbehandelt worden sind, liefern ein Serum, das durch Einwirkung auf das Fibrinferment der zweiten Spezies deren Blut ungerinnbar oder schwer gerinnbar macht. (Näheres darüber in dem Kapitel der fermentativen Antigene.)

Von den Methoden, welche ohne Zusatz von fremden Stoffen die Gerinnung hindern, ist die einfachste und älteste, welche das Blut durch Kälteeinwirkung vor der Gerinnung schützt. Diese von Burdon Sanderson und Alexander Schmidt eingeführte Methode der Darstellung des „Kälteplasma" wird derart ausgeführt, daß man das Blut direkt in auf Eis gestellten oder mit Eis umgebenen Zylindern auffängt, welche dann eisgekühlt zentrifugiert werden können. Diese Methode hat G. Ascoli bei seinen Hämolysinversuchen verwendet.

Ein zweites häufig angewandtes Verfahren ist das von E. Freund und besteht im folgenden: Fängt man Blut unter Vermeidung irgendwelcher Adhäsion in mit Vaselin ausgegossenen Gefäßen unter Öl auf, so bleibt das Blut ungeronnen und schichtet sich in Blutkörperchen und klares Plasma. Es kann mit einem eingeölten Glasstabe umgerührt werden, ohne zu gerinnen; wird es dagegen mit einem Körper von rauher Oberfläche, z. B. einem nicht eingefetteten Glasstabe berührt, so tritt sofortige Gerinnung ein. Ähnlich kann das Blut auch ungeronnen erhalten bleiben, wenn man es in geschwellten Fischblasen auffängt.

Dieses Freundsche Verfahren haben Bordet und Gengou für sterile Arbeiten in folgender Weise modifiziert: Bordet und Gengou verwenden steriles Paraffin, mit welchem die sterilen Gefäße sorgfältig ausgegossen werden; durch Eintauchen derselben in kaltes Wasser erhält man einen guten Paraffinüberzug. Auch zur Blutentnahme verwendet man breite, paraffinierte Glaskanülen, welche an dem einen Ende ausgezogen, an dem anderen mit einem sterilen Wattebausch verschlossen sind. Das spitz ausgezogene Ende wird in die gut isolierte Carotis eingeführt; das Blut steigt in das Glasrohr, welches, wenn genügend gefüllt, nunmehr aus dem Gefäße zurückgezogen wird; die ersten mit der Wunde in Berührung gekommenen Partien des aufgefangenen Blutes entfernt man und gießt das Blut in die gleichmäßig paraffinierten Zentrifugierröhrchen, wobei man die letzte Blutportion abermals nicht benützt, da sie leicht Arteriengewebsfetzen enthalten könnte, welche die Gerinnung herbeiführen würden. Dieses Blut wird hierauf zentrifugiert, wobei es sich empfiehlt die Zentrifugiergefäße in kaltes Wasser oder Eis einzutauchen. Wenn das obere Drittel der Flüssigkeit trüb bleiben sollte, so hebt man mit paraffinierter Pipette ab und läßt nochmals zentrifugieren, bis das Plasma von allen zelligen Elementen befreit ist, was oft $^1/_2$—1 stündiges Zentrifugieren nötig macht. Ein derartiges Plasma fängt nach einiger Zeit immer von selbst an zu gerinnen, selbst wenn es von zelligen Elementen völlig befreit ist, infolge des steten Gehaltes an Fibrinferment. Die Zeit, innerhalb welcher man es im flüssigen Zustande bei Laboratoriumstemperatur erhalten kann, wechselt; der flüssige Zustand kann jedoch bis zu 24 bis 30 Stunden andauern.

Ein anderes Verfahren, das von Hermann und Falloise u. a. bei den Studien über den Ursprung der Alexine verwendet wurde und das die Mängel des vorher geschilderten Verfahrens, welche in der durch die Kälte und durch die Berührung mit der Luft leicht eintretenden Leukolyse bestehen sollen, vermeidet, beruht auf der Isolierung des Plasmas innerhalb des Blutgefäßes. Dasselbe wird derart ausgeführt, daß zwischen zwei Unterbindungsstellen ein möglichst großes Stück der Jugularvenen mit Unterbindung aller zuführenden Gefäße herausgeschnitten und in eine mit 0,7 $^0/_0$ iger Kochsalzlösung gefüllte Zentrifugierröhre gebracht wird. An der oberen Unterbindungsstelle ist das Venenstück an dem Stoppel des Zentrifugierrohres aufgehängt. Zentrifugiert man während

einiger Minuten, so erreicht die erhaltene Plasmaschicht die Hälfte, nach $^1/_2$ Stunde ca. $^2/_3$ der Höhe des herausgeschnittenen Venenstückes. Nach dieser Zeit, mitunter nach 1—1$^1/_2$ stündigem Zentrifugieren legt man etwas über der abgesetzten Leukocytenschicht eine Ligatur an und erhält auf diese Weise ein völlig klares Plasma, das in einer Paraffinzelle auch während einiger Stunden flüssig aufbewahrt werden kann. Bei Kaninchen und größeren Säugetieren verwendet man die Vena jugularis, bei Meerschweinchen und Ratten die untere Hohlvene.

Endlich läßt sich bei manchen Tierarten, deren Blut sich durch Armut an Fibrinferment und daher durch lange Gerinnungszeit auszeichnet, nach Delezenne das Blut sehr lange ungerinnbar erhalten. Zu diesen Tierarten gehören alle, deren Blutkörperchen Kerne tragen, wie die Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische; Vorbedingung für das Gelingen der Flüssigerhaltung des Blutes ist, daß das Blut beim Aderlasse nicht in Berührung kommt mit dem Gewebssafte verletzter Gewebe. Deshalb ist es nötig, eine Kanüle in die vorher gut präparierte Arterie, sei es in die Carotis oder die Flügelarterie, einzuführen und möglichst zu vermeiden, daß die Gefäßwand verletzt wird. Das erhaltene Blut wird zentrifugiert und das abgehobene Plasma gerinnt nicht mehr spontan; es kann sich in günstigen Fällen 1 Monat lang, in weniger geglückten 10—12 Tage ungeronnen erhalten. Erst dann, wenn die geringste Menge eines Gewebssaftes, so z. B. ein Stück Muskelgewebe dazu gelangt, gerinnt das Blut. Die praktische Ausführung der Methode, wie sie in den Untersuchungen von Bordet und Gengou erfolgte, ist bei der Gewinnung von Gänseblut folgende: Bei nach vorne gedrehtem Flügel wird in die präparierte Flügelarterie eine sterile, am unteren Ende ausgezogene, oben breite, mit Wattebausch verschlossene Glasröhre eingeführt, so daß das Blut in die Röhre aufsteigt; hat man eine genügende Menge Blut entnommen, so zieht man die Kanüle zurück, läßt durch das untere Ende der Kanüle die ersten Tropfen abfließen und verwendet nur die folgende Blutportion, die man sofort zentrifugiert; die letzte aus der Kanüle ausfließende Portion, die als erste in die Glasröhre eingeflossen ist und mit den verletzten Geweben in Berührung kam, wird ebenfalls wegen der leichten Gerinnbarkeit derselben nicht verwendet. Beim Zentrifugieren bilden sich die plasmatische Schicht, welche abgehoben wird und die Gerinnbarkeit verloren hat, und die zellige Schicht, welche infolge von Abscheidung des Fibrinfermentes in der Regel nach wenigen Stunden gerinnt.

Das Blutplasma gewisser Crustaceen und Echinodermen hat in den schönen Versuchen v. Dungerns als Präzipitinogen Anwendung gefunden. v. Dungern benützte von den ersteren hauptsächlich die Maja squinado Latr., eine große 20—25 cm lange Krabbe, deren Leibeshöhle eine große Menge Blut enthält. Die Blutentnahme erfolgt hier derart, daß man das Endglied eines Beines mit der Schere durchschneidet, wodurch das Blut aus der Leibeshöhle, welche mit dem Inneren des Beines zusammenhängt, ausfließt. Ist die zum Versuche nötige Menge Blutes entleert, so schneidet man auch das folgende Glied entzwei; es erfolgt dann die sogenannte Autotomie des Beines. Das Bein wird durch Muskelzug an einer bestimmten Stelle am zweiten proximalen Gliede abgerissen, wobei die Amputationsöffnung zu gleicher Zeit durch eine Membran verschlossen wird; dadurch schützt sich das Tier vor Verblutung und Infektion der Leibeshöhle. Man kann dem Tiere auf diese Weise wiederholt Blut ohne Schaden entziehen, so lange, bis es keine Beine mehr besitzt. Nachdem

das Blut entleert ist, ballen sich die roten Blutkörperchen zusammen, wodurch das Plasma abgetrennt wird; manchmal tritt um die Blutkörperchen eine leichte Gerinnung auf, das Plasma bleibt jedoch ungeronnen.

Die Blutentnahme bei den Echinodermen resp. Cephalopoden (Octopus vulgaris) führte v. DUNGERN derart aus, daß er bei dem befestigten Tiere die Aorta frei legte und eine Kanüle in dieselbe einband. Das Blut fließt, wenn für die normale Atmung des Cephalopoden durch Einleiten von Seewasser in die Atemhöhle gesorgt wird, allmählich aus und das Plasma kann wiederum leicht durch Absetzenlassen oder Zentrifugieren der roten Blutkörperchen gewonnen werden. Sowohl das Majaplasma als auch das Octopusplasma kann ohne Schaden in Mengen von 5—10 ccm Kaninchen intravenös injiziert werden. Das Octopusblut enthält nach FREDERICQ als einzigen Eiweißkörper das kupferhaltige Hämocyanin in etwa 9 $^0/_0$ iger Lösung.

Während die Darstellung des Plasmas nur in bestimmten Fällen erwünscht ist, wird zur Antigendarstellung, soweit dabei die im Blute befindlichen Antigene in Betracht kommen, zumeist das Serum des geronnenen Blutes verwendet, da es sich gezeigt hat, daß kein weisentlicher Unterschied in der Antigenwirkung zwischen Blutserum und Plasma besteht.

5. Darstellung der Antigene aus dem Serum.

Die ausführliche Schilderung der Methoden der Serumabscheidung erfolgt in anderen Kapiteln dieses Handbuches, auf welche verwiesen werden muß; hier kommen vor allem in Betracht die antigenwirkenden Eiweißkörper des Serums, welche, sei es in ihrer Gesamtheit oder einzeln und in ihren verschiedensten Derivaten zur Produktion von Antikörpern Verwendung gefunden haben. Die Darstellung und die Trennung der einzelnen Serumeiweißkörper, des Fibrinogenglobulins, Euglobulins, Pseudoglobulins und Albumins durch Salzfällungen wird in dem Kapitel der Antitoxindarstellung unter den allgemeinen Fällungsmethoden erschöpfend besprochen; es sei nur auch hier wieder erwähnt, daß die Frage, ob den Eiweißkörpern an sich oder einem ihnen nur beigemengten, von ihnen schwer trennbaren Körper die Antigennatur zukommt, für viele der Antigene, so z. B. die Präcipitinogene dahin mit großer Wahrscheinlichkeit beantwortet werden muß, daß die Eiweißkörper als solche oder ihre mehr oder minder festen Verbindungen mit bestimmten Körpern als Antigene anzusehen sind.

Einer besonderen Erwähnung bedarf hier die biologische Reinigung der einzelnen Eiweißkörper, wie sie auf Grund der EHRLICHschen Electivabsorption von zahlreichen Autoren, darunter M. ASCOLI, OBERMAYER und PICK, IDE, MICHAELIS, versucht wurde und die insbesondere nach ASCOLI, IDE und MICHAELIS eine viel schärfere Trennung der biologisch verschieden wirksamen Komponenten des Serums ergibt, als die Fraktionierung mit Salzen. In gleicher Weise wurde auch zwischen den verschiedenen Organeiweißkörpern von KISTER und WEICHARDT, H. PFEIFFER, FORSSNER, GRUND und Anderen eine spezifische Trennung und Differenzierung angebahnt. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß ein durch Vorbehandlung mit einem Eiweißkörper A, dem als Verunreinigung ein Eiweißkörper B anhaftet, erzeugtes Immunserum IS-AB durch Zusatz des Körpers B im Überschusse von der verunreinigenden Kompenente B befreit wird, so daß das gereinigte IS-AB nunmehr aus-

schließlich mit dem Körper A, unter Niederschlagsbildung reagiert. Mit Hilfe dieses gereinigten Immunserums kann man wieder den Eiweißkörper B, der mit dem Eiweißkörper A verunreinigt ist, von A durch spezifische Ausfällung völlig reinigen. Die einzelnen Niederschläge, die bei dem vorher ausgeprüften Reaktionsoptimum (Zusatz des Eiweißes in entsprechender Menge und bei zweckmäßiger Verdünnung) entstehen, werden durch scharfes Zentrifugieren von der überstehenden Flüssigkeit abgetrennt.

Bei der Darstellung der Antigene aus dem Serum kommen, wie aus dem eben Gesagten hervorgeht, nahezu ausschließlich die Eiweißkörper desselben in Betracht; es werden daher auch alle Prozeduren, welche diese verändern, eine Veränderung der Antigene nach sich ziehen, ohne jedoch immer eine Zerstörung des Antigens im Gefolge zu haben. Gerade die von Obermayer und Pick ausgeführten Versuche mit coagulierten, nitrierten, jodierten, diazotierten und verdauten Eiweißkörpern beweisen die große Resistenz der hierher gehörigen Antigene und sprechen für deren Eiweißnatur. Echte Antigene, bei denen die Eiweißnatur, so weit sich aus der Darstellung des Antigens erschließen läßt, nicht in Frage käme, sind bisher nicht mit Sicherheit bekannt, und es spielen daher Extraktionsmethoden mit Alkohol, Äther, Chloroform usw. nur als Reinigungsmethoden, insbesondere zur Trennung von den im Serum reichlich vorhandenen Lipoiden, eine Rolle*).

Von den hier zu erwähnenden toxischen Antigenen muß das bei anderer Gelegenheit bereits angeführte Serum der Muräniden, insbesondere das Aalserum, und das Schlangenserum genannt werden. Das erstere, dessen giftige Eigenschaften Mosso entdeckte und als Ichthyotoxin bezeichnete, wurde von zahlreichen Forschern als Antigen sowohl wegen seiner rein toxischen als auch wegen seiner von Kossel und Camus und Gley gefundenen hämolytischen Wirkung benützt. Die Gewinnung des Serums geschieht nach Delezenne so, daß man das Tier dekapitiert, das entleerte Blut gerinnen läßt und mittels Zentrifugierens reinigt; nach Camus und Gley verfährt man derart, daß man das Blut mit einer sterilen Pipette direkt aus der Aorta des Aales entnimmt. Nach dem Absetzen gewinnt man auf diese Weise aus 100 g Tier ca. 0,6 ccm Serum, welches als solches zu den Arbeiten verwendet wird. 0,02 bis 0,03 ccm hemmen pro kg Hund bei intravenöser Injektion die Gerinnung, wobei jedoch nach Mosso bereits 0,02 ccm die für Hunde pro kg Tier letale Dosis darstellt; 0,1 ccm tötet Kaninchen innerhalb weniger Minuten. Nach Calmette töten bei subkutaner Injektion 3 ccm ein Meerschweinchen und 0,25 ccm eine Maus. Per os dargereicht, ist das Gift wirkungslos. Die hämolytische Komponente ist nach Tchistowitsch von der toxischen zu trennen, indem bloß die erstere entgegen den Angaben von Camus und Gley bei 55° zerstört wird. Eine weitere chemische Bearbeitung dieser Antigene liegt nicht vor.

Von großem Interesse ist Vorhandensein der Schlangengifte im Blute insofern, als es nach Faust zeigt, daß die Aufspeicherung der giftigen Substanz in den Speicheldrüsen eine rein selektive ist und daß die Sekretion des Giftes hier durchaus nicht als eine innere Sekretion der

---

*) Als eine Ausnahme müßte hier das von Levaditi im Kaninchenserum gefundene thermostabile Hämolysin bezeichnet werden, das von Wölfel mit dem von ihm beschriebonen alkohollöslichen Hämolysin identifiziert wurde; wie weit übrigens hier eine Beziehung zu den von Korschun und Morgenroth, Tarassewitch u. A. beschriebenen cocto-stabilen, aber nicht antigenen Hämolysinen besteht, muß dahin gestellt bleiben.

Drüse aufzufassen ist. Das Vorhandensein des Schlangengiftes im Blute und im Serum ist aber auch für die chemische Charakterisierung desselben bemerkenswert, weil sich zeigt, daß die Eigenschaften eines und desselben Giftes je nach dem Milieu, in dem es sich befindet, wechseln und das Gift auch verschiedene physiologische Wirksamkeit aufweisen kann. Denn nach CALMETTE, welcher das im Blute der Schlangen vorhandene Gift genauer studierte, scheint es auch qualitativ durchaus nicht gleichwertig mit dem sezernierten Schlangengift zu sein. Die tödliche Dose beträgt für Meerschweinchen bei dem Blute der darauf untersuchten Schlangen (sowohl Colubriden, wie Viperiden) ziemlich gleichmäßig ca. 0,5 ccm bei intraperitonealer Injektion, und 2—3 ccm ungefähr bei subkutaner Injektion; das sezernierte Gift tötet in Mengen von 0,05 bis 0,1 mg.

Hätte auch dieser quantitative Unterschied und die damit möglicherweise zusammenhängende, verlangsamte Einwirkung kaum ein großes Gewicht, so bleibt es immerhin merkwürdig, daß das giftige Prinzip des Schlangenblutes durch 10 Minuten dauerndes Erhitzen bei 68° zerstört wird, während das Gift der gleichen Schlangen z. B. der Cobra, von der Giftdrüse sezerniert, ganz wohl Temperaturen bis 100°, ja sogar kurz dauerndes Kochen ohne jede Schädigung verträgt. Von großer Wichtigkeit für die Beurteilung der beiden im Blute und im Sekrete befindlichen Antigene erscheint jedoch der Umstand, daß Tiere, welche mit dem Blutgift vorbehandelt worden sind, eine ansehnliche Menge des Drüsengiftes vertragen, jedoch jene, welche mit Drüsengift immunisiert sind, durch die einfach tödliche Dosis des Blutgiftes getötet werden können. Das Blutgift wird trotzdem von dem CALMETTEschen Antivenin in der Mischung neutralisiert. Es scheint uns nicht unmöglich, daß die Verschiedenheit der Wirkungsweise der beiden Antigene nur durch die Verschiedenheit der mit den nativen Giften in Verbindung stehenden Eiweißkörper bedingt ist, ähnlich, wie es in neuester Zeit gelungen ist durch Lecithinverbindungen künstliche Giftmodifikationen und dadurch verschiedene Antigene aus einem und demselben Gifte herzustellen; denn nach KYES wird auch das Kobralecithid im Gegensatze zum nativen Kobragift durch das CALMETTEsche Antivenin nicht beeinflußt, während das Kobralecithid einen Antikörper liefert, der von dem Antivenin verschieden, sowohl das Lecithid, wie auch das native Gift neutralisiert.

6. Darstellung von Antigenen aus tierischen Sekreten.

Von den Antigenen, welche hier in Betracht kommen, stehen im Vordergrunde des Interesses jene, welche sich als allgemein toxische Antigene und als hämolytische Antigene erwiesen. Derartige echte Antigene sind bisher hauptsächlich in den Sekreten der Reptilien und Amphibien, hie und da in denen der Fische (Trachinus draco), ferner bei den verschiedenen Klassen der Arthropoden, Würmer und Echinodermen nachgewiesen worden. Die als Antigene verwendeten giftigen Substanzen stammen aus den verschiedensten Sekreten, sei es aus speziellen Giftapparaten (Giftdrüsen), wie bei den Schlangen und Spinnen, sei es aus Hautdrüsen, wie bei den Amphibien oder sei es aus den Säften bestimmter Körperregionen bei niedrigstehenden Tierklassen. Die Gewinnung dieser Antigene wird daher in verschiedener Weise erfolgen und es werden auch dem entsprechend verschiedene physikalisch-chemische Methoden dabei Anwendung finden. Es sollen im nachfolgenden nur die wichtigsten Antigene in ihrer Darstellung besprochen werden.

A. Antigene aus den Sekreten der Säugetiere und Vögel.

Von den hier zu erwähnenden Antigenen hat nur die Darstellung einiger weniger ein methodisches Interesse; es handelt sich dabei in der Regel um die Benützung des nativen Materials, dessen Gewinnung zumeist ja keinerlei methodischen Schwierigkeiten unterliegt. Hierher gehört vor allem der Harn, die Galle, der Speichel, das Tränensekret, der Nasenschleim, der Schweiß, das Vaginalsekret, die Milch als Sekret der Milchdrüsen und endlich sogar der Kot. Die meisten dieser Sekrete verdanken ihre Antigennatur einzig und allein dem größeren oder geringeren Gehalt an artspezifischen eiweißartigen Bestandteilen, welche zur Auslösung der spezifischen Reaktionen befähigt sind, und die so empfindlich sind, daß selbst Spuren von Eiweißkörpern oder ihnen nahestehenden Derivaten zur Hervorrufung der Reaktion ausreichen.

Den tierischen und menschlichen Harn hat zum ersten Male Schattenfroh zur Antigenbildung benützt; er konnte sowohl eine spezifische lysogene als auch eine auf rote Blutkörperchen agglutinogen wirkende Substanz erhalten. Nach Injektion von größeren Mengen (bei Meerschweinchen von 4—5 ccm, bei Kaninchen 10—30 ccm) Menschen-, Ziegen- und Rinderharns in 2—3 tägigen Intervallen lassen sich im Blute spezifische Hämolysine, nach Injektion von Hundeharn spezifische Hämagglutine nachweisen. Die lysogenen Stoffe des Menschenharnes sind nicht dialysierbar, ertragen verhältnismäßig hohe Temperaturen und sind durch Alkoholäther fällbar; durch Bakterienwachstum werden sie nicht immer zerstört.

Auch Ruffer und Crendiropoulo konnten durch Injektion menschlichen Urins spezifische Hämolysine erzeugen; diese von ihnen als Hämosocin des Harnes bezeichnete Substanz, wird durch Kochen des Harnes zerstört und läßt sich mit Alkohol und Ammonsulfat ausfällen.

Während Schattenfroh Präcipitinogene nicht nachweisen konnte, gelang es Landsteiner und v. Eisler nach Injektion größerer Quantitäten (300—400 ccm) von menschlichem Harn spezifische, mit dem betreffenden Harn unter Flockenbildung reagierende Präcipitine zu erhalten, welche nur spurenweise Präcipitation im menschlichen Serum, wohl aber im auf 60° erhitzten Extrakt menschlicher, blutfrei gewaschener Nierenrinde deutliche Reaktion hervorriefen. Die in Reaktion tretende Substanz des Harnes läßt sich mit Ammonsulfat aussalzen. Es ist nach diesen Befunden nicht wahrscheinlich, daß das Präcipitinogen des Harnes ein Bestandteil der Blutpräcipitinogene ist, zumal mit menschlichem Blute erzeugte Präcipitine keine oder nur äußerst schwache spezifische Niederschläge im normalen Harne erzeugen (siehe auch Leclainche und Vallé). Es scheint sich auch hier um eine Reaktion der kolloidalen, nicht dialysablen Harnbestandteile zu handeln, deren weitere Natur erst zu untersuchen sein wird. Nach H. Pfeiffer findet sich in den im Vakuum dargestellten Rückständen normalen Menschen- wie Tierharnes neben einem Körper von gut charakterisierter Giftwirkung ein Agglutinin, welches ein relativ thermolabiler, nicht dialysierender Körper vom komplexen Aufbau ist, der aus einer indifferenten Substanz des normalen Harnes entweder durch vorsichtiges Erhitzen auf 80° oder durch Vakuumbehandlung bei 40° erhalten wird. Michaelis und Fleischmann haben bei Immunisierungsversuchen mit Harn negative Resultate erhalten. Es bedarf keiner besonderen Erwähnung, daß zahlreiche Antigene unter pathologischen Verhältnissen in den Harn übergehen oder wie z. B. bei Nephritiden

infolge des Gehaltes des Harnes an Eiweiß in demselben anzutreffen sind. Das Harneiweiß verhält sich dann ebenso, wie die anderen präzipitinogenen Eiweißkörper. Es können natürlich dann auch unter bestimmten Verhältnissen, wie z. B. bei einem gewissem Gehalt des Blutes an Antikörpern mit dem Harneiweiß auch diese zur Ausscheidung gelangen und aus dem Harn dargestellt werden, wie z. B. die Typhusagglutinine (Melchiorri, v. Hoesslin u. a.).

Bezüglich der antigenen Wirkung der Galle, im speziellen der gallensauren Salze wurden von Rist und Ribadeau-Dumas, sowie von Binaghi Versuche gemacht. Die ersteren verwendeten taurocholsaures Natron zur Immunisierung von Kaninchen, deren Serum die durch das Taurocholat erzeugte Hämolyse viel stärker hemmte als normales Serum. Der letztere fand, daß das Serum eines Hundes, welcher mit Rindergalle vorbehandelt worden war, gegen die toxischen Wirkungen der Galle schützte, ein Befund, den auch Scandaliato an Meerschweinchen bestätigte. In neuester Zeit hat Nicolle diese merkwürdigen Befunde insofern ebenfalls bestätigt, als er mit Hilfe einer 10 %igen Lösung von cholsaurem Natron, welche täglich zentigrammweise Kaninchen intraperitoneal eingespritzt worden war, ein Serum erhielt, das zwar nicht präzipitierte, wohl aber gegen die tödliche Wirkung des Salzes Meerschweinchen schützte. Ob es sich bei den eben angeführten Befunden um eine echte antigene Wirkung und echte Immunität handelt, muß vorläufig dahingestellt bleiben.

Sciolla hatte 1896 versucht, auch aus dem Sputum Tuberkulöser spezifische Antigene zu gewinnen, indem er mittels Glyzerin toxische Stoffe extrahierte; die Extrakte wurden entweder bloß durch Chamberlandfilter filtriert oder die Filtrate auf $^1/_{10}$ Volumen nach vorhergehendem Aufkochen konzentriert. Die ersteren Extrakte wirkten ähnlich toxisch, wie die Ätherextrakte der Bazillen, die zweiten Extrakte glichen in ihrer Wirkung dem Kochschen Tuberkulin. Werden diese Extrakte mit Äther behandelt, so kann man ein ätherlösliches, hitzebeständiges Gift erhalten, das in Dosen von 0,5 ccm bei Kaninchen und Meerschweinchen Krämpfe erzeugt und bei gesunden und kranken Tieren temperaturerhöhend wirkt.

Die Benützung der Milch als Antigen hat dadurch ein gewisses historisches Interesse, weil Bordet durch die Darstellung seines Lactoserums zum ersten Male spezifische Eiweißpräzipitine auf diese Weise gewonnen hatte. Die Verwendung der verschiedenen Eiweißkörper der Milch, wie des Kaseins, Lactoglobulins, Lactalbumins, als Antigene (F. Hamburger, P. Th. Müller u. a.) und ihre Darstellung erfolgt nach den üblichen Eiweißausfällungs- und Trennungsmethoden mit Säuren und mit Neutralsalzen; die antigene, zumeist präzipitinogene Wirkung der einzelnen durch fermentative Einwirkung, wie Lab, Pepsin und Trypsin oder durch andere chemische Eingriffe (Jodierung) dargestellten Derivate des Kaseins richtet sich im wesentlichen nach der durch den betreffenden chemischen Vorgang erfahrenen Zustandsänderung. Nach Morgenroth genügt für die Erzeugung von Milchkoagulinen in der Regel die ein- oder zweimalige Injektion von Kaninchen mit 20—40 ccm Milch, die auf 60° zur Verringerung der Keimzahl erwärmt werden kann; indeß gelingt es auch mit gekochter Milch, trotz gegenteiliger Angaben, ebenfalls spezifische Koagulinbildung zu erzielen. Daß auch hämolytische und cytotoxische Antigene in der Milch, wie in den verschiedenen Organzellen und im Serum vorkommen, hat vor Jahren v. Dungern erwiesen.

F. Meyer und L. Aschoff, welche bei Metschnikoff die Receptoren der Milcheiweißkörper eingehend studierten, fanden ebenfalls, daß die durch Kuhmilch erzeugten Lactosera neben ihrer präcipitierenden Wirkung auf Rinderserum sowohl Rinderblutkörperchen hämolysierten, als auch die Stierspermatozoen immobilisierten, wobei die Erzeugung dieser Fähigkeiten durchaus nicht auf die in der Milch vorhandenen Zelltrümmer zurückzuführen war; umgekehrt wirkten auch die durch Injektion von Blut, Spermatozoen und Trachealepithel erzeugten Zellimmunsera präcipitierend auf die Milch. Durch Absättigung der Milch nach Zusatz großer Dosen eines spezifischen hämolytischen Immunserums und Injektion dieser Milch erhält man ein Lactoserum, dessen hämolytische Wirkung gegenüber der eines gewöhnlichen Lactoserums eine beträchtlich schwächere ist. Ebenso kann man durch 20 Minuten langes Erhitzen auf 120° die Milch derart verändern, daß sie bei der Immunisierung zwar Koaguline, aber keine Hämolysine erzeugt.

In jüngster Zeit hat E. Brezina das im Kot enthaltene Sekret der Verdauungsdrüsen als Präzipitinogen mit Erfolg benützt. Er verwendete zu diesem Zwecke Kotextrakte, welche so hergestellt waren, daß der Kot mit der sechs- bis achtfachen Menge physiologischer Kochsalzlösung verrieben, die Mischung über Nacht stehen gelassen, dann zentrifugiert und zunächst durch ein Papierfilter, hierauf durch ein Berkefeldfilter filtriert wurde. Da durch die Filter jedoch sehr viel wirksame Substanz zurückgehalten wird, empfiehlt es sich, die Mischung einfach zu zentrifugieren und die abgehobene Flüssigkeit zur Abtötung der Keime mit Chloroform zu schütteln. Um das Antigen zu konzentrieren, kann die Flüssigkeit im Vakuumexikator über Schwefelsäure und Phosphorpentoxyd eingeengt werden. Dieselbe ist sehr eiweißarm und gibt mit Essigsäureferrocyankalium eine Trübung, wie etwa ein auf das 300fache verdünnte Hundeserum. Die mit diesem Extrakte erzielte Präzipitinreaktion ist spezifisch und unterscheidet sich von der mit Serumeiweiß erhaltenen dadurch, daß die Serumpräzipitine mit den Kotextrakten überhaupt nicht oder nur spärlich reagieren, während die Kotpräzipitine ihrerseits mit dem Serumeiweiß keine Fällung ergeben.

Die Exkremente gut und anhaltend fliegender Vögel, z. B. der Feldtauben eignen sich nach Weichardt am besten zur Reindarstellung seines „Antigens von Ermüdungstoxincharakter“ oder Ermüdungstoxins. Eine größere Menge frischer Taubenexkremente wird mit H_2O extrahiert, filtriert und das Filtrat mit Bleiessig so lange versetzt, bis eine Fällung nicht mehr auftritt; das Toxin wird dabei nicht mitgerissen und kann nach Abnutschen des voluminösen Bleiniederschlages aus dem Filtrat in folgender Weise gewonnen werden: durch Zusatz von Natriumphosphat im Überschuß wird das Blei aus dem Filtrat ausgefällt, und aus der erhaltenen Lösung wird nach Einengen im hohem Vakuum bis auf $^1/_4$ ihres Volumens das Natriumphosphat in der Kälte auskristallisieren gelassen, die Flüssigkeit von den Kristallen abgenutscht und gegen fließendes kaltes Wasser 15 Stunden lang dialysiert. Hierauf wird abermals im Vakuum eingeengt und nochmals die Dialyse bis zur Salzfreiheit wiederholt; die resultierende Flüssigkeit wird nun bei niedriger Temperatur und hohem Vakuum rasch getrocknet. Dieses so dargestellte Toxin erzeugt dann typische Ermüdungserscheinungen ohne jede Nebenwirkung, indem es bei Anwendung höherer Dosen die Tiere unter Niedergang der Temperatur bis zu 30° und darunter und unter Verlangsamung der Atmung bis zum Stillstand bei schlagendem Herzen tötet; andere

Erscheinungen, wie z. B. Krämpfe, dürfen dabei nicht auftreten. Hauptsächlich charakteristisch ist jedoch dabei, daß sehr geringe Mengen des spezifischen Antikörpers (schon 0,00005 g) der Versuchsmaus vor der Injektion verfüttert, imstande sind die Wirkung des Reintoxins vollständig aufzuheben. Das Toxin hat kolloiden Charakter, ist nicht dialysabel und zum Unterschiede vom Hemmungskörper auch in wasserfreiem Acetonun löslich.

B. Darstellung der Antigene aus dem Giftsekrete der Schlangen*).

1. Gewinnung und allgemeine Eigenschaften des Giftsekretes.

Sowohl die giftigen, wie auch die ungiftigen Schlangen besitzen eine Ohrspeicheldrüse (Parotis) und Oberlippendrüsen, welche das Gift sezernieren, nur unterscheiden sich die ungiftigen Schlangen durch das Fehlen der Giftzähne; doch wird auch ihr giftiges Sekret, das neben der Giftwirkung auch eine intensive proteolytische Wirkung aufweist, ebenfalls in die Mundhöhle sezerniert und scheint eine wichtige Funktion bei der Verdauung der Fleischnahrung zu besitzen. Die Gewinnung des Giftes kann entweder erfolgen aus den Drüsen der soeben getöteten Schlangen oder von den lebenden Tieren.

Bei den toten Schlangen wird nach Calmette in der Weise verfahren, daß man das Reptil auf einem Brett auf dem Rücken fixiert, den Unterkiefer mit einer Scheere wegschneidet, den Kopf mit Nadeln in der Mittellinie fixiert und nach Freilegung der Gifthaken die Ausführungsgänge der beiden Giftdrüsen herauspräpariert und unterbindet. Hierauf werden die Giftdrüsen ausgelöst und zwischen Drüse und Ligatur das Ende des Ausführungsganges durchschnitten; die Drüse wird nun mit einer Polypenpinzette oder mit einer gefensterten Pinzette komprimiert und der hervorquellende Saft in einem Uhrglase aufgefangen. Ein einfacheres und rascheres Verfahren gestaltet sich derart, daß der Kopf der Schlange mit der linken Hand erfaßt und der nach abwärts gezogene Unterkiefer festgehalten wird. Nachdem ein Gehilfe ein Uhrglas zwischen die beiden Kinnladen geschoben hat, werden mit dem Daumen und Zeigefinger der rechten Hand die Drüsen auf beiden Seiten des Oberkiefers derart ausgepreßt, daß das Gift durch die Giftzähne ausfließt. Jede Drüse liefert ungefähr 30 Tropfen und Calmette schätzt den Gehalt des Giftapparates an Sekret auf nicht mehr als auf 3 g. Ursprünglich wurden von Calmette die gesammelten Drüsen derart auf Gift verarbeitet, daß sie entweder fein zerhackt, in einem Kristallmörser verrieben, mit Glyzerin gemischt und durch ein Messingdrahtnetz durchpassiert wurden; die so erhaltene Flüssigkeit war exquisit giftig und konnte zu Versuchen verwendet werden. Auf andere Weise wurde das Gift aus den Drüsen durch 18stündige Mazeration mit destilliertem Wasser im Eisschrank und nachheriges Trocknen der Flüssigkeit über Schwefelsäure oder nach Filtration durch Chamberlandkerzen oder nach Vermischen und Trocknen mit phosphorsaurem Kalk gewonnen. Auch 18stündige Extraktion mit 10 %iger Kochsalzlösung und nachherige Behandlung mit gesättigter Lösung von schwefelsaurem Natron und Dialyse lieferten stark giftige Präparate.

Von lebenden Schlangen wird das Gift nach Calmette u. a. folgendermaßen entnommen: Die Schlange wird mittels einer langen Zange mit ebenen Griffplatten nach Art der geburtshilflichen Zangen am Kopfe

---

*) Siehe Calmette pag. 294.

gepackt und aus dem Käfig hervorgezogen, hierauf mit der linken Hand am Halse möglichst nahe am Kopfe fixiert, wobei man den Körper mit der rechten Hand hochhält, um ihn zu verhindern, sich gegen den Boden oder einen Gegenstand der Umgebung zu stützen. Nunmehr wird zwischen die Kiefer von einem Assistenten ein Uhrglas geschoben, auf welches das Tier beißt, wobei sich das Gift aus den Giftzähnen in ähnlicher Weise auf das Uhrglas entleert, wie wenn das Tier freiwillig seine Beute ergreifen würde. Sobald das Gift entnommen ist, wird die Schlange in den Käfig derart zurückgesetzt, daß man bei halbverschlossener Klappe des Käfigs mit der rechten Hand erst den Schwanz, dann den Körper und schließlich mit plötzlichem Ruck den Kopf hineinschiebt, während man mit der Linken die Klappe schließt.

Bei dem eben geschilderten Verfahren ist das Giftsekret mit dem Sekret der anderen in der Mundhöhle ausmündenden Drüsen verunreinigt; um diesem Übelstande zu begegnen, hat Martin das Gift derart gewonnen, daß er die Schlangen in ein mit dünner Kautschukplatte bedecktes Uhrglas beißen ließ. Statt dessen kann man auch einen mit dünner Gummimembran überzogenen Glastrichter verwenden und auf diese Weise das Gift frei vom Speichel gewinnen. Bei diesem Verfahren besteht jedoch die Gefahr des Abbrechens der Giftzähne, wenn die Schlange heftig beißt. Diese Gefahr kann vermieden werden, wenn man die Schlange in einen Wattebausch oder in ein Schwämmchen beißen läßt, aus welchem nachträglich das Gift mit Wasser extrahiert werden muß.

Um große für die Herstellung des Heilserums nötige Giftmengen zu gewinnen, ist es nötig, die Giftschlangen möglichst lange am Leben zu erhalten, zu welchem Zwecke sie etwa alle 14 Tage mit einem grösseren Stücke Fleisch gefüttert werden müssen, da sie freiwillig keine Nahrung zu sich nehmen. Die ebenfalls am zweckmäßigsten erfolgende 14tägige Giftentnahme soll nicht gleichzeitig mit der Fütterung stattfinden, da das entnommene Gift zugleich den Verdauungssaft des Tieres darstellt, ohne welches die Nahrung nicht verdaut werden kann. Jedenfalls empfiehlt es sich zur Gewinnung eines gut wirksamen Sektretes die Giftentnahme nicht öfters als einmal in der Woche durchzuführen.

Das der lebenden Schlange frisch entnommene giftige Sekret ist eine klare, visköse Flüssigkeit, welche je nach der Schlangenart mehr oder minder stark gelblich oder grünlich gefärbt ist, neutral oder schwach sauer reagiert und ein spezifisches Gewicht von 1039—1050 g aufweist. Das Gift löst sich im Wasser zu einer trüben, beim Schütteln stark schäumenden, eiweißhaltigen Flüssigkeit, welche neben anorganischen Bestandteilen und Epithelzellen, Mucin und Fett sowohl durch Hitze koagulable Globuline und Albumine, als auch nicht koagulierbare Albumosen und Peptone enthält.

Das aufgefangene Gift wird behufs Aufbewahrung bei niederer Temperatur getrocknet, am zweckmäßigsten in einem Vakuumexsikator über Chlorcalcium oder über Schwefelsäure. In warmen Ländern oder im Sommer genügt es, das Gift im Luftzuge oder in der Sonne zu trocknen. (Calmette.) Man bringt das Uhrglas mit dem darauf befindlichen flüssigen Gift an einen vor Staub geschützten sonnigen Platz, wo die Flüssigkeit rasch eintrocknet; der Trockenrückstand wird dann in der Weise gesammelt, daß man mit einem scharfen Spatel denselben vom Uhrglas abkratzt und in ein gut mit Glasstopfen verschließbares Fläschchen bringt. Das getrocknete Gift stellt Schüppchen oder Lamellen dar, in welchem Zustande, vor Luft geschützt, das Gift unbegrenzt haltbar ist. Bei un-

genügender Austrocknung zersetzt es sich jedoch rasch unter Entwicklung von Ammoniak und flüchtigen, unangenehm riechenden Fäulnisprodukten und unter gleichzeitigem Verlust seiner toxischen Wirkung. Über die von einzelnen Schlangen zu gewinnenden Giftmengen und zwar sowohl über die an flüssigem Gift, wie auch über die Menge des daraus hergestellten Trockenrückstandes gibt die auf Grund der Angaben von CALMETTE, MC. G. SMITH und FEOKTISTOW von FAUST zusammengestellte Tabelle 1 eine Übersicht.

Tabelle 1.

Autor	Schlangenart	Menge des frisch entleerten, flüssigen Giftes in mg	Trockenrückstand in mg
MC. G. SMITH	Pseudechis porphyriacus	100—160	46—94
„	Hoplocephalus curtus	65—150	17—55
CALMETTE	Bothrops lanceolatus (durch Ausdrücken beider Drüsen)	320	127
„	Cerastes aegyptiacus	85—123	19—27
„	Crotalus durissus	370	105
„	Naja tripudians, 2 m lang	135 im Mittel	30—45
„	Naja tripudians, welche seit 2 Monaten nicht gebissen hatte	220	—
„	Größte, von diesem Autor in beiden, nach dem Tode herauspräparierten Drüsen einer Naja tripudians gefundenen Menge Giftsekret	1136	480
FEOKTISTOW	Vipera ammodytes	65	20
„	Kreuzotter	30	10
„	Crotalus durissus	300	90—100

Die meisten Angaben der Forscher betreffen in der Hauptsache die rein toxische Wirkung des Giftsekretes, welche jedoch nur eine einzige wirksame Komponente des verschiedene physiologische Wirkungen ausübenden Giftgemenges darstellt und als Neurotoxin bezeichnet wird. Ja neuere Untersuchungen zeigen, daß diese neurotoxische Komponente nicht einmal das einzige Gift ist, welchem die deletäre Allgemeinwirkung zugeschrieben werden muß, sondern daß bei verschiedenen Schlangenarten die tödliche Wirkung des Sekretes im wesentlichen auf verschiedenen Giften beruht, von denen jedes für sich im Sinne EHRLICHS als monotrop, d. h. nur für Zellen von bestimmter Art wirksam, aufzufassen ist. So hat man demnach neben dem am längsten bekannten Nervengifte, dem Neurotoxin, das von FLEXNER und NOGUCHI studierte Hämorrhagin zu unterscheiden, welches letztere durch die Einwirkung auf die Endothelien der Gefäße zu Blutaustritten und dadurch zu schweren Störungen im Organismus führt; es wird von den Autoren für ein spezifisches Cytolysin der Gefäßendothelien gehalten. Der größere oder kleinere Gehalt des Giftes an der einen oder anderen Komponente ist für die verschiedenen Schlangenarten charakteristisch und insofern von großer praktischer Bedeutung, als auch die durch das jeweilige Antigen erzeugten Immunsera eine mehr minder ausgesprochene Spezifizität ihrer Wirksamkeit aufweisen. Die Mengen, welche als tödliche Minimaldosis zu bezeichnen sind, wechseln je nach dem verwendeten Gift und der benützten Tierart und lassen sich nach CALMETTE in beifolgenden Tabellen 2 und 3 leicht überblicken.

Tabelle 2. Die tödliche Minimaldosis für Kobragift.

0,8 mg pro kg Körpergewicht des Hundes,
0,5 mg „ „ „ „ Kaninchens,
0,2 mg „ 500 g „ „ Meerschweinchens,
0,1 mg „ 150 „ „ der Ratte,
0,05 mg „ 25 „ „ „ Maus.

Tabelle 3. Die tödliche Minimaldosis verschiedener Schlangengifte für Kaninchen und Meerschweinchen.

Schlangenart:	Letale Dosis in 3—4 Stunden wirksam für Kaninchen von 1,600—2,000 kg	Letale Dosis in 2—3 Stunden wirksam für Meerschweinchen von 450—500 g
Naja tripudians	0,3—0,6 mg	0,05 mg
Naja haje	0,3—0,7 „	0,07 „
Cerastes	1,5—2,0 „	0,1 „
Crotalus	3,5 mg	0,3 „
Trigonocephalus	2,5 „	0,2 „
Hoplocephalus variegatus	2,5 „	—
Acanthophis antarctica	1,0 „	0,08 „

2. Chemische Darstellung und physikalisch-chemische Eigenschaften der Schlangengifte.

Das wirksame Prinzip konnte aus dem Speichelsekret der Schlangen und zwar sowohl aus dem nativen, wie auch aus den Lösungen des getrockneten Giftes zunächst durch verschiedene Eiweißfällungsmittel erhalten werden. Es wurde dabei verwendet die Fällung mit Alkohol, mit den verschiedenen Neutralsalzen, wie Magnesium-, Natrium- und Ammoniumsulfat, welche bis zur Sättigung eingetragen, mit den erzeugten Globulin- oder Albuminniederschlägen resp. Albumosenfällungen auch das Gift aussalzen; ferner erzeugen auch Metallsalze, so 5 %ige Kupfersulfatlösung, ebenfalls giftige Niederschläge, ebenso Lösungen von neutralem Kupferacetat oder Kupferchlorid, denen tropfenweise verdünnte Kali- oder Natronlauge zugesetzt wird. Sättigung mit Kochsalz erzeugt dagegen nach Faust keinen gifthaltigen Niederschlag und ebenso zweifelhaft scheint mir die Angabe, daß das Gift durch Einleiten von CO_2 ausgefällt werden könne. Entsprechend den angewandten Fällungsmitteln wurde das giftige Prinzip von den verschiedenen Autoren verschieden klassifiziert. Lucien Bonaparte (1843) zählte es zu den giftigen Eiweißkörpern und bezeichnete es als Viperin oder Echidnin, Weir Mitchell und Reichert (1883), welchen wir die ersten grundlegenden Arbeiten verdanken, hielten das Gift der Viper und der Klapperschlange für Globuline und „Peptone", während R. N. Wolfenden, der das Kobra- und Daboiagift genauer chemisch untersuchte, den verschiedensten Eiweißfraktionen Globulin, Albumin und Albumosen die Giftwirkung zusprach. Ferner fand Kanthack bei der Untersuchung des Kobragiftes eine Protalbumose wirksam und C. J. Martin mit M. G. Smith sahen bei der Untersuchung des Giftes der australischen Schlangen (Pseudechis porphyriacus und Hoplocephalus curtus) sowohl eine Protalbumose, wie auch eine Heteroalbumose, zum Teil auch Deuteroalbumosen als alleinige Träger der Giftwirkung an. Das Albumin hat sich als ungiftig erwiesen. Nach Ishizaka scheidet

Aceton aus der Giftlösung des Habugiftes alle wirksamen Bestandteile aus; der Niederschlag ist in Wasser schwer, dagegen in verdünnten Alkalien leicht löslich und hat nichts an Wirksamkeit verloren. Schütteln mit Äther oder Toluol, sowie mit Petroläther oder Schwefelkohlenstoff haben auf das Habugift keinen Einfluß: nur die wiederholte Behandlung des Giftes mit Schwefelkohlenstoff scheint dasselbe etwas abzuschwächen.

Für die weitere Aufklärung der chemischen Natur des Giftes und die Reinigung von der Hauptmasse der nur anhaftenden Eiweißkörper war insbesondere ein Umstand von großem methodischen Vorteil, durch den sich das Schlangengift von vielen anderen toxischen Antigenen auszeichnet, nämlich seine Beständigkeit bei relativ hohen Temperaturen, mitunter sogar bei Kochhitze. Bereits WOLFENDEN hatte festgestellt, daß das Sekret der Kobraschlange durch Erhitzen bis zum Sieden seine Giftigkeit nicht verliert und daß das ausgewaschene Eiweißkoagulum ungiftig ist, während das Filtrat infolge des Gehaltes an unkoagulablen Albuminstoffen seine Giftwirkung beibehält; die giftige Substanz kann aus dem Filtrate durch Alkohol gefällt und durch Lösen des Niederschlages in Wasser wieder gewonnen werden. Auf diesem Prinzip hat CALMETTE die Reinigung des Kobragiftes durchgeführt. CALMETTE löste in 100 ccm sterilem Wasser 1 g getrockneten Giftes und nach der Filtration dieser Lösung durch steriles Papier füllte er dieselbe in Glaskolben, welche versiegelt und während 30 Minuten auf 75° am Wasserbade erhitzt wurden; 24 Stunden später wurden sie neuerlich 15 Minuten auf 80° erhitzt und durch Papier filtriert, wobei die koagulierten Eiweißkörper am Filter zurückgehalten wurden. Das klare Filtrat wurde 24 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert und hierauf im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Der Trockenrückstand betrug 42 mg, deren Lösung die Biuretreaktion zeigte, mit MILLONS Reagens einen leichten Niederschlag gab, kein hitzekoagulables Eiweiß enthielt und auch keine Xantoproteinreaktion aufwies. Die Lösung enthielt nahezu das gesamte Gift des Ausgangsmaterials, doch war dasselbe gegen Hitze insofern empfindlicher als das nicht gereinigte, als es schon bei 80° in seiner Wirkung geschädigt wurde.

Die zur Prüfung bestimmten Schlangengiftlösungen bereitet CALMETTE in folgender Weise. Auf der Präzisionswage wird 0,10 g trockenes Kobragift abgewogen und dann in 10 ccm physiologischer NaCl-Lösung (0,8 : 100) gelöst, was nur einige Minuten in Anspruch nimmt. Nach vollständiger Auflösung wird die Flüssigkeit in ein Glaskölbchen getan und $^3/_4$ Stunden lang im Wasserbade auf 72° C erwärmt. Auf diese Weise werden die ungiftigen Eiweißstoffe zum Gerinnen gebracht, die neurotoxische Substanz jedoch nicht beeinflußt. Hierauf wird die Flüssigkeit durch sterilisiertes Filtrierpapier filtriert, nach dem Durchfließen sofort in Glaskölbchen, welche gleich mit der Flamme zugeschmolzen werden, oder in kleine sterilisierte Flaschen verteilt. Die Giftigkeit der Lösung kann an Versuchstieren festgestellt werden; vor Licht geschützt, läßt sie sich bis zu 6 Tagen aufbewahren. $^1/_{10}$ ccm dieser Lösung entspricht genau 1 mg Trockengift.

In jüngster Zeit ist es FAUST gelungen, das Neurotoxin der Kobra, welches er mit dem Namen Ophiotoxin belegt, nicht allein völlig eiweißfrei, sondern als einen stickstoffreien, saponinähnlichen Körper darzustellen, der jedoch im nativen Gifte an Eiweiß oder eiweißartige Stoffe salz- oder esterartig gebunden ist; durch „die Art der Bindung ist er vor den in freiem oder ungebundenem Zustande leicht eintretenden und

sein Unwirksamwerden herbeiführenden Veränderungen im Molekül geschützt" (Faust). Dadurch bleibt auch den älteren Befunden über den eiweißartigen Charakter des Schlangengiftes eine gewisse Bedeutung gewahrt. Auch Faust bedient sich in einem seiner Verfahren, welche an anderer Stelle noch ausführlich beschrieben werden, der Hitzekoagulation, indem er das in wässeriger Lösung befindliche Gift mit Essigsäure schwach ansäuert und auf dem Wasserbade 15 Minuten auf 90—95° erhitzt, während gleichzeitig Kochsalz bis zur Sättigung eingetragen wird. Das in groben Flocken ausgeschiedene koagulierte Eiweiß, welches die Hauptmenge der im nativen Gifte enthaltenen Eiweißkörper ausmacht, wird abfiltriert und erweist sich nach einmaligem Auswaschen mit Wasser als wirkungslos. Die wirksame Substanz geht mit den Albumosen und Peptonen quantitativ ins Filtrat; dasselbe wird zur Entfernung der Salze einer nicht zu lang dauernden Dialyse bis zur völligen Chlorfreiheit unterworfen und entweder im Vakuum über Schwefelsäure oder durch vorsichtiges Eindampfen konzentriert. Aus dieser Lösung lassen sich durch Zusatz von 10%iger Lösung von Metaphosphorsäure bis zur schwach sauren Reaktion die biuretartig reagierenden Substanzen ohne Schädigung der Giftwirkung entfernen. Aus dem Filtrat fällt Alkohol die wirksame, stickstoffreie Substanz.

Das Schlangengift dialysiert weder durch vegetabilische, noch durch tierische Membranen. Nach Calmette soll zwischen den Giften der Kolubriden und Viperiden insofern ein Unterschied bestehen, als erstere langsam durch vegetabilische Membranen, schwerer durch tierische diffundieren, während letztere überhaupt nicht dialysabel sind. Ähnlich soll bei der Filtration durch Porzellanfilter das Kolubridengift die Chamberlandkerze F ungeschwächt passieren, während das Viperngift und nach Madsen und Noguchi das Gift von Krotalus vermindert wird. Der Einfluß der Hitze auf die Giftwirkung ist, wie weiter ausgeführt wird, je nach dem verwendeten Sekrete ein recht verschiedener, indem sich die Gifte bestimmter Schlangen als thermostabil, die anderer als durch Hitze leichter zerstörbar erweisen. Das Licht schädigt das getrocknete Gift nicht, dagegen das native und gelöste Gift; dasselbe verliert, wenn es nicht aseptisch aufbewahrt wird, durch die leicht eintretende bakterielle Zersetzung seine Wirksamkeit; werden die Gifte, durch Chamberland- oder Berkefeldkerzen steril filtriert, so können sie im Dunkeln im Eisschranke in gut verschlossenen Flaschen mehrere Monate unverändert aufbewahrt werden. Bei der Einwirkung der Elektrizität in Form des konstanten Stromes wird das Gift infolge der Bildung von freiem Chlor aus den Chloriden und von Ozon vernichtet, während Wechselströme von hoher Frequenz, falls Temperatursteigerung vermieden wird, nach Marmier entgegen den Angaben von Phisalix keine Abschwächung, also auch keine Umwandlung zur Vaccine herbeiführen. Was die Einwirkung chemischer Agentien auf das Schlangengift anlangt, so beeinflussen Säuren und Alkalien bei gewöhnlicher Temperatur, mäßiger Konzentration und nicht zu langer Einwirkungsdauer nicht die Wirksamkeit des Giftes; nach Faust bleibt das native Kobragift in 2%iger Lösung bei einstündiger Einwirkung gleichen Volumens 5%iger Kalilauge bei Zimmertemperatur unverändert. Faust hat andererseits gefunden, daß schwache Säuren sogar einen günstigen Einfluß auf reine Ophiotoxinlösungen ausüben können insofern, als die Giftlösungen dadurch vor weitgehender Zersetzung und Abnahme ihrer Wirksamkeit geschützt werden. Speziell beim Eindampfen wässeriger Giftlösungen übt die Metaphosphorsäure eine schützende Wir-

kung aus, die durch andere Säuren, wie Schwefel-, Salz-, Salpeter- und Orthophosphorsäure, ebenso durch Weinsäure und Oxalsäure nicht erzielt werden kann; ob dieser noch ungeklärte Einfluß der Metaphosphorsäure mit der von KYES und SACHS und von MORGENROTH studierten Herstellung von resistenten Giftmodifikationen zusammenhängt, muß hier offen gelassen werden.

Eine große Reihe von verschiedenen chemischen Verbindungen ist dagegen imstande das Schlangengift zu zerstören, und einige von diesen haben behufs therapeutischer Maßnahmen eine Bedeutung erlangt. Insbesondere sind es verschiedene Oxydationsmittel, gegen welche das Gift äußerst empfindlich ist, wie z. B. Kaliumpermanganat in 1—5%iger Lösung (LACERDAS Antidot), 1%ige Chromsäure (KAUFMANN), Chlorkalk (LENZ) in Lösungen von 1:12 (CALMETTE). Diese letztere als Antidot benützte Lösung soll im Augenblick des Gebrauches mit dem fünf- bis sechsfachen Volumen destillierten Wassers verdünnt werden*). Ferner zerstören das Gift Bromwasser, Jodtrichlorid in 1%iger Lösung und das von CALMETTE als Gegenmittel ebenfalls empfohlene Goldchlorid in 1%iger Lösung, welches im Schlangengift einen in Wasser unlöslichen und ungiftigen Niederschlag erzeugt. Von Jodtrichlorid wurde in Analogie mit bakteriellen Toxinen des öfteren zur Abschwächung des Giftes behufs Immunisierung Gebrauch gemacht; so verwendeten FLEXNER und NOGUCHI neben Salzsäure Jodtrichlorid zur Herstellung bequem zu applizierender Krotalusgifte, da durch das unveränderte Gift, zum Teil wegen der schweren Lokalerscheinungen (Ödeme, Nekrosen), die Immunisierung nur sehr schwer gelingt. Dagegen ist das Gift resistent gegen schwache Karbolsäure, verdünntes (1:1000) Sublimat, Jod, Jodkalium und ebenso gegen Platinchlorid, mit welchem es ähnlich wie mit Gerbsäure Fällungen gibt.

Einige organische Substanzen sind interessanterweise imstande die so resistenten Schlangengifte ebenfalls in vitro zu schädigen. Hierher gehört vor allem die von FRASER entdeckte Eigenschaft der Galle mancher giftigen Schlangen, so der Kobra, Puffotter und der Klapperschlange, welche bereits in geringer Menge (in Bruchteilen von Milligrammen pro Kilogramm Tier) die Wirkung der Gifte aufheben, wenn sie mit diesen gemischt wird; eine ähnliche Wirkung hat auch die Galle anderer Tiere (Rindergalle), wenn sie in bestimmter Menge durch 24 Stunden mit dem Gift in Kontakt bleibt, ebenso auch glykocholsaures Natron. Nach CALMETTE bleibt auch bei 100°, ja selbst bei 120° erhitzte Galle noch wirksam, wenn auch schwächer; wenn die durch Hitze ausgefällten Bestandteile abfiltriert werden, bleibt die Wirkung jedoch aus. PHISALIX fand sowohl im Cholestearin, das aus Karotten und aus Gallenstein dargestellt, wie im Tyrosin, welches von BERTRAND aus Dahliaknollen erzeugt worden war, Mittel, welche imstande sind, die Wirkung des Vipergiftes zu verzögern; ähnlich wie Tyrosin wirkt auch der Saft der Dahliaknollen; auch die Chloroformdigestion mancher Pilze (*Agaricus edulis*) soll nach PHISALIX gegen das gleiche Gift immunisierend wirken. Auch diese Wirkungen werden durch selbst 100° übersteigende Erwärmung nicht beeinflußt. Nach CALMETTE handelt es sich bei diesen chemischen Vaccins keineswegs um irgendwelche der spezifischen Wirkung vergleichbare Be-

*) Nach neueren Untersuchungen von BRIEGER und KRAUSE gelingt es jedoch nicht, Tiere durch Einspritzung der Lösungen von übermangansaurem Kalium oder Chlorkalk gegen die Wirkungen des Kolubriden-, Krotalus- oder Vipergiftes zu schützen.

einflussung des Giftes, sondern um eine vorübergehende, durch Leukocyten vermittelte Resistenzsteigerung. In gleicher Weise ist auch die Wirkung mancher Organextrakte, so der Nebennieren (Myers), zu erklären; nach Flexner und Noguchi ist das Gehirn imstande die zwei- bis dreifache letale Dosis des Giftes von Ancistrodon contortrix (Copperhead) zu neutralisieren.

Was die Einwirkung proteolytischer Fermente anlangt, so zeigten Flexner und Noguchi, daß Pepsin oder Papayotin in Salzsäure das Hämorrhagin zerstören, welches jedoch auch durch 2—3 %ige Salzsäure allein nach 48stündiger Einwirkung unwirksam wird; auf das Neurotoxin wirken dagegen diese proteolytischen Fermente fast gar nicht ein. Über die Einwirkung des Pankreassaftes auf die verschiedenen Gifte lassen sich nur Schlüsse ziehen aus den Ergebnissen der Verfütterung. So konnte C. J. Martin Ratten eine Woche lang mit dem Gifte von Pseudechis, einer Kolubridenart, füttern, wobei die zugeführte Giftmenge hundertmal so groß war als die tödliche subkutane Dosis. Diese Unschädlichkeit des Kolubridengiftes beruht nach Calmette darauf, daß der Pankreassaft das Gift rasch zerstört. Dagegen ruft das Viperngift und das Bothropsgift (Krotaliden) infolge der intensiven lokalen Wirkung, per os gereicht, schwere Entzündungen des Magendarmkanals hervor. Calmette u. a. konnten durch Eingabe von Kobra- oder Krotalusgift Tauben und Hühner töten, während andere Autoren behaupten, daß Schlangengift ohne schädliche Folgen verschluckt werden kann. Neue Untersuchungen von Ishizaka über das Habugift zeigen, daß bei Darreichung per os an Kaninchen dasselbe völlig zerstört wird, ebenso wird die Giftwirkung durch eine relativ kurz dauernde Trypsinverdauung vernichtet. Vor kurzem hat Teruuchi gefunden, daß das Kobrahämolysin von reinem Hundedarmsaft nicht angegriffen, wohl aber zerstört wird von einem mit Darmsaft aktivierten Hundepankreassaft, gegen welchen das Kobralecithid resistent bleibt. Nach Morgenroth und Carpi verliert das hämolytische Prolecithid des Kobragiftes nach kurz dauernder Einwirkung von Pepsin in salzsaurer Lösung bei 37—40° seine Wirksamkeit, während neutrale Pepsinlösungen keinen Einfluß ausüben. Das isolierte hämolytische Lecithid, wie auch ältere Gemische von wässerigen Kobragiftlösungen mit wässerigen Lecithinsuspensionen sind im Gegensatz zu frischen derartigen Gemischen der Pepsinverdauung gegenüber resistent; Papain greift, denselben Forschern zufolge bei kurzdauernder Einwirkung weder das Prolecithid, noch das Toxolecithid an.

3. Verschiedene Giftkomponenten der Schlangengifte und Methoden ihrer Trennung und Darstellung.

Da die Giftdrüse der Schlangen der Parotis entspricht, so wird man von vornherein in ihrem Sekrete eine Reihe von Substanzen zu suchen haben, die teils fermentativer Natur die verschiedenartigsten antigenen Wirkungen zu erzeugen imstande sein werden. Während noch Phisalix in dem Giftsekrete der Schlangen nur eine Echidnase und ein Echidnotoxin unterschied, von denen die erste, fermentartige, Substanz die schweren lokalen Veränderungen, die letztere die resorptiven Wirkungen des Bisses erzeugte, kennen wir heute in dem nativen Drüsensekrete der Schlangen eine größere Zahl von Giften mit mannigfachsten physiologischen Wirkungen unterscheiden und dementsprechend auch eine Reihe von untereinander völlig verschiedenen Antigenen. Man unterscheidet Stoffe,

welche: 1. die Gerinnung des Blutes fördern; 2. die Gerinnung des Blutes aufheben; 3. die roten Blutkörperchen zerstören (Hämolysine); 4. die Agglutination der roten Blutkörperchen bedingen; 5. die weißen Blutkörperchen schädigen (Leukocidine); 6. bakteriolytisch und 7. proteolytisch und lipolytisch wirken; endlich 8. und 9. das bereits erwähnte Hämorrhagin und Neurotoxin und 10. die präzipitinogenen Stoffe des Schlangengiftes. Von diesen zahlreichen Giften haben neben dem Neurotoxin vor allem das Hämolysin das allergrößte wissenschaftliche Interesse und wir verdanken auch hier den Untersuchungen der Schule Ehrlichs eine große Anzahl der wichtigsten Tatsachen.

Man kann die einzelnen Antigene der Schlangengifte auf Grund der verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden. Am bequemsten lassen sie sich zunächst auf Grund ihres Verhaltens dem Erhitzen gegenüber in zwei Gruppen teilen, von denen die eine die thermolabilen, die andere die thermostabilen Stoffe umfaßt. Die Grenze bildet ein ca. $^1/_4$—$^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 70 bis 80°, wodurch die Stoffe, welche die Gerinnung beeinflussen, die proteolytischen, agglutinierenden und hämorrhagiparen Komponenten zerstört werden, während die Hämolysine, Cytolysine (Bakteriolysine) und Neurotoxine thermostabil bleiben. Nach Flexner und Noguchi zerstört 19 Tage langes Stehenlassen des Giftes bei 37° das Neurotoxin, das Hämolysin wird nur wenig und das Hämorrhagin gar nicht geschädigt. Da die einzelnen Giftkomponenten bei den verschiedenen Schlangenarten sehr verschieden verteilt sind, so wird die Erwärmung der einzelnen Gifte ganz verschiedene physiologische Effekte je nach der Schlangenart, von welcher das Gift abstammt, hervorbringen. So kann das Gift der Kolubriden (Naja, Bungarus, Hoplocephalus und Pseudechis australeus) und der Hydrophiinen bis 100° C oder durch kurzes Aufkochen erhitzt werden, ohne an seiner Wirksamkeit einzubüßen. Erst längeres Kochen oder Erhitzen über 100° vermindert die Toxizität, welche bei einer Temperatur von 120° völlig vernichtet wird. Ganz anders verhält sich das Gift der Viperiden (Bothrops, Krotalus, Viper); dasselbe ist ungleich empfindlicher und wird bei Erwärmen auf Gerinnungstemperatur des Eiweißes, also auf 70°, in seinen giftigen Eigenschaften bedeutend abgeschwächt; bei 80—85° werden dieselben schon völlig vernichtet. Das Bothropsgift büßt dieselben schon bei 65° zum Teile ein. Dieses differente Verhalten der verschiedenen Schlangensekrete ist darauf zurückzuführen, daß die Viperiden ihre deletären Wirkungen hauptsächlich oder zum größten Teile durch eine Giftkomponente entfalten, nämlich das von Flexner und Noguchi genauer studierte Hämorrhagin, welches bei den Kolubriden nur eine völlig untergeordnete Rolle spielt oder überhaupt fehlt; nur wenige Schlangenarten, wie die den Krotaliden zugehörige Gattung Ancistrodon s. Trigonocephalus sollen beide Giftkomponenten reichlich besitzen. Indeß enthalten auch die übrigen Viperiden, wie Calmette gezeigt hat, die neurotoxische Komponente, deren Wirkung in der Weise demonstriert werden kann, daß man das Gift 15 Stunden lang bei 70° erhitzt, die koagulierten Eiweißkörper abfiltriert und das Filtrat injiziert. Die nunmehr erhaltene toxische Wirkung ist nach Calmette die gleiche, wie die des Giftes der Kolubriden, nur etwa 10—20 mal schwächer. Nach Noc, einem Schüler Calmettes, besitzen die Krotaliden nur ein sehr schwach wirksames Neurotoxin oder überhaupt keines und der Tod der damit behandelten Tiere tritt infolge der durch Blutgerinnung,

Proteolyse und Hämorrhagien erzeugten Veränderungen ein. Noc verfuhr bei der Darstellung der neurotoxischen Komponente derart, daß er zur völligen Zerstörung des Hämorrhagins die Gifte auf 80° erhitzte und die koagulierten Eiweißkörper durch Zentrifugieren abtrennte. Bemerkenswert bleibt bei diesen Versuchen, daß die hämolytische Komponente nicht etwa parallel der hämorrhagiparen geht, sondern unabhängig von letzterer in den meisten Fällen, gleichwie die neurotoxische Komponente, sich als thermostabil erweist; nur das an sich schwache Hämolysin der Lachesis wird bei 80° zerstört. Nach Kyes und Sachs wird die hämolytische Komponente des Kobragiftes durch 20 Minuten langes Erhitzen auf 100° zerstört. Der qualitative Unterschied der beiden Giftarten, des Giftes der Kolubriden einerseits und der Krotaliden andererseits, zeigt sich auch in ihrer verschiedenen Antigenwirkung, indem ein Antikobraserum hauptsächlich im Sinne eines Antineurotoxins, ein Antikrotalusserum dagegen im Sinne eines Antihämorrhagins wirkt.

Neben der Möglichkeit die Gifte auf Grund ihres Verhaltens der Wärme gegenüber zu scheiden, gibt es noch andere Methoden ihrer Trennung. Zunächst sei hier einer physikalischen Methode gedacht, die Gifte durch Filtration voneinander zu trennen, nachdem das verschiedene Verhalten der einzelnen Gifte bei der Dialyse bereits hervorgehoben worden war. C. J. Martin ist es gelungen, durch Anwendung eines gelatinierten Tonfilters unter einem Druck von 50 Atmosphären das australische Pseudechisgift in zwei Substanzen zu zerlegen, einen nicht diffundirbaren, bei 82° gerinnenden Eiweißkörper und eine diffundirbare, nicht koagulable Albumose. Das erstere Produkt ruft Hämorrhagien hervor, während das letztere auf die Nervenzellen des Atmungszentrums einwirkt.

Wichtiger und für die chemische Natur der Gifte charakteristischer ist die Trennung durch chemische Agentien. Bereits Flexner und Noguchi haben durch Einwirkung von Salzsäure neben Jodtrichlorid zu Immunisierungszwecken eine Abschwächung der einzelnen Giftkomponenten zu erzielen versucht und dabei das verschiedene Verhalten der einzelnen Körper beobachten können. So hat 48stündige Einwirkung von 2 bis 3%iger Salzsäure das Hämorrhagin zerstört, während auf Hämolysin nur ein geringer, auf Neurotoxin gar kein Einfluß nachzuweisen war, ein Verhalten, das sich auch in gleicher Weise unter Anwendung von Pepsin und Papayotin in salzsaurer Lösung wiederholte.

Kyes und Sachs haben gezeigt, daß Kobrahämolysin in einer Lösung, welche $^1/_{18}$ Normalsalzsäure enthält, gegen thermische Einflüsse außerordentlich resistent wird, so zwar, daß es im Gegensatze zur nativen Giftlösung längeres Erhitzen auf 100° verträgt, ohne daß es eine Einbuße an seiner hämolytischen Wirksamkeit erleidet. Morgenroth konnte auch bezüglich des Neurotoxins nachweisen, daß ein sehr geringer Zusatz von Salzsäure, nämlich $^1/_{10\,000}$ Normalsalzsäure, das Neurotoxin derart verändert, daß einstündiges Kochen der wieder neutralisierten Lösung das Gift nicht zu zerstören imstande ist. Dagegen wird das Hämorrhagin des Krotalusgiftes durch Salzsäure nicht thermostabil. Die Gifte behalten nach den schönen Versuchen Morgenroths diese ihre Eigenschaften auch bei, wenn sie mit dem betreffenden Antitoxin neutralisiert worden sind, so daß mit Hilfe der Säureeinwirkung und nachträglichen Kochens leicht eine Lostrennung des Giftes vom Antitoxin aus neutralen Gemengen erfolgen kann. Hervorzuheben bleibt, daß das Salzsäurehämolysin nach Morgenroth nicht von einem mit dem nativen Gifte hergestellten Anti-

toxin neutralisiert wird, wohl aber noch imstande ist, die von KYES beschriebene Lecithidverbindung mit Lecithin zu liefern.

Stärkere Säure hat indessen einen ganz anderen Effekt auf die entsprechenden Gifte. So haben MORGENROTH und PANE gezeigt, daß Kobragiftlösungen in $^1/_{20}$ Normalsalzsäure längere Zeit zum Sieden erhitzt, das hämolytische Vermögen nahezu völlig verlieren; dieselben gewinnen es jedoch wieder nach mehrtägigem Stehen; ähnlich verhalten sich Lösungen, die in der Kälte einer längeren Einwirkung von Salzsäure ausgesetzt worden waren; die Autoren führen diese Phänomene auf die Bildung ungiftiger, jedoch reversibler Giftmodifikationen zurück. Die gleiche Modifikation erleidet auch das Neurotoxin des Kobragiftes, falls dasselbe 14 Tage hindurch im Eisschranke in $^1/_{20}$ Normalsalzsäure aufbewahrt wird. Die durch Salzsäure hervorgerufene Änderung äußert sich darin, daß die nach beendigter Einwirkung neutralisierte Lösung eine bedeutende Verlängerung der Inkubationszeit gegenüber dem nativen Gifte aufweist, welche bei längerem Aufbewahren des Giftes wieder schwindet und der akuten ursprünglichen Wirkung desselben Platz macht.

Nach KAUFMANN sollen Chromsäure und Permanganat die mit dem Hämorrhagin zusammenhängenden lokalen Wirkungen aufheben, dagegen das Neurotoxin intakt lassen.

Eine andere auf synthetischen Prinzipien beruhende chemische Methode hat KYES bei EHRLICH ausgearbeitet; diese Methode der sogenannten Lecithiddarstellung beruht darauf, daß sich gewisse Komponenten des Schlangengiftes, nämlich das Hämolysin, mit Lecithin zu einer Verbindung vereinigen, welche neue physikalisch-chemische und zum Teile auch physiologische Wirkungen aufweist. Dagegen tritt eine solche Verbindung des Lecithins mit dem Neurotoxin nicht auf. Man ist also auf Grund der Lecithiddarstellung imstande, die beiden thermostabilen Elemente des Schlangengiftes in bequemer Weise voneinander zu trennen. Nach den neuesten Angaben entsteht die Vereinigung von Hämolysin und Lecithin unter Abspaltung eines Ölsäurerestes.

KYES verfuhr bei der Darstellung des Lecithids derart, daß er 40 ccm einer 1 %igen Kobragiftlösung in 0,85 %iger Kochsalzlösung mit 20 ccm einer 20 %igen Lecithinlösung in Chloroform schüttelte und dann $^3/_4$ Stunden lang zentrifugierte. Die Chloroformschicht wird vorsichtig abgehoben und mit dem fünffachen Volumen chemisch reinen Äthers gefällt; der entstandene Niederschlag stellt das Kobralecithid dar, welches behufs weiterer Reinigung mit der 10—20fachen Menge Äthers geschüttelt und abermals zentrifugiert wird, um das ungebundene Lecithin vollständig zu entfernen. Man erhält auf diese Weise aus 1 g trockenen Kobragiftes 5 g trockenes Lecithid. Die hämolytische Wirkung des Kobragiftes geht dabei quantitativ in die neue Verbindung über, während die neurotoxische in der ausgeschüttelten Giftlösung zurückbleibt. Die genaueren Vorschriften der Lecithidreindarstellung sind im 2. Teile dieser Abhandlung angeführt.

Das Lecithid ist eine wasserlösliche Substanz, welche bei längerem Stehen in wässeriger Lösung sich in der Weise verändert, daß ein weißlicher, mikrokristallinischer Niederschlag entsteht, der sich erst beim Erwärmen löst und hämolytisch wirkt; diese Modifikation des Lecithids, welche sich auch beim Trocknen des Ätherniederschlages bildet, wird als sekundäres Lecithid bezeichnet. Das Lecithid gibt keine Biuretreaktion. KYES hat derartige Lecithide auch aus anderen Schlangengiften darstellen können.

Das Lecithid unterscheidet sich vom Lecithin durch seine Unlöslichkeit im Äther, seine Löslichkeit im Wasser, namentlich dann, wenn es ätherfeucht ist, vom Kobragift durch seine Löslichkeit in Alkohol, Chloroform und Toluol, an welche das Kobragift nichts von seiner wirksamen Substanz abgibt. In seiner physiologischen Wirkung unterscheidet sich das Kobralecithid von dem nativen Kobrahämolysin dadurch, daß das letztere bei $^1/_2$ stündigem Erwärmen auf 100° unwirksam wird, während das Lecithid auch bei 6stündigem Erhitzen auf 100° seine Wirksamkeit beibehält. Die absolute, zur Hämolyse nötige Menge ist für die Blutkörperchen verschiedener Spezies die gleiche, indem 0,003 mg 1 ccm einer 5%igen Blutaufschwemmung löst; während bei Zusatz von kleinen Mengen Kobragift allein oder Kobragift und Lecithin zu Blut die Hämolyse erst nach 6—18 Stunden komplett wird (Inkubationszeit), tritt dieselbe bei Zusatz von kleinen Mengen Lecithids sofort ein und ist in 15—20 Minuten komplet. Von großer Wichtigkeit ist ferner, daß das Lecithid als echtes Antigen wirkt und dabei ein Immunserum liefert, welches von dem mit nativem Gifte hergestellten Antivenin insofern different ist, als das Antivenin das Kobralecithid entweder überhaupt nicht oder nur unerheblich beeinflußt, während der Lecithidantikörper sowohl das Lecithid als auch das native Hämolysin neutralisiert.

Das durch Lecithiddarstellung von dem Hämolysin getrennte Neurotoxin unterscheidet sich insofern von dem in den nativen Präparaten vorhandenen, als es nicht mehr von dem durch Rohgift dargestellten Antivenin neutralisiert wird; selbst als Antigen benützt, liefert es jedoch ein Antitoxin, das analog, wie das auf die Hämolyse wirkende Kyessche Lecithidantihämolysin, sowohl reines Neurotoxin als auch Rohneurotoxin in seiner Nervenwirkung, wie Jakoby gezeigt hat, aufzuheben vermag.

Die Deutung des Lecithids als einer chemischen Verbindung des Hämolysins mit dem Lecithin, die unter Austritt eines Fettsäurerestes sich bildet, muß indessen nach neueren Untersuchungen von Neuberg und Rosenberg einerseits und von L. Michaelis und Rona andererseits insofern modifiziert werden, als die ersteren Autoren sowohl im Kobragift, als auch im Mokassin- und Krotalusgift, wie auch im Ricin und Krotin ein lipolytisches Ferment nachwiesen, das speziell das Lecithin in exquisiter Weise, aber auch Oliven- und Rizinusöl unter Abscheidung freier Fettsäuren zu spalten vermag, so daß das Auftreten freier Ölsäure bei der Lecithidbildung keineswegs für die Bildung einer neuen chemischen Verbindung verwertbar ist. Andererseits zeigen Michaelis und Rona, daß gewisse kolloidale Albumosen und Fermente (Lab) — Reiss hatte bereits gefunden, daß Lab und Trypsin beim Ausschütteln einer wässerigen Fermentlösung mit einer Chloroformlecithinlösung zum Teile in Chloroform übergeht — sowohl mit Lecithin, als auch mit dem diesem physikalisch gleichstehenden Mastix Verbindungen geben, wie sie durch gegenseitige Bindung von verschiedenen Kolloiden entstehen, ohne daß aber eine chemische Verbindung von konstanter Zusammensetzung gebildet werden müßte. Die dabei entstehenden Produkte — „primäre" Verbindung — ändern ganz analog dem Giftlecithid ihre physikalischen Eigenschaften, indem sie zum Teile chloroformlöslich oder völlig alkohol-chloroformlöslich werden; aus den klaren Alkohol-Chloroformlösungen läßt sich durch Äther ein albumosenreicher Niederschlag — sekundäre Verbindung — ausfällen, der aber keineswegs, wie die mit Mastix durchgeführten Experimente zeigen, die Annahme eines chemisch wohldefinierten „Peptonlecithids" rechtfertigt, da sich aus der analogen Mastixpeptonverbindung

nach Aufnahme in Wasser durch wiederholtes Waschen mit Äther reines Pepton in wässerige Lösung bringen läßt, wobei der Mastixrest in Flocken zurückbleibt. Der nach Extraktion des Mastixpepton oder Lecithinpepton mit Äther zurückbleibende Rest, die „sekundäre“ Mastixpeptonverbindung, unterscheidet sich von der primären einfach durch den geringeren Mastixgehalt und durch die offenbar dadurch bedingte größere Wasserlöslichkeit des Peptons.

Eine einfache Trennungsmethode des Hämorrhagins vom Hämolysin und Neurotoxin hat jüngst T. Ishizaka unter H. Meyers Leitung gelegentlich der Untersuchung des Habugiftes ausgearbeitet. Dieselbe besteht im folgenden: Schüttelt man die Giftlösung etwa 10 Minuten mit dem gleichen Volumen Chloroform, so entsteht eine Emulsion, die sich durch Zentrifugieren in eine klare wässerige Oberschicht und einen weißen, dickrahmartigen Bodensatz trennen läßt; mit der abgehobenen klaren wässerigen Schicht wird behufs weiterer Reinigung die gleiche Prozedur etwa 3—4 mal wiederholt. Dieselbe erweist sich dann völlig frei von Hämorrhagin, zeigt aber nahezu unverändert die hämolytische Kraft und die neurotoxische Wirkung des Ausgangsmaterials. Das Hämorrhagin ist in der Chloroformemulsion in einer unwirksamen Form (Toxoid) enthalten, aus welcher es weder durch Lecithin noch durch andere Mittel reaktivierbar ist. Wird die Emulsion durch Zusatz des gleichen Volumens Petroleumäthers gesprengt, so bleibt eine weiße, koagulierte, in Wasser und Säuren unlösliche, in schwachen Alkalien wenig und in konzentrierten leicht lösliche Masse zurück. Dieselbe Methode läßt sich nach Ishizaka zur Entfernung des Hämorrhagins auch für die Gifte der übrigen Viperiden und Krotaliden verwenden und hat den Vorteil der quantitativen Ausbeute an Neurotoxin, welches nach Ishizaka bei der Trennung durch Erhitzen erheblich geschädigt wird.

Eine Trennung der verschiedenen Komponenten kann endlich mit Hilfe der Absorptionsmethode nach Noc erzielt werden. Man kann z. B. das Hämolysin durch Bindung an empfängliche rote Blutkörperchen aus dem nativen Gifte entfernen, während das Neurotoxin zurückbleibt, und umgekehrt läßt sich das Neurotoxin durch Gehirnbrei binden, während das Hämolysin übrig bleibt, welches erst seinerseits durch Zusatz von Erythrocyten abgesättigt werden kann. In gleicher Weise kann man auch die hitzebeständigen Cytolysine (Bakteriolysine) der Schlangengifte von den Hämolysinen trennen, indem man die Bakteriolysine durch Eintragen von Bakterien (Milzbrand, Cholera) absättigt; der unveränderte Bestand des durch das Antivenin neutralisierbaren Hämolysins weist auf die Selbstständigkeit beider Giftkomponenten hin. In gleicher Weise läßt sich die Unabhängigkeit der Cytolysine von dem Neurotoxin dartun. Auch die Cytolysine werden durch das Antivenin neutralisiert und stellen daher wirkliche Antigene dar.

4. Eigenschaften der einzelnen Giftkomponenten.

Die allgemeinen physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Giftkomponenten ergeben sich zum Teile aus den vorstehenden Trennungsmethoden, zum Teile sollen sie im folgenden, soweit sie auf die Antigendarstellung Bezug haben, in kurzem unter Berücksichtigung der Schlangenspezies bei den einzelnen Giften angeführt werden; die näheren Details müssen in den speziellen Kapiteln nachgeschlagen werden.

Die verschiedenen Gifte sind, wie bereits früher erwähnt wurde, bei den einzelnen Schlangenarten durchaus nicht gleichmäßig verteilt und man kann sogar, wie dies Noc, ein Schüler Calmettes, getan hat, das Vorkommen der einzelnen Giftqualitäten als Basis oder als Vervollständigung der zoologischen Klassifikation benützen. So fand Noc bezüglich der koagulierenden Wirkung der Gifte auf das Blut, daß die Kolubriden, zu denen die von ihm untersuchte Cobra, Naja nigricollis und Bungarus coeruleus gehören, das Blut in vitro niemals koagulieren und auch Kochsalz, Oxalat, Citrat und Fluoridplasma, noch Blutegelplasma zum Gerinnen bringen können. Dagegen vermögen Krotaliden und Viperiden mit Ausnahme zweier nordamerikanischen Krotalidenarten, des Ancistrodon piscivorus und Ancistrodon contortrix, deren Sekret sich übrigens durch den reichlichen Gehalt an Neurotoxin von den übrigen Krotalusarten schon unterscheidet, bereits in Dosen von 1 mg zu 1 ccm der verschiedenen Plasmaarten zugesetzt, eine sofortige Gerinnung des Blutes herbeizuführen und wirken ähnlich auch in vivo. Dabei wirken am stärksten die den Krotaliden zugehörigen Lachesisarten (Lachesis lanceolatus auf Martinique und die brasilianischen Bothropsschlangen), am schwächsten die den Viperiden angehörende birmanische Daboia. Indeß spielt dabei die angewendete Giftquantität eine große Rolle, indem z. B. das bei einer kleinen Dose von 1 mg angewendete, stark die Gerinnung fördernde Gift des Lachesis lanceolatus in einer Menge von 4 mg bereits eine Gerinnungshemmung herbeiführte, andererseits nach C. J. Martin das Gift der australischen Kolubridenart, Pseudechis porphyriacus, welches bei der intravenösen Injektion von großen Mengen momentane intravaskuläre Gerinnung des Blutes herbeiführt, bei Injektion von kleinen Mengen das Blut völlig ungerinnbar macht, so daß auch eine spätere Injektion von größeren Mengen keine Blutgerinnung erzeugt (positive und negative Phase der Blutgerinnung). Während aber die Gerinnungswirkung der Hauptsache nach den Krotaliden und Viperiden zukommt, ist die sowohl in vivo, wie auch in vitro eintretende Gerinnungshemmung in verschiedenem Grade allen Schlangengiften gemeinsam; die Prüfung der Gerinnungshemmung in vitro erfolgt dabei derart, daß zu dem mit dem Gifte versetzten Oxalatplasma nach einiger Zeit (ca. 15 Minuten) Calciumchloridlösung zugefügt wird. Die nachfolgende Tabelle 4 gibt nach Noc die für das Eintreten der Gerinnungshemmung nötigen Giftmengen verschiedener Schlangen wieder:

Tabelle 4.

Gift	Dosis	Plasma	Resultat nach Zusatz von 1 ccm 0,5%iger $CaCl_2$-Lösung 10 Minuten nach dem Giftzusatz
Ancistrodon piscivor. . .	1 mgr	1 ccm	Gerinnung nach 15 Minuten
Ancistrodon contortr. . .	2 mgr	1 ccm	keine Gerinnung nach 24 Stunden
Lachesis lanc.	4 mgr	1 ccm	" " " " "
Vipera Russellii	6 mgr	1 ccm	" " " " "
Naja tripud. (Kobra) . .	10 mgr	1 ccm	" " " " "

Die durch das Schlangengift herbeigeführte Gerinnungshemmung kann nach Noc weder durch Zusatz von gerinnungsbeschleunigenden Schlangengiften (Zusatz von Lachesisgift), noch durch Antivenin oder

Normalserum aufgehoben werden. Nach MORAWITZ gerinnt indes Kobragiftplasma auch nach Zusatz von Serum und von kinasehaltigem Gewebssafte, und das Gift wirkt durch Behinderung der Entstehung des Fibrinfermentes, indem es die Aktivierung des Thrombogens durch Thrombokinase unmöglich macht. Wurde das Thrombogen vor dem Zusatz des Giftes, etwa durch Zusatz von Serum und Kinase aktiviert, so hat das Schlangengift keine Wirkung mehr. Das Kobragift scheint nach MORAWITZ einen Antikörper und zwar eine Antikinase zu enthalten. Nach NOC soll die fibrinolytische Wirkung der Schlangengifte das Phänomen der Gerinnungshemmung erklären. Das Antivenin ist weder imstande die gerinnungsfördernde, noch gerinnungshemmende Wirkung aufzuheben und zwar nach NOC aus dem Grunde, weil dasselbe erzeugt ist durch Gifte, welche auf 70° erhitzt worden sind; bei dieser Temperatur gehen jedoch die Substanzen, welche die Gerinnung beeinflussen, zugrunde und unterscheiden sich auf diese Weise von den noch bei 80° hitzebeständigen Hämolysinen des Schlangengiftes. Nur durch Anwendung nicht erhitzter Gifte als Antigene wäre es möglich, auch gegen diese Substanzen Gegenkörper zu erzeugen.

Mit der gerinnungshemmenden Komponente des Schlangengiftes ist, wie NOCS neuere Untersuchungen zeigen, innig vergesellschaftet auch das proteolytische Vermögen derselben; es wird, wie das antikoagulierende, durch ein $^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 80° zerstört, und jene Schlangenarten, welche die stärkste gerinnungshemmende Wirkung ausüben, wie die Krotalusarten, besitzen auch das stärkste proteolytische Vermögen. Dagegen ist die Proteolyse bei Kobra und den übrigen Kolubriden eine nur relativ schwache. Diese proteolytische Wirkung, welche bereits MITCHELL und REICHERT an der Erweichung des Muskelgewebes durch Schlangengift beobachtet haben, konnten auch FLEXNER und NOGUCHI an dem Gifte von Krotalus und der Kobra bei deren Einwirkung auf Gelatine und Muskelfasern konstatieren; dagegen erhielten sie bei der Einwirkung auf bei 62° erhitztes Fibrin, sowie auf geronnenes Hühnereiweiß kein Resultat. LAUNOY konnte das gelöste Kasein und die Lösungen von Eiweißkörpern des Rinderserums mit Kobra- und Viperngift verdauen, dagegen konnte er, wie DELEZENNE, FLEXNER und NOGUCHI, feststellen, daß diese Gifte interessanterweise ohne Einfluß sind auf koaguliertes Serum und Eiweiß. Nach NOC ist 1 ccm einer 1 %igen Giftlösung von stark wirksamen Krotalusgift imstande, in 2 Stunden 3 cg Fibrin zu lösen, 1 ccm eines 1 %igen Kobragiftes greift dieselbe Menge Fibrin in 24 Stunden an. Ähnliche Resultate lassen sich auch bei der Verwendung von Thymolgelatine erhalten, welche sich nach der Methode von MALFITANO sehr gut zum quantitativen Vergleich der proteolytischen Wirkung eignet. Diese auch für die Messung der Bakterienproteolyse gut verwendbare Methode besteht im folgenden: 20 %ige Gelatine wird mit Thymol im Verhältnis von 2 g auf 1 l versetzt; man verwendet 1 ccm dieser Gelatine, indem man dieselbe mit 1 mg des Giftes (0,1 ccm der 1 %igen Giftlösung) in kleinen Eprouvetten gut mischt und in den Brutschrank bei 37° einstellt. Die Proben werden alle Stunden auf die eingetretene proteolytische Wirkung in der Weise geprüft, daß sie in Wasser bei 15° eingetaucht werden. Der Zeitpunkt, bei welchem die Gelatine bei 15° dauernd verflüssigt bleibt, bezeichnet den Endpunkt der Reaktion und man mißt nach der zur bleibenden Verflüssigung nötigen Zeit die Stärke der Proteolyse. Die antiproteolytische Wirkung der polyvalenten Schlangensera CALMETTES

kann unter Umständen zur Prüfung der antihämorrhagischen Wirkung dieser Sera verwendet werden, da die antiproteolytische Wirkung mit der antihämorrhagischen parallel verlaufen soll.

Die hämolytischen Antigene der Schlangengifte stellen, wie aus den Untersuchungen von Flexner und Noguchi, Kyes und Sachs hervorgeht, keine einheitlichen Toxine dar, sondern sind nach der Art der Serumhämolysine Körper, welche erst durch Zusatz eines zweiten Körpers aktiviert werden, also nach Ehrlich Ambozeptoren, welche als Komplement respektive Aktivator das im Serum oder den roten Blutkörperchen vorhandene Lecithin benötigen. Dasselbe kann auch durch die anderen lecithinhaltigen Körpersäfte z. B. die Galle, die Milch, ferner durch Kephalin, welches nach Koch Dioxystearylmonomethyllecithin ist, zugeführt werden. Da das Lecithin in den verschiedenen Zellen und Flüssigkeiten nach Kyes und Sachs verschieden gebunden ist, verhalten sich die verschiedenen lecithinhaltigen Substrate ungleich. Während z. B. Lecithin und kristallisiertes Pferdehämoglobin im Gemisch aktivierend wirken, geht diese Wirkung beim Erhitzen des Gemenges auf 62°, wobei eine Bindung des Lecithins stattfinden soll, verloren. Beim Erhitzen des Serums oder der Milch auf 100°, wobei diese erst aktivierend werden, soll dagegen die vorher bestandene Lecithinbildung wieder gelockert werden. Nach Noguchi kann auch eine Aktivierung der Hämolyse durch Zusatz von Triolein und von Ölsäure eintreten. Ähnlich wie bei der Saponinhämolyse kann auch bei der Kobrahämolyse das Cholestearin die Rolle eines Schutzkörpers spielen.

Die einzelnen Schlangengifte verhalten sich auch in bezug auf die hämolytische Wirkung recht verschieden und folgen auch hier nach Noc im wesentlichen dem bereits wiederholt erwähnten zoologischen Einteilungsprinzip, indem die Kolubriden das höchste hämolytische Vermögen, die Viperiden und Krotaliden ein geringeres aufweisen; während nach Noc 1 mg des Kobragiftes in fünf Minuten eine völlige Hämolyse eines Kubikzentimeters roter Pferdeblutkörperchen bei Gegenwart von 0,2 ccm auf 58° erhitzten Normalpferdeserums erzeugt, löst das Daboiagift erst in 30 Minuten, das Gift von Copperhead in 60 Minuten und jenes von Bothrops erst in 3 Stunden die gleiche Blutmenge unter denselben Verhältnissen.

Da nach Calmette die antineurotische Wirkung und die antihämolytische parallel verlaufen, empfiehlt er zur Prüfung der Antitoxine auch Reagenzglasversuche; indessen sollen nach Noguchi in dieser Beziehung bei den Antiseren große Unterschiede und durchaus keine Übereinstimmung der antitoxischen und antihämolytischen Wirkung bestehen.

Die dem Schlangengifte schon von Lacerda zugeschriebene diastatische Wirkung konnte von Schülern Calmettes nicht bestätigt werden.

Wie bereits früher erwähnt wurde, haben Neuberg und Rosenberg auf Grund der Untersuchungen von Ehrlich, Kyes und Sachs und Kyes die lipolytische Wirkung der nativen Gifte von Kobra, Mokassin und Krotalus auf Lecithin (gereinigtes Lecithin Agfa), auf Rizinus- und Olivenöl geprüft und in der Tat eine recht erhebliche Wirkung, wie aus der beifolgenden Tabelle 5 hervorgeht, gefunden. Die Lipolyse wird dabei entsprechend den Angaben von Connstein und Hoyer für die Lipasen der Pflanzensamen und von R. Magnus für die Pankreaslipase durch Zusatz von Manganosulfat bedeutend verstärkt. Auch der Befund von Kyes über die Abspaltung eines Ölsäurerestes bei Bildung der Kobralecithidverbindung dürfte in gleicher Weise auf die lipolytische Wirkung

des Giftes zurückzuführen sein (siehe auch LÜDECKE). NEUBERG und ROSENBERG benützten vom Kobragift 0,2 g in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung, von Mokassingift 0,4 g in 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung, von Krotalusgift 0,3 g in 20 ccm Wasser (Tabelle 5).

Tabelle 5.

Angewandt	Azidität		Betrag der Fettspaltung in ccm n/10 KOH
	vor der Spaltung ccm n/10 KOH	nach der Spaltung ccm n/10 KOH	
1. Cobragift 1 ccm Gift 10 ccm Lecithinlg. (0,5 gr in 20 ccm H_2O)	1,0	6,3	5,3
2 ccm Gift 10 ccm Lecithinlg.	1,4	20,5	19,1
2. Mokassingift 2 ccm Gift 10 ccm Lecithin	1,0	6,7	5,7

Während Lecithin sehr erheblich gespalten wird, so daß bei den einige Zeit aufbewahrten Proben die abgeschiedenen Fettsäuren auf der Flüssigkeit schwimmen, sind die bei der Verseifung der wahren Fette erreichten Werte viel geringer.

Was die präzipitinogene Komponente der Schlangengifte anlangt, so ist dabei von Wichtigkeit, daß nach LAMB die Wirkung der spezifischen Präzipitine durchaus nicht parallel mit der Spezifizität der Giftwirkung einhergeht. Denn das Serum von Kaninchen, welche mit Kobragift immunisiert worden waren, lieferte ein Präzipitin, das in gleicher Weise mit dem physiologisch sich durchaus anders verhaltenden Gift von Daboia Russellii reagiert. Diese Tatsache beweist u. E. nur die nahe Verwandtschaft der in den verschiedenen Giften vorhandenen präzipitinogenen Eiweißkörper, spricht jedoch durchaus nicht für, noch gegen den Zusammenhang der Giftwirkung mit den Proteinen oder für die Gemeinsamkeit der haptophoren Gruppen des Kobra- und Daboiagiftes.

Bezüglich der Agglutinine, Leukocidine und Cytolysine der Schlangengifte sind keinerlei physikalisch-chemische Methoden von besonderem Interesse hier anzuführen.

5. Abschwächungsmethoden der Schlangengifte zu Immunisierungszwecken (Toxoidbildung).

Wie bereits früher erwähnt worden war, erzeugen die meisten Schlangengifte schwere lokale Störungen, welche sich in dem Auftreten von Ödemen, heftigen Entzündungen, Hämorrhagien und selbst Nekrosen äußern. Die Stoffe, welche diese Störungen veranlassen, stehen im Zusammenhange mit dem Hämorrhagin und lassen sich demnach ebenso, wie dieses entfernen. Man kann auch, um die lokalen Wirkungen zu umgehen, die intravenöse Injektion der subkutanen vorziehen (FARLAND); von großem Interesse ist ferner die von ISHIZAKA erfolgreich einge-

schlagene Methode der Immunisierung mit nativem Habugifte per anum, welche zeigt, daß das Schlangengift vom Dickdarm aus resorbiert wird und antigen wirkt, während per os weder eine aktive noch passive Immunität zu erzielen ist. Die physikalischen und chemischen Methoden, welche behufs Abschwächung der verschiedenen Giftkomponenten hier angewandt worden sind, sind nun folgende:

Phisalix und Bertrand verwendeten bei der Immunisierung von Meerschweinchen gegen Viperngift Gifte, welche 5 Minuten auf 75° erhitzt worden waren und fanden auch, daß das giftige Serum der Viper und Natter bei 15 Minuten langem Erwärmen auf 58° zwar seine toxische, aber nicht seine immunisierende Kraft einbüßt; auch das durch hochgespannte Ströme geschwächte Gift immunisiert noch. Nach Ishizaka empfiehlt es sich, bei hämorrhaginhaltigen Giften die Erhitzungstemperatur nicht unter 62° zu wählen, da sonst ausgedehnte Nekrosen von den Injektionsstellen aus entstehen.

Das Abschwächungsverfahren, welches Calmette bei dem Kobragift einschlägt, ist folgendes: Calmette verwendet zuerst zur Injektion geringe Mengen des Giftes, welche mit der gleichen Qualität einer 1 %igen Chlorkalklösung gemischt werden. Allmählich wird die Menge des Giftes bei den nächsten, in 3—4tägigen Intervallen folgenden Injektionen erhöht, bis nach vier Injektionen gechlorten Giftes mit der Hälfte der tödlichen Minimaldosis des reinen Giftes die Behandlung fortgesetzt wird, um dann auf 3/4 und die volle tödliche Dosis zu steigern. Man kann so in drei Monaten ein Kaninchen gegen die 20fache und in fünf Monaten gegen die 100fache letale Dosis schützen.

Flexner und Noguchi, sowie Madsen und Noguchi bedienen sich bei der Immunisierung gegen Krotalusgift, mit welchem im unveränderten Zustande die Immunisierung nur sehr schwer gelingt, des Salzsäure- oder Jodtrichloridzusatzes zur Toxoidbildung. In jüngster Zeit hat Ishizaka eine ganze Reihe von Methoden angegeben, durch welche eine Abschwächung der Giftwirkung ohne Verlust der Antigennatur eintritt. Es gelang ihm zunächt mit durch Chloroform abgeschwächten Giften sowohl antitoxische, wie auch präzipitierende Sera mit strengster Spezifität gegenüber dem verwendeten Habuhämorrhagin zu erhalten, indem sich das erhaltene Serum gegenüber dem nahestehenden Trigonocephalushämorrhagin als unwirksam erwies. Ebenso kann auch Schwefelwasserstoff zur Toxoidbildung führen, indem in die Giftlösung so lange Schwefelwasserstoff eingeleitet wird, bis weiße flokkige Koagula sich ausscheiden; aus dem Filtrat wird der gelöste Schwefelwasserstoff durch einen Strom von CO_2 oder Luft vollständig entfernt und nach nochmaliger Filtration das Präparat verwendet; wiewohl auf diese Weise dieses seine Giftigkeit zum größten Teile eingebüßt hat, wirkt es ganz gut antigen. Eine weitere Methode der Abschwächung ist die 24stündige bei 37° durchgeführte Digestion des Giftes zu gleichen Teilen mit Eisessig, wodurch die hämorrhagieerzeugende Fähigkeit des Habugiftes völlig schwindet; nach Neutralisation der Lösung erweist sie sich als gut immunisierend.

Wie aus dem Gesagten bereits hervorgeht und durch die Arbeiten von Calmette und seinen Schülern, besonders aber von Flexner und Noguchi, Lamb, Kyes, Martin u. a. so auch durch die jüngsten Untersuchungen von Noguchi und Ishizaka festgestellt worden ist, zeigen die Antigene der verschiedenen Schlangengifte im Gegensatze zu den älteren Anschauungen eine ziemlich strenge Spezifizität, welche sich in

der spezifischen Wirkung der verschiedenen durch sie erzeugten Sera ausprägen; aus diesem Grunde schlug auch CALMETTE die Herstellung „polyvalenter“ Sera durch Immunisierung von aus Neurotoxinen und Hämorrhaginen (Gift von Kobra und Daboia) hergestellten Gemischen vor. Von Interesse demgegenüber ist der Befund von CALMETTE und METSCHNIKOFF, daß das durch Kobragiftimmunisierung gewonnene Serum auch das Gift der großen afrikanischen Skorpione zu neutralisieren vermag.

C. Darstellung der Antigene aus den Hautdrüsen der Kröte und gewisser Salamanderarten.

Unter den in den Hautdrüsen der Krötenarten befindlichen vielfach untersuchten Giften, von denen wir in neuerer Zeit durch die Untersuchungen FAUSTS das seiner Wirkung nach zur Digitalingruppe gehörige Bufotalin und das qualitativ ähnlich, quantitativ aber schwächer wirkende Bufonin chemisch genauer kennen gelernt haben, befindet sich auch ein hämolytisch wirkendes Antigen, nämlich das von PRÖSCHER untersuchte und benannte Phrynolysin. Nach FAUST stellt das Bufotalin eine N-freie, chloroformlösliche Säure dar, welche ein Oxydationsprodukt des mit dem Cholestearin in Beziehung stehenden und kristallinisch zu gewinnenden Bufonins ist; das Phrynolysin PRÖSCHERS spielt nach FAUST bei der charakteristischen Herzwirkung des Krötengiftes keine Rolle, doch vermutet er, daß der saure Charakter des Bufotalins die Einwirkung des Giftes auf Blut und Hämoglobin, welche nach den ersten Beobachtungen von PUGLIESE in der Lösung von roten Blutkörperchen und in Methämoglobin- und Hämatinbildung besteht, erklärt. Doch ist nach PRÖSCHER die hämolytische Wirkung des Phrynolysins sowohl in saurer, wie neutraler Lösung die gleiche.

PRÖSCHER stellte sein Phrynolysin durch Verarbeitung der Bauch- und der Rückenhaut der Feuerkröte, des Bombinator igneus, als auch der gemeinen Gartenkröte, Bufo cinereus, dar; auch das Blut und die Muskel enthalten das Gift, jedoch in viel geringerer Menge, wie dies bezüglich des Blutes bereits PHISALIX und BERTRAND auch für die übrigen Gifte feststellen konnten. Die frisch gefangenen Kröten werden mit physiologischer Kochsalzlösung gut abgespült, dekapitiert und enthäutet. Die Haut wird nochmals mit Kochsalzlösung gewaschen und mit Glaspulver zu einem möglichst homogenen Brei verrieben, der nach Zusatz von 2—3 ccm physiologischer Kochsalzlösung filtriert und zentrifugiert wird. Die resultierende, schwach sauer reagierende Flüssigkeit wird zur Konservierung mit Toluol versetzt und wegen großer Labilität im Eisschrank aufbewahrt. Der aus den Hautdrüsen der Feuerkröte gewonnene Auszug wirkt viel intensiver hämolytisch als jener der Gartenkröte. FAUST verwendete zu der Darstellung seiner Gifte fast ausschließlich die Gattung Bufo vulgaris, wobei die Tiere mit Chloroform getötet, dann abgehäutet, und die abgezogenen Häute auf 2—3 Wochen in 96 %igen Alkohol behufs Eiweißfällung und Extraktion der wirksamen Bestandteile eingelegt wurden. Andere Forscher benützten, um möglichst reichliches Sekret zu gewinnen, das auf physikalische oder chemische Reize abgesonderte Sekret.

Über die allgemeinen Eigenschaften des Phrynolysin macht PRÖSCHER folgende Angaben: Dasselbe ist äußerst labil, Erwärmen auf 56°, Stehenlassen am Licht, Zusatz von Alkohol, Äther, Chloroform, Mineralsäuren, starke Kalilauge, Pepsin und Trypsin zerstören es in kurzer Zeit, selbst

Eintrocknen über Phosphorsäureanhydrid schwächt es ab; das Phrynolysin dialysiert nicht. Beim Aufbewahren unter Toluol und im Eisschrank bewahrt es längere Zeit seine hämolytische Kraft; erst nach 1—2 Monaten wird es unwirksam. Am stärksten ist die hämolytische Wirkung auf Hammelblut (noch in einer Giftverdünnung von 1:10000), dann auf Ziegen- und Kaninchenblut, schwächer auf Vogelblutkörperchen und völlig negativ auf das Blut von Frosch und der Kröte; eine Kompletierung des bei 56° inaktivierten Hämolysins ist bisher nicht gelungen. Kaninchen können durch subkutane Injektion geringer Dosen ($^1/_2$ ccm = Anfangsdosis) immunisiert werden.

Nach Faust soll dem Krötengift das aus gewissen Hautdrüsen abgesonderte und von Capparelli beschriebene Gift des Wassersalamanders, Triton cristatus, nahestehen und mit diesem auch die hämolytische Wirkung auf die roten Blutkörperchen gemeinsam haben; es läßt sich nach der Stas-Ottoschen Methode aus saurer Lösung in Äther bringen und ist N-frei. Die alkaloidartigen Gifte, die im Hautsekret des Feuersalamander enthalten sind und von Faust rein dargestellt worden sind, das Samandarin und Samandaridin, konnten bisher nicht als Antigene verwendet werden. Dagegen fand Phisalix in der Rückenhaut des japanischen Salamanders (Sieboldia maxima) ein wasser- und glyzerinlösliches Gift, das bei 60° in 20 Minuten zerstört wird und neben Ödemen, Hämorrhagien und Nekrosen Lähmungen, insbesondere des Atmungszentrums, wie die Schlangengifte, erzeugt und immunisierende Eigenschaften besitzt; Phisalix konnte mit dem bei 50° abgeschwächten Gifte immunisieren. Die so vorbehandelten Tiere waren nicht allein gegen das Salamandergift, sondern auch merkwürdigerweise gegen das Vipergift, wie auch gegen das Aalgift resistent.

D. Darstellung von Antigenen aus den Giftdrüsen gewisser Fische.

Von den zahlreichen Giftfischen kommen nach bisherigen Untersuchungen hier in Betracht der Trachinus draco (das große Petermännchen) und wohl die nächsten Verwandten Trachinus vipera (das kleine Petermännchen) und Trachinus radiata (das gestreifte Petermännchen), welche zwei Giftorgane, eines an dem Kiemendeckel, das andere an der Basis der Stacheln der Rückenflosse besitzen und das Gift durch die aufrichtbaren Stacheln entleeren. Briot hatte die Antigennatur des Giftes von Trachinus draco durch Immunisierung von Kaninchen und Darstellung von Antikörpern festgestellt; es ist nach Briots Befunden wahrscheinlich, daß die hämolytisch wirkende Substanz des Giftes sich dem Schlangengifte insofern analog verhält, als das an und für sich unwirksame Trachinusgift erst durch Zusatz von erhitztem Pferdeserum hämolytische Funktionen erlangt, so daß die Möglichkeit der Wirkung auf Grund einer Lecithidverbindung nach Kyes besteht. Doch vermag ein mit Kobragift erzeugtes Antiveninpferdeserum das Trachinusgift in keiner Weise, weder in der toxischen, noch in der hämolytischen Komponente zu neutralisieren. Um eine größere Giftmenge zu erhalten, verfuhr Briot derart, daß er mit einer Schere die Giftstacheln samt dem anliegenden Gewebe ausschnitt, in einem Mörser verrieb und den so erhaltenen Brei mit chloroformhaltigem Glyzerin extrahierte; die durch Papier filtrierte, neutral reagierende Flüssigkeit stellte die Giftlösung vor. Das Gift ist nach Pohl ein exquisites Herzgift, das durch Lähmung des Herzmuskels und infolge der damit zusammenhängenden Zirkulations-

störungen erst sekundär Erstickungskrämpfe bewirkt; auch die für das Gift charakteristischen Lähmungen der injizierten Extremität sind auf dieselbe Ursache zurückzuführen. Zwei oder drei Tropfen des Giftes bewirken bei intravenöser Injektion des Kaninchens den Tod in 4—8 Minuten; das Blut zeigt Gerinnungshemmung. Das Gift ist insofern hitzebeständig, als es erst bei 100° C in einer halben Stunde vernichtet wird; die hämolytische Wirkung wird durch 20 Minuten langes Erhitzen auf 100° nicht zerstört.

Das in Japan wegen seiner deletären Wirkung eine so große Rolle spielende Fugugift, das insbesondere in den Eierstöcken verschiedener Tetrodonarten vorkommt, scheint bisher als Antigen nicht erprobt worden zu sein.

E. Darstellung von Antigenen aus dem Giftsekrete der Spinnen und Skorpione.

Die Darstellung der Antigene aus Spinnen haben Kobert und Sachs versucht und insbesondere der letztere hat eine Reihe für die Immunitätslehre interessanter Tatsachen bei dem Studium des hämolytischen Antigens der Spinnen, des sogen. Arachnolysins gefunden. Kobert arbeitete vorzüglich mit Latrodectesarten (Latrodectes Erebus, Karakurte), zum Teil auch mit Kreuzspinnen (Epeira diadema), während Sachs ausschließlich mit Kreuzspinnengift experimentierte. Kobert hat auch die russische Tarantel teils lebend, teils getrocknet zerrieben und einen wässerigen Auszug daraus dargestellt, konnte jedoch nur Enzyme und keine für Säugetiere gefährlichen Gifte zum Unterschiede von den aus den Karakurten und Kreuzspinnen dargestellten Giften feststellen.

Bei der Darstellung der Latrodectes- und Kreuzspinnengifte verfuhr Kobert derart, daß er Wasser und Kochsalzauszüge aus den ganzen Spinnen herstellte; es war jedoch für die Giftwirkung gleichgiltig, ob zu der Extraktion die ganzen Spinnen oder nur ihre Vorderteile oder nur ihre Hinterteile verwendet worden waren, so daß sich daraus ergibt, daß nicht etwa nur die Giftdrüse wirksame Extrakte liefert; ja, selbst die dünnen, zwirnfadenartigen Beine enthalten das Gift, ebenso die neugeborenen Spinnen und die unbefruchteten Eier. Sachs verfuhr bei der Bereitung seines Arachnolysins derart, daß er eine Kreuzspinne (Gewicht 1,4 g) in 5 ccm 10 % Kochsalz enthaltendem Toluolwasser zerrieb, die erhaltene Flüssigkeit 24 Stunden im Eisschrank stehen ließ und hierauf mit Wasser auf 25 ccm brachte. Nach Filtration resp. Zentrifugieren wird die trübe, bräunlichgelbe Lösung zu hämolytischen Versuchen benützt.

Was die chemische Natur des von Kobert dargestellten Giftes anbelangt, so soll das wirksame Prinzip weder ein Alkaloid, Glykosid, noch eine Säure, sondern ein Toxalbumin sein; sowohl das Sekret der Giftdrüsen, als auch die Extrakte zeigen die gewöhnlichen Eiweißreaktionen. Das Gift dialysiert nicht, wird bereits beim Eintrocknen und beim Erhitzen unwirksam; von Alkohol wird es gefällt.

Die Auszüge erweisen sich nach Kobert für Hunde, Katzen, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten, Schafe, Ziegen und Vögel als ungemein giftig und töten bei subkutaner oder intravenöser Injektion unter Lähmungserscheinungen von Seiten des Herzens und des Zentralnervensystems; per os dargereicht ist das Gift wirkungslos. Nach Kobert scheint das Karakurtengift mancherlei Ähnlichkeit mit den Wirkungen

des Rizins und Abrins zu zeigen. Die bei intravenöser Injektion an Katzen wirksame tödliche Dosis beträgt 0.20—0,35 mg der organischen Trockenrückstände der wässerigen Auszüge pro kg Körpergewicht; auch Hunde, Kaninchen, Ratten und Vögel sind empfindlich, wenn auch weniger als Katzen; dagegen ist der Igel resistent und auch Frösche werden erst durch die 50fache Menge der für Warmblütler pro kg letalen Dosis getötet; das isolierte Froschherz wird jedoch bereits in einer Verdünnung von 1:100,000 von dem Gifte gelähmt.

In vitro wirkt das Karakurtengift auf das Blut hämolytisch und steigert die Gerinnung des Butes; die gerinnungsbeschleunigende Wirkung kommt noch bei einer Verdünnung des Giftes von 1:60,000 zustande und es ist möglich, daß die manchmal beobachteten intravaskulären Gerinnungen auf diese Wirkung des Giftes zurückzuführen sind.

Das von Sachs untersuchte Arachnolysin der Kreuzspinne wird durch Hitze ebenfalls leicht zerstört; 40 Minuten langes Erhitzen auf 56° läßt das Gift ganz unbeeinflußt, auch bei 60° tritt nur eine geringfügige Abnahme ein und erst bei 40 Minuten dauerndem Erwärmen auf 70—72° wird es völlig zerstört. Mit Glyzerin läßt sich das Arachnolysin monatelang, ja jahrelang gut konservieren. Die hämolytische Wirkung tritt nur bei bestimmten Blutarten auf und zwar nimmt die Empfindlichkeit der Reihe nach ab bei den nachfolgenden Tierarten: Kaninchen, Ratte, Maus, Mensch, Ochs, Gans; das Blut vom Pferd, Hund, Hammel und Meerschweinchen ist völlig resistent, wie auch das Blut eben ausgeschlüpfter Hühnchen zum Unterschiede von den äußerst empfindlichen Blutkörperchen des erwachsenen Huhnes. Bereits am 4.—6. Lebenstage werden die Hühnerblutkörperchen für das Arachnolysin angreifbar und die volle Empfindlichkeit kann schon nach 14 Tagen erreicht sein. Von den äußerst empfindlichen Kaninchenblutkörperchen vermögen 0,000028 g des Kreuzspinnengiftes 0,05 ccm Blut komplett zu lösen, so daß eine Kreuzspinne von dem Gewichte von 1,4 g genügend Gift besitzt, um 2,5 l Kaninchenblut völlig zu zerstören. Meerschweinchen konnten, wiewohl Meerschweinchenblut gegenüber dem Arachnolysin unempfindlich ist, mit dem Gift immunisiert werden und lieferten ein hochwertiges antihämolytisches Serum.

Neben dem Spinnengift kann auch das Skorpionengift auf Grund der Versuche von Calmette und Kyes mit großer Wahrscheinlichkeit zu den Antigenen gerechnet werden, wenn auch eine durch Skorpionen erzeugte Immunität experimentell nicht festgestellt ist. Calmette hatte jedoch beobachtet, daß das Skorpionengift einerseits mit Kobraantivenin neutralisiert werden kann, und andererseits Meerschweinchen, welche mit Viperngift immunisiert worden waren, auch gegen Skorpionengift immun sind; sowohl aus diesem Verhalten, wie auch aus der dem Schlangengifte sehr ähnlichen neurotoxischen Wirkung scheint hervorzugehen, daß das Skorpionengift dem Gifte der Kolubriden nahe verwandt ist. Dazu kommt noch, daß es Kyes gelungen ist, bei der durch das Skorpionengift bedingten Hämolyse, ähnlich wie bei dem Schlangengifte, auch das Lecithin als Aktivator festzustellen.

Da die paarige Giftdrüse der Skorpione in dem letzen Segmente des Abdomens liegt, so genügt bei der Darstellung des Giftes die Verarbeitung des letzten Hinterleibsringes. Calmette, welcher zu dessen Darstellung sich des ägyptischen Skorpio afer bediente, verfuhr derart, daß er das letzte Kaudalsegment abschnitt, unter Zusatz von Wasser zerrieb, filtrierte und im Vakuum trocknete. Auf diese Weise erhielt

er aus 28 Skorpionen 46 mg des getrockneten Extraktes. Dieser, in 20%ige wässerige Glyzerinlösung aufgenommen, tötete in einer Menge von 0,05 mg ungefähr in zwei Stunden eine weiße Maus und in einer Menge von 0,5 mg in weniger als 24 Stunden ein Meerschweinchen von 500 g Gewicht.

Phisalix und Varigny erhielten das Gift derart, daß sie die auf elektrische Reizung mit dem Induktionsapparate in Tropfenform am Stachel austretende visköse Flüssigkeit auf einem Uhrglase sammelten, und das Sekret im Vakuumexsikator trocknen ließen. Nach 14 Tagen kann das Gift neuerdings entleert werden. Von dem Trockenrückstand tötete 0,1 mg ein Meerschweinchen. Für einen Hund von 15—20 kg beträgt die tödliche Dosis bei intravenöser Applikation 1—1,5 mg.

Nach Calmette enthalten die Giftdrüsen von Skorpio occitanus (Südfrankreich) etwa 0,01—0,1 g Giftflüssigkeit. Dieselbe reagiert sauer und ist in Wasser löslich. Das Skorpionengift wird, wie die Schlangengifte von Calciumhypochlorid (vier Tropfen einer Lösung von 1:60 auf 0,5 mg Gift), Goldchlorid und Jodkalium zerstört, von denen nach Calmette insbesondere die Verwendung des ersteren zu therapeutischen Zwecken zu empfehlen ist. Per os ist das Gift unwirksam.

Bezüglich der hämolytischen Wirkung des Giftes wäre zu bemerken, daß nach Sanarelli die Blutkörperchen des Menschen, Hundes, Kaninchens, Meerschweinchens und der Ratte resistent sind, während die der Vögel, Frösche, Salamander und Fische derart gelöst werden, daß nur der Kern übrig bleibt.

F. Darstellung von Antigenen aus Bienen und Wespen.

Über das Gift der Honigbiene liegen zunächst wichtige chemische und physiologische Untersuchungen von J. Langer vor, der auch durch ausgedehnte statistische Erhebungen die den Imkern von altersher bekannte Tatsache einer Gewöhnung an Bienengift sicher stellen konnte; außer diesen Arbeiten Langers, welche die Antigennatur des Bienengiftes bereits wahrscheinlich machen, berichtet auch Calmette, daß es leicht gelingt, Mäuse gegen Dosen des Giftes zu impfen, an welchen Kontrolltiere sicher zugrunde gehen, indem man ihnen wiederholt kleine Giftmengen injiziert. Phisalix untersuchte experimentell an den sehr empfänglichen Sperlingen das Bienengift und fand bei der chemischen Trennung, daß es drei verschieden wirksame Substanzen enthält, von denen die erste Entzündung erregend wirkt, die zweite Krämpfe und die dritte Lähmungen erzeugt. Hat sich schon aus den Untersuchungen Langers die große Ähnlichkeit des Bienengiftes mit den Schlangengiften und zwar, wegen der örtlich nekrotisierenden, hämolytischen und hämorrhagiparen Wirkung, insbesondere mit dem Gifte der Viperiden und Krotaliden ergeben, so haben in jüngster Zeit Morgenroth und Carpi durch die Möglichkeit der ganz auffallenden Steigerung der hämolytischen Wirkung des Giftes nach Lecithinzusatz und die gelungene Lecithidbildung eine weitere interessante Analogie mit dem Verhalten der Schlangengifte gefunden.

Die Gewinnung und Darstellung des Bienengiftes erfolgt nach Langer in der Weise, daß die Biene vorsichtig mit zwei Fingern gefaßt und am Abdomen mäßig gedrückt wird; die Biene schnellt sofort den Stachel hervor, an dessen Spitze das klare Gifttröpfchen sichtbar wird, welches durch schnelles Eintauchen des Stachels in Wasser leicht in Lösung ge-

bracht wird. Die auf diese Weise benützte Biene kann weiter leben und noch ein bis zweimal zu demselben Zwecke verwendet werden. Eine bessere Ausnützung des Materials bietet die Darstellung der wässerigen Giftlösung in der Art, daß man die dem Bienenkörper frisch mit einer Pinzette herausgerissenen Stachel samt Giftblasen in Wasser verreibt, und die so erhaltene, leicht getrübte Flüssigkeit ein oder mehrmals filtriert. Morgenroth und Carpi extrahieren den Bienenstachel samt Giftblase mit gleichen Teilen einer Kochsalz- und Glyzerinlösung; diese Flüssigkeit ist gut haltbar.

Was die chemischen Eigenschaften des nativen Akuleatengiftes anlangt, wie es durch Entleerung des Giftstachels in Wasser gewonnen wird, so stellt dasselbe eine klare farblose Flüssigkeit von saurer Reaktion, aromatischem Geruch und bitterlichem Geschmack dar, welche beim Kochen allein, sowie beim Kochen mit Salpetersäure, ferner mit Essigsäureferrocyankalium, Jodquecksilberkalium und Salzsäure, Phosphorwolframsäure und Salzsäure, Sublimat flockige Fällungen liefert und positive Millonsche und Biuretreaktion ergibt; die Trommersche und Nylandersche Reaktion sind negativ. Ähnlich reagieren auch die durch Verreiben der Stachel mit Wasser hergestellten Extrakte. Die angeführten giftigen Eiweißreaktionen scheinen indessen mit der eigentlichen Giftwirkung nicht zusammenzuhängen, da auch das nach dem Kochen und nach der Ausfällung der koagulierbaren Eiweißkörper erhaltene Filtrat vollständig wirksam bleibt.

Das Gift kann in zugeschmolzenen Glasröhrchen selbst durch zwei Stunden in kochendem Wasser ohne Schaden erhitzt werden und bleibt auch im trockenen Zustande wirksam, wenn es $^1/_2$ Stunde bis 10 Tage auf 100° erhitzt wird. Auch Gefrierenlassen verträgt das Gift. Verschlossen aufbewahrt, hält sich das Gift lange Zeit unverändert, dagegen zersetzt es sich leicht durch Fäulnis in offen stehenden Gefässen. $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure, sowie $^1/_{10}$ Normalnatronlauge lassen das Gift intakt. Dagegen wird es durch verschiedene oxydierende Agentien, wie Kaliumpermanganat oder Chlor oder Brom leicht zerstört, ferner durch Einwirkung von Pepsin, Pankreatin und Labferment. Die Prüfung auf Giftwirkung erfolgt bequem durch die an der Konjunktiva des Kaninchens auftretende akute Entzündung nach Einbringen des Giftes in den Konjunktivalsack.

Für die Reindarstellung arbeitete Langer nachfolgendes Verfahren aus: Mehrere Tausend (12000) Stachel mit Giftblase wurden in 96%-igem Alkohol gesammelt, der Alkohol abfiltriert und die Stachel bei 40° C getrocknet. Das getrocknete, fein zerriebene Material wird mit 5–10 ccm destillierten Wassers 24 Stunden lang digeriert und das klare Filtrat durch Eintropfenlassen in 96%igen Alkohol gefällt; die Extraktion mit Wasser wird sehr oft wiederholt, bis das Filtrat mit Alkohol keine Trübung mehr gibt. Die über dem Alkoholniederschlage stehende Flüssigkeit wird abgehoben, der Niederschlag selbst mit 96%igem, dann mit absolutem Alkohol und endlich mit Äther gewaschen. Die getrocknete Substanz stellt blättrige Lamellen dar. Die weitere Reinigung findet in der Weise statt, daß von einer wässerigen, ca. 2%igen Lösung 10 ccm bei 40° auf ca. 2 ccm eingeengt und sodann mit 4 Tropfen konzentrierten Ammoniaks versetzt werden, wodurch ein dicker, käsiger Niederschlag entsteht, welcher die typische Konjunktivalreaktion erzeugt, während das Biuretreaktion zeigende Filtrat unwirksam ist. Der gut abgepreßte Niederschlag wird in schwach essigsaurem Wasser gelöst, und die Lösung neuerlich mit Ammoniak gefällt und dieses Verfahren mehrmals wieder-

holt; die endlich erhaltene, gut wirksame Lösung gibt keine Biuret- und Xanthoproteinreaktion, keine Fällung mit Sublimat und Silbernitrat, ebenso keine MILLONsche und Schwefelblei-Reaktion. Dagegen erzeugen die Alkaloidfällungsmittel (Jodquecksilberkalium, Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid, Kaliumcadmiumjodid, Phosphorwolframsäure, Tannin und Pikrinsäure) Trübungen und Niederschläge. Nach FAUST ist das Bienengift in die Gruppe der diffusiblen, Nekrose erzeugenden, nicht flüchtigen Reizstoffe einzureihen, deren Hauptrepräsentant das Cantharidin ist.

Die hämolytische Wirkung äußert sich auf die verschiedensten Blutarten; bei Meerschweinchen und Ziegenblut kann sie durch Lecithinzusatz auf das 200—500fache gesteigert werden. Nach MORGENROTH und CARPI soll das hämolytische Prinzip (Prolecithid) weniger stabil sein als das Kobragift; das nach der Methode von KYES dargestellte Lecithid dagegen ist thermostabil; es wirkt auf Blutkörperchen nahezu momentan hämolytisch. Die hämolytische Wirkung wird durch normales Pferdeserum, vermutlich durch dessen Cholestearingehalt beträchtlich gehemmt.

PHISALIX stellte durch Mazeration von Wespen mit Glyzerin ein Antigen dar, welches Kaninchen nach subkutaner Injektion selbst gegen das Mehrfache der sonst tödlichen Menge des Viperngiftes schützt, so daß nach PHISALIX die Möglichkeit näherer Beziehungen zwischen Vipern- und Wespengift vorliegt; nach dem bei dem Bienengift Gesagten ist in der Tat eine nähere Verwandtschaft der beiden Gifte nicht unwahrscheinlich.

G. Darstellung von Antigenen aus Taenien und dem Blutegel.

Wiewohl es sich bei den hier zu nennenden Antigenen keineswegs um Sekretionsprodukte, sondern im wesentlichen um Organbestandteile handelt, möge hier im Anschluß an die aus anderen niederen Tierspezies dargestellten Antigene der in neuerer Zeit durch Verarbeiten der Tänienleiber erhaltenen Antigene kurz gedacht werden.

Die Methode, welche bei der Verarbeitung der Tänien in Betracht kam, war zumeist die Extraktion mit Kochsalzlösung nach vorhergehender Zerkleinerung derselben, eventuell unter Zuhilfenahme der tryptischen Verdauung. Dabei wurden die verschiedenen Tänienarten, wie Bothriocephalus latus, Taenia solium, Taenia mediocanellata, Taenia cucumerina und auch Taenia echinococcus resp. deren Blasen benützt. Den verschiedenen Autoren hat es sich hauptsächlich um die präzipitinogene Wirkung und daher um möglichst eiweißreiche Extrakte gehandelt. ISAAC und VON DEN VELDEN, welche zum erstenmal die durch Bothriocephalus latus bei Menschen und Versuchstieren erzeugte spezifische Präzipitinreaktion auftreten sahen, bereiteten die Extrakte, indem sie mehrere Gramm (25 g) frisch abgetriebener Proglottiden antiseptischer Autolyse aussetzten und mit dem so hergestellten Extrakte spezifische Präzipitinreaktion sowohl mit dem Blutserum einer Bandwurmwirtin, als auch mit dem Serum der damit vorbehandelten Kaninchen erhielten. FLECKSEDER und v. STEYSKAL haben mit Extrakten, welche sie unter möglichster Beobachtung der Asepsis durch feinste mechanische Zertrümmerung der Proglottiden und des Kopfes der Taenia mediocanellata erzeugten, bei intraperitonealer Injektion von Kaninchen und Katzen ähnliche Resultate erhalten und J. LANGER hat gelegentlich einer ausführlichen Bearbeitung der einschlägigen Phänomene, die frisch abgegangenen Proglottiden oder Parasiten zunächst mit wiederholt gewechseltem Wasser gereinigt, hierauf mit

einer kleinen Menge physiologischer Kochsalzlösung und Glasstaub verrieben, und das erhaltene Filtrat zentrifugiert; dasselbe konnte unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt werden. Langer konnte im Organismus von Menschen, welche Taenia mediocan. und Taenia sol. beherbergten, sowie beim Hunde mit Taenia cucumerina keine Antikörperbildung mittels der Präzipitinreaktion nachweisen; Versuchstiere, welche mit größeren Mengen von Extrakten vorbehandelt waren, lieferten dagegen hochwertige präzipitierende Tänienimmunsera, welche nicht allein mit Eiweißlösungen von homologen, sondern auch mit jenen von anderen, nahestehenden Parasiten reagierten.

Messineo und Calmida, welche aus den Leibesbestandteilen von Taenia solium, Taenia cucumerina und Taenia coenurus ein spezifisches Gift extrahiert haben wollen, welches Wirbeltierblut hämolysiert und im Organismus auf die Leukocyten positiv chemotaktisch wirkt, haben die Würmer mit Sand oder Glaspulver fein zerrieben, mit physiologischer Kochsalzlösung extrahiert und entweder durch Berkefeldfiltration oder durch Salzfällung gereinigt. Auch Schaumann und Tallquist beobachteten bei Bothriocephalusextrakten eine hämolytische Wirkung auf Hundeblut. Über die bakterizide Wirkung von Tänienextrakten berichten Picou und Ramond, ferner Jammes und Mandoul, welche letzteren in dem durch Zerreiben gewonnenen, sterilisierten Safte von Tänien, jedoch nicht von Askariden bakterientötende Substanzen nachweisen konnten. Nach Blanchard haben die Mazerationsextrakte verschiedener Würmer (Filarien, Askariden, Cestoden usw.) eine toxische Wirkung, doch erlaubt diese Tatsache nicht, eine analoge Wirkung der lebenden Würmer im Organismus anzunehmen. Nur für den Bothriocephalus latus ist die Sekretion eines hämolytischen Giftes unter normalen Bedingungen oder unter besonderen Einflüßen wahrscheinlich.

Die Darstellung der gerinnungshemmenden Substanz des Blutegels wurde bereits früher besprochen. Hier wäre der Versuche von Wendelstadt zu gedenken, welcher Blutegelextrakt mit Erfolg als Antigen verwendet hat und durch Immunisierung ein Serum erhielt, das bis zu einem gewissen Grade die gerinnungshemmende Wirkung des Extraktes aufheben konnte. Wendelstadt bereitete die Extrakte in der Weise, daß er die Köpfe der Blutegel, welche in den Saugnäpfen um die Mundöffnung und den Schlund die wirksame Substanz enthalten, mit sterilisiertem Glasstaub zu einem Brei zerrieb und mit 0,85 $^0/_0$iger Kochsalzlösung extrahierte, so daß etwa 15 Köpfe auf 20 ccm Flüssigkeit kommen; nach der Filtration wurde die trübe Flüssigkeit auf ihre gerinnungshemmende Wirkung mit frischem Kaninchenblut geprüft und hierauf zu den Versuchen verwendet. Es ist nach Wendelstadt zweckmäßig, vor dem Abtrennen des Kopfes die Blutegel mit 4 $^0/_0$igem Formalin abzuwaschen. Für die Immunisierung eignen sich Kaninchen, die subkutan und intravenös injiziert wurden, dagegen sind Ziegen ungeeignet.

H. Darstellung von Antigenen aus Giften der Echinodermen.

v. Dungern hatte versucht mit Hilfe von spezifischen Antikörpern die Befruchtungs- und Entwickelungsvorgänge bei diesen niedrigen Tieren zu beeinflussen und hatte zu diesem Zwecke einerseits die insbesondere in den Eiern konzentrierte, auf fremdartige Zellen (Spermatozoen) giftig wirkende Substanz der Seesterne benützt, andererseits das Gift der Seeigel, welches von den Drüsenschläuchen der gemmiformen Pedicellarien

sezerniert und, wie auch das Seesterngift, als Angriffs- und Schutzmittel dieser Tiere verwendet wird.

Die Darstellung des Seesterngiftes aus den Eiern von Asterias glacialis oder Astropecten aurantiacus erfolgt nach v. Dungern in einfachster Weise so, daß die Eier in der Reibschale fein zerrieben werden, die schaumige Masse mit Seewasser versetzt und dann absetzen gelassen wird. Diese Flüssigkeit enthält schon das Gift in starker Konzentration, welches bereits in kurzer Zeit fremdartige Spermatozoen abzutöten vermag. Die Seesterngifte sind durch eine große Widerstandsfähigkeit dem Erhitzen gegenüber ausgezeichnet und vertragen sogar kurzes Erhitzen über der Flamme, so daß man die Gifte, freilich in schwächerer Konzentration durch einfaches Abkochen der Seesterneier erhalten kann. Das Gift ist auch in dem Hautschleim von Asterias glac., der auf alle möglichen Reize hin sezerniert wird, enthalten und man kann diesen Schleim in großen Mengen erhalten, wenn man das Tier mit Süßwasser begießt und dann mit dem Rücken nach unten auf den Rand eines Glases legt. Das Gift vermag die roten Blutkörperchen des Kaninchens aufzulösen, ist, wie v. Dungern und O. Cohnheim fanden, in 90%igem Alkohol löslich und durch Äther aus demselben fällbar. Kaninchenserum enthält gegen das Asteriasgift ein Antitoxin, dessen Wirkung jedoch durch Immunisierung mit Asteriaseiern nicht gesteigert werden konnte.

Das Gift der Seeigel, welches eine klare, leicht bewegliche, schwach sauer reagierende und nach der Entleerung aus der Drüse leicht gerinnende Flüssigkeit ist, läßt sich aus den gemmiformen Pedicellarien von Sphärechinus granularis durch Verreiben derselben mit Seewasser gewinnen; werden 100 gemmiforme Pedicellarien mit 1 ccm Seewasser verrieben, so ist diese Flüssigkeit imstande, in $^1/_4$ Stunde 10—20 Liter einer Spermatozoenaufschwemmung von Asterias glacialis abzutöten. Das Seeigelgift findet sich im Gegensatze zu dem Seesterngifte ausschließlich nur in den Giftdrüsen der gemmiformen Pedicellarien vor und ist kein integrierender Bestandteil des gesamten Seeigelprotoplasmas. Nach Henri und Kaylof enthalten sämtliche Arten von Seeigelpedicellarien lähmende hitzebeständige Toxine, gegen welche Holothyrien, Seesterne und Frösche immun sind; bei Kaninchen ist eine aktive Immunisierung möglich, das Serum der Immuntiere schützt jedoch nicht andere Tiere, wohl aber schützt Froschserum Krabben gegen das Gift.

Die zerriebenen Eier von Asterias glac., Echinus und Sphärechinus liefern, wie auch die Spermatozoen, Immunsera, welche auf die Eier und Spermatozoen agglutinierend wirken, wobei sich im speziellen das Ei-Immunserum und das Spermatozoen-Immunserum in den Wirkungen voneinander nicht wesentlich unterscheiden.

I. Darstellung von Antigenen aus Infusorien- und Trypanosomenleibern.

Die aus den einzelligen Organismen dargestellten Antigene bilden bereits einen Übergang einerseits zu den aus Bakterienzellen dargestellten Antigenen, andererseits zu den aus einzelnen Zellen höherer Organismen gewonnenen immunisierenden Substanzen. Die Schwierigkeiten, welche bei der Verarbeitung der Infusorien, wie auch Trypanosomen zu überwinden sind, liegen hauptsächlich in der Darstellung eines einheitlichen, von fremden Substanzen, wie auch von Parasiten, welche ja den Infusorien vielfach als Nahrung dienen, befreiten und gereinigten Materials

oder, wie man sich auch ausdrückt, in der Gewinnung einer Reinzucht. Es handelt sich bei den aus den Leibern dargestellten Antigenen zumeist um Präzipitinogene respektive Agglutinogene, wohl auch um Substanzen, welche im Sinne der Cytolyse wirken. Rössle, welcher aus den Infusorien Antigene dargestellt hat, hat sowohl mit Glaukomaarten (Glaukoma scintillans) als auch mit Paramäcien gearbeitet.

Die Reinzucht von Glaukoma scintillans Ehrenb. gelingt auf Grund der Tatsache, daß dieses Glaukom viel höhere Grade der Fäulnis verträgt, als andere Protozoen, so daß in einem Aufguß, in dem es von allen möglichen Protisten wimmelt, das Glaukom rasch alle anderen Protozoen überwuchert, wenn man durch Zusatz von Bouillon die Vermehrung der Fäulnisbakterien steigert. Aus solchem Material kann man die Reinzucht derart bewirken, daß man mit einer sterilen Pipette aus der mit Wasser stark verdünnten Kultur ein einzelnes Tier herausbringt und in einen sterilen Erlenmayerkolben einbringt, der mit stark verdünnter Bouillon (1 ccm Bouillon auf 50 ccm Leitungswasser) gefüllt ist. Diese Zucht wird dann abermals stark verdünnt und mit einem daraus entnommenen Glaukoma neuerdings ein Erlenmayerkolben geimpft; auf diese Weise kann eine Reinzucht von Glaukoma mit einem einheitlichen Futter, nämlich einer einheitlichen Bakterienart, erhalten werden. Der Höhepunkt der Glaukomvermehrung tritt am 4. bis 5. Tage ein, am 6. bis 7. Tage geht die Zahl wieder zurück, wenn man nicht frische verdünnte Bouillon wieder zusetzt. Zu Immunisierungszwecken ist es am besten, etwa am 5. Tage die Zucht abzugießen, den Abguß kurz (ca. 10 Sekunden lang) zu zentrifugieren; der erhaltene Niederschlag, welcher die ausgeschleuderten Infusorien und verhältnismäßig wenig Bakterien enthält, kann zur Injektion verwendet werden.

Die Reinigung der Paramäcien von anderen Protozoen kann wieder auf einem anderen Prinzip durchgeführt werden. Während nämlich die Infusorienarten Glaukoma, Stentor, Colpidium, Stylonychia u. a. bei Erwärmung der Infusion auf 37° zugrunde gehen, überleben die Paramäcien allein diese Prozedur, so daß die Reinkultur von Paramäcien leicht in folgender Weise durchgeführt werden kann: Ein sterilisiertes hohes Becherglas wird mit Leitungswasser gefüllt und mit einer Glasschale bedeckt mehrere Tage stehen gelassen, da frisches Leitungswasser die Paramäcien schädigt; hierauf werden Salatblätter, welche kurz in heißes Wasser eingetaucht worden waren, eingetragen und die Flüssigkeit wird mit möglichst sorgfältig isolierten Paramäcien geimpft. Nach wenigen Tagen erhält man eine üppige Kultur, welche von den anderen Protisten gereinigt wird, indem man die Kultur auf 24 Stunden in den Brutschrank bei 37° einstellt, wodurch die Paramäcien rascher zur Teilung und zur üppigen Vermehrung gelangen. Die Paramäcien werden durch Zentrifugieren isoliert; doch ist dabei wichtig, darauf zu achten, daß die Paramäcien nicht durch zu langes Zentrifugieren abgetötet werden; es genügt eine Dauer von 10 Sekunden, um die schweren Paramäcien auszuschleudern, so daß in einer halben Stunde, wenn man 10 ccm fassende Röhrchen benützt, Paramäcien aus einem Liter Zuchtflüssigkeit erhalten werden können. Will man die Schädigung der Paramäcien sicher vermeiden, so verfährt man besser nach Barratt, Hausmann und Kolmer, indem man die negative Geotaxis der Paramäcien benützt; die Paramäcienaufschwemmung in reinem Brunnenwasser wird dabei durch Aufsteigenlassen der Paramäcien in einer langen Glasröhre gewonnen.

Zur Herstellung eines für die Vorbehandlung geeigneten Präparates benützt man nach RÖSSLE die von LÖFFLER für Bakterienpräparate eingeführte Methode: Möglichst dichte Reinzuchten werden abzentrifugiert, der erhaltene Paramäcienbrei in sterilen Petrischalen ausgestrichen und dann im Vakuum oder über Schwefelsäure sorgfältig getrocknet. Die durch Trocknung entstandenen fettglänzenden, graugelben Schüppchen oder pulverförmigen Massen werden nun im Trockenschrank eine halbe Stunde lang erhitzt und nach dem Abkühlen mit Kochsalzlösung emulgiert und können so für intraperitoneale Injektion verwendet werden.

Über die Darstellung von Präparaten aus Trypanosomen wäre zu bemerken, daß bereits KANTHACK, DURHAM und BLANDFORD darauf aufmerksam machten, daß bei Zentrifugieren trypanosomenhaltigen Blutes die Trypanosomen sich in den oberen Partien des Blutkörperchensedimentes absetzen und bei reichlicher Infektion sogar als weißliche Schicht sichtbar sind; auf diese Weise hatten auch LAVERAN und MESNIL, sowie M. MAYER die Trypanosomen fast ohne Beimengung von weißen und roten Blutkörperchen erhalten. Man muß zu diesem Zwecke nach MAYER das Blut entweder durch Defibrinieren oder durch Zusatz von Natrium citricum ungerinnbar machen und hierauf ein bis zwei Minuten zentrifugieren; unter mikroskopischer Kontrolle wird nur die obere Flüssigkeitsschichte abgehebert und darauf $^1/_4$ Stunde weiter zentrifugiert. In jedem Zentrifugierröhrchen setzen sich die Trypanosomen als feste Masse ab, die im mikroskopischen Bilde ein durch die Geißeln fest verfilztes Trypanosomenmaschenwerk bilden. In Kochsalzlösung erfolgt dann eine weitere Reinigung von letzten Serumresten. Durch Aufschwemmen der zuerst abgesetzten Blutkörperchen in Kochsalzlösung und Wiederholung der Prozedur können die noch darin verbliebenen Trypanosomen gewonnen werden.

Die Eiweißkörper der Trypanosomen können durch Extraktion vermittels Autolyse aus denselben gewonnen werden. Zu diesem Zwecke wird das Trypanosomensediment in wenig 0,87 $^0/_0$ iger Kochsalzlösung aufgeschwemmt und die Flüssigkeit in den Brutschrank bei 37 ^{0} gebracht; bereits nach wenigen Stunden tritt eine Auflösung der Leiber auf und nur die großen Kerne und die Geißeln bleiben erhalten; nach zweimal 24 Stunden sind auch diese bereits stark gequollen. Die so gewonnenen Extrakte können durch Pukallfilter filtriert werden. Die aus Trypanosoma Brucei hergestellten Extrakte sind besonders reichlich; sie sind jedoch weder tierpathogen, noch besitzen sie eine schützende Wirkung gegen eine spätere Infektion mit lebenden Trypanosomen und wirken präzipitinogen; die präzipitinogene Substanz bleibt für die Trypsinverdauung unangreifbar. Trypanosomen von Mal de Caderas lieferten keine präzipitinogenen Extrakte.

Von chemisch-physiologischem Interesse ist es, daß echte Toxine, wie Diphtherie und Tetanustoxin nach GENGOU, Abrin und Ricin nach BOKORNY, HAUSMANN und KOLMER Paramäcien nicht angreifen, während Saponin, gegen welches Bakterien immun sind, nach LANDSTEINER, RUSS und v. PROWAZEK die verschiedensten Protozoen, die Trypanosomen und nach LANDSTEINER und MUCHA auch die Spirochaeta pallida zu schädigen vermag. Hervorzuheben sind auch die neuen Befunde von HAUSMANN und KOLMER, welche zeigen, daß auch die einzelligen Organismen sich wie die höheren Tiere verhalten, indem bei Erhöhung der Temperatur Stoffe, wie das Colchicin und Tannin, in Konzentrationen hoch toxisch wirken, welche sich bei Zimmertemperatur als indifferent erweisen. Auf

die Einwirkung verschiedener Chemikalien und Farbstoffe wie sie in neuester Zeit sowohl auf Paramäcien, wie insbesondere auf Trypanosomen von zahlreichen Autoren, wie Busck, Dax, Wendelstadt, Laveran, Nicolle und Mesnil, Thomas, Brieger u. a. studiert worden waren, vor allem aber auf die weitausgreifenden chemotherapeutischen Trypanosomenarbeiten Ehrlichs und seiner Schule kann hier nur hingewiesen werden.

7. Darstellung von Antigenen aus Organen.

Die Darstellung antigenhaltiger Produkte aus Organen wurde zumeist in der Weise vorgenommen, daß die frischen zerkleinerten Organe verschiedenen Extraktionsmethoden unterzogen worden waren, oder als Preßsäfte zur Verwendung kamen. Die Anwendung von Fermenten, ebenso die Autolyse der Organe hat behufs Gewinnung von Antigenen seltener stattgefunden, während insbesondere die Autolyse für die Darstellung antitoxisch wirkender Körper, von Immunsubstanzen überhaupt und von anderen den Ablauf bestimmter Prozesse hemmenden Substanzen wiederholt benützt worden war und in theoretischen Erörterungen über die intravitale Bildung von Immunsubstanzen eine Rolle gespielt hat (Conradi, Blum, Salkowski, Jacoby). Es ist von vornherein klar, daß wir bei den für die Darstellung der Antigene aus Organen angewandten Methoden niemals die Gewinnung einheitlicher oder auch nur im entferntesten gereinigter Produkte erzielen, sondern, daß es sich stets dabei um Gesamtwirkungen bestimmter kolloidaler Komplexe und Gemenge handelt, die vielleicht mehr auf Grund rein physikalischer Lösungsbedingungen, als auf Grund chemischer Verbindungen miteinander zusammenhängen. Wir haben daher auch hier nahezu immer eine ganze Reihe von Antigenen zu erwarten, die selbst dort auftreten, wo einzelne isolierte Zellen, wie Spermatozoen nach Landsteiner und Metschnikoff oder Flimmerepithelien aus der Trachea des Rindes nach v. Dungern oder Netzhautelemente, so Aufschwemmungen von Rindernetzhautstäbchen in Ringerscher Lösung oder Lösungen derselben (durch Einlegen der Retina in $^1/_2$—1 $^0/_0$iges glycocholsaures Natron hergestellt) nach Hess und Römer zur Antigenbildung herangezogen worden sind. Es kann natürlich auch die Möglichkeit nicht bestritten werden, daß selbst ein wirklich isoliertes Antigen an verschiedenen Stellen des so komplizierten „Rezeptorenapparates" angreift und bereits dadurch die mannigfachsten Wirkungen erzielt. Wir haben es daher bei den aus Organen gewonnenen Antigenen mit hämolytischen, cytotoxischen oder cytolytischen, präzipitinogenen und wie die Versuche v. Bergmanns und neuerdings U. Friedemanns beim Pankreas zeigen, auch mit toxischen Wirkungen nebeneinander zu tun; auch des aus dem Muskelplasma dargestellten Ermüdungstoxins Weichardts wäre hier zu gedenken. Dazu kommen die bei zahlreichen tierischen, wie pflanzlichen Organen in den Vordergrund tretenden fermentativen Funktionen bestimmter Substrate, welche als Antigenbildner ebenfalls auftreten, wenn auch zugestanden werden muß, daß die auf solche Weise zum Teile nach mühseligen Versuchen hergestellten Immunsera im Vergleiche zu den intensiven Fermentwirkungen nur recht geringe antifermentative Wirkungen aufweisen, so daß der Verdacht nicht unterdrückt werden kann, daß bei den immunisatorisch erzeugten antifermentativen Wirkungen der Organextrakte noch andere, bisher unbekannte Momente eine Rolle spielen, die möglicherweise mit der Antigenbildung nicht direkt zusammenhängen. Ebenfalls eine weitere Klärung und Bear-

beitung erfordern die bereits zu einer ansehnlichen Literatur angewachsenen cytolytischen Organantigene, zumal hier eine ganze Reihe einander widersprechender Angaben besteht. So viel scheint jedoch aus neueren ausführlichen Untersuchungen von A. SATA und CH. BOLTON über Organcytotoxine (Nephrotoxin, Hepatotoxin, Gastrotoxin) hervorzugehen, daß die cytotoxische Wirkung mit der hämolytischen in irgend einem Zusammenhang zu sein scheint und daß wenigstens für das Hepatotoxin und Nephrotoxin eine gewisse relative Spezifität der Wirkung besteht.

Für die Verarbeitung der Organe auf die den Organzellen allein angehörenden Antigene ist es natürlich vor allem wichtig, daß dieselben von Blut und Blutbestandteilen so gut als möglich gereinigt sind, da sonst bei der großen Empfindlichkeit der Immunreaktionen leicht ein als Organantigen angesprochenes Substrat dem Blute entstammen könnte. Die Reinigung geschieht, um möglichst exakt vorgenommen zu werden, gewöhnlich in der Weise, daß das betreffende Tier, dessen Organe verwendet werden sollen, nach völligem Ausbluten mit physiologischer oder 10%iger Kochsalzlösung von den großen Arterien aus so lange durchgespült wird, bis aus den betreffenden Venen keine gefärbte Spülflüssigkeit mehr ausströmt. Ist eine solche Durchspülung nicht möglich, so muß das gut zerkleinerte Organ entweder mit Salzlösung oder mit Wasser gründlich von Blut gereinigt werden.

Eine zweite Vorbedingung für das gute Gelingen einer nachträglichen Extraktion mit Salzen ist die sorgfältige Präparation des Organs und die Entfernung von Bindegewebe und Fett; nach stattgehabter Zerkleinerung des Organs, sei es durch Zerhacken, Zerreiben oder Auspressen, empfiehlt es sich zur völligen Entfernung der Fettstoffe, welche häufig den Übergang der wirksamen Eiweißkörper in das Lösungsmittel behindern, den erhaltenen, eventuell vorher bei niedriger Temperatur getrockneten Brei mit Ätheralkohol, oder Benzol, Petroläther oder Toluol zu extrahieren. Insbesondere empfiehlt sich die vorhergehende Fettextraktion dort, wo behufs Darstellung von Material zu Zwecken der biologischen Untersuchung Organteile einfach einer Kochsalzextraktion unterzogen werden.

Die Zerkleinerung der Organe kann auf sehr verschiedene Weise stattfinden; in der Regel wird der feineren Zerteilung eine Vorbehandlung in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine oder besser noch in anderen für derartige Zwecke konstruierten Apparaten, wie der Kosselschen Fleischhackmaschine oder einem von LATAPIE beschriebenen Zerkleinerungsapparat oder der von NEFÉDIÉFF konstruierten kleinen Organpresse vorausgehen.

Die Zerkleinerung in dem Kosselschen Apparate findet in ähnlicher Weise statt, wie das Schneiden mit dem Gefriermikrotom. Es können mit Hilfe des Kosselschen Apparates kleinere Tiere, wie z. B. Ratten leicht zerkleinert werden, wenn sie vorher hart gefroren wurden. Zu diesem Zwecke wird das getötete Tier in ein schwach konisches Kupferrohr gebracht (Fig. 12), welches mit einem der Fleischhackmaschine entnommenen mit einem Ring R versehenen Schieber A, einer viereckigen Metallplatte, an dem weiteren Ende durch Anpressen mittels eines Bügels an einen Kautschukring wasserdicht verschlossen wird. In das auf diese Weise hergestellte Gefäß wird Wasser gegossen und das Ganze in einen mit Werg lose verschlossenen Filzbecher gebracht, in den man Kohlensäure unter Druck einströmen läßt, wodurch das Wasser schnell gefriert, so daß das betreffende Organ oder Tier durch die Eisschicht an dem Schieber

und dem Ring festgehalten wird. Während 2—3 Stunden läßt man in Zwischenräumen von 20 Minuten etwas Kohlensäure nachströmen. Nach dieser Zeit ist das zu verarbeitende Material fest gefroren und man kann die Kupferhülse aus dem Filzmantel herausziehen, löst die Hülse durch Erwärmen über der Flamme von dem Inhalt, zieht sie ab und setzt nun die Schieberpatte mit dem daran geforenen Organ in den Apparat ein. Der Apparat (Fig. 12 und 13) besteht aus einer vertikal stehenden Welle W, die einen Rotgußkörper trägt, auf welchem die

Fig. 12. Kossels Apparat zur Zerkleinerung tierischer Organe. (Ansicht von oben.)

Messer M_1, M_2, M_3, M_4, in gleichen Abständen befestigt sind; außerdem trägt die Welle eine Schnurscheibe SS. Durch einen Schlitten S, welcher durch die Schraube B mittels einer Handkurbel bewegt wird, wird nun der an die Platte A angefrorene Gegenstand G den Messern zugeführt, die von einem Mantel umgeben sind, in welchen die zerkleinerte Masse hineingeschleudert wird. Zu bemerken bleibt, daß bei

Fig. 13. Kossels Apparat zur Zerkleinerung tierischer Organe. (Seitenansicht.)

Zerkleinerung von Tieren besonders harte Gegenstände, wie Nagezähne vorher wegen Beschädigung der Messer zu entfernen sind. Die Messer können durch eine besondere vom Universitätsmechaniker Rinck in Marburg konstruierte Schleifvorrichtung geschliffen werden. Mit Hilfe dieses Apparates gelingt ein quantitatives Arbeiten, bei welchem auch die Zerkleinerung viel vollkommener ist, als bei der Fleischhackmaschine; während hier die Organe zerrissen werden, werden sie mit Hilfe des Kosselschen Apparates in kleine Stücke zerschnitten. Es gelingt auf diese Weise eine Ratte in etwa sechs Minuten zu zerkleinern, wobei die

Messerachse etwa 1500 Umdrehungen = 6000 Schnitte in der Minute macht.

Der von Latapie konstruierte kleinere Apparat soll insbesondere ein steriles Arbeiten mit den frischen Organen ermöglichen und sogar die Herstellung einer feinen homogenen Paste bewirken, welche sofort zur Injektion an Versuchstieren geeignet ist. Der Latapiesche Apparat (Fig. 14 und 15) besteht aus einem System von drei runden Stahlmessern, welche zum Teil mit feinen Riefen, zum Teil mit feinsten Öffnungen versehen sind und von denen zwei (*A*, *C*) fix mit einer drehbaren Achse *K* verbunden sind, während das dritte, *B*, welches die feinen Öffnungen trägt, in der Mitte zwischen *A* und *C* durch den Zylinder *J* und den Mantel *M*, in welchen die Stahlaxe *K* eingepaßt ist, fixiert ist. Die drei Rundmesser werden durch eine Messingplatte *N*, die ebenfalls an der Axe befestigt ist, abgeschlossen. Die zu zerkleinernde Masse wird in den Apparat durch die Öffnung *T*, welche auch mit einem Deckel *U* verschlossen werden kann, eingeführt und durch den Stempel *P*,

Fig. 14. Durchschnitt durch Latapies Apparat.

Fig. 15. Latapies Apparat zur Zerkleinerung tierischer Organe.

welcher mittels einer durch eine Handhabe *D* beweglichen in der Schraubenmutter *L* laufenden Schraube *S* langsam im Zylinder *J* vorwärts getrieben wird, den Messern zugeführt. Die erhaltene zerkleinerte Masse fließt bei *O* ab und kann in dem Gefäß *G* gesammelt werden. Dabei ist es zweckmäßig die zerkleinerte Masse mit physiologischer Kochsalzlösung aufzuschwemmen, was dadurch leicht bewerkstelligt werden kann, daß mittels des Gebläses aus dem Gefäße *R* in die zwischen *M* und *N* gelegene Kammer, die einen Schlauchansatz trägt, sterile Kochsalzlösung von Zeit zu Zeit eingeführt werden kann. Der Zylinder, der bequem aus-

geräumt werden kann, ist auf einem Stativ angeschraubt und kann entweder mit der Flamme oder im Autoklaven oder im Wasserdampf sterilisiert werden; um die Messer vor Rost zu hüten, soll die Sterilisation im Dampfe unmittelbar vor dem Gebrauche vorgenommen werden. Der Apparat wird derart gehandhabt, daß nach Einführung der Organstücke bei *T* die Kurbel *D* mit der Linken gedreht wird bis das Organ an die Messer herangeschoben ist, dann läßt man Kochsalz einfließen und nun wird mit der Rechten die Kurbel *E* langsam in Bewegung gesetzt. Der Stempel *P* soll sehr langsam bewegt werden etwa so, daß während die Kurbel *D* eine Viertelumdrehung macht, die Handhabe *E* fünf bis sechs Umdrehungen zurücklegt.

Die von Nefédiéff in Metschnikoffs Laboratorium konstruierte Organpresse (Fig. 16) besteht aus drei ineinander passenden Zylindern, von denen zwei, *C* und *B*, hohl sind, während der dritte, *A*, welcher in einen Konus endigt, massiv ist. Der äußere Zylinder *C* dient zur Aufnahme der gepreßten bereits gebrauchsfähigen Organsalzemulsion; derselbe ist oben mit einer Scheibe *K*, die zum Luftdurchtritt mit Öffnungen *m* versehen ist, verschlossen und trägt den zweiten Hohlzylinder *B*, welcher unten einen von feinsten Öffnungen durchbohrten Trichter *J* besitzt, dessen Innenfläche die Form eines Reibeisens aufweist; in diesen Zylinder *B* werden die vorher mit einem Messer zerkleinerten Organe, aus welchen die Emulsion hergestellt werden soll, gebracht. Der in diesen Hohlzylinder genau eingepaßte zylindrische Stempel *A* wird mittels einer durch den Träger *D* fixierten Schraubenpresse *E* in den Hohlzylinder *B* eingepreßt. Alle drei Zylinder werden durch das Postament *L* fixiert. Der Apparat ist so groß, daß im äußeren Zylinder bis zur Spitze des Trichters *J* etwa 15 ccm Flüssigkeit Raum haben und kann, da er aus vernickeltem Kupfer hergestellt ist, gut im Autoklaven sterilisiert werden. Vor der Benützung wird der äußere Zylinder mit 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, der Apparat hierauf $^1/_2$ Stunde im Autoklaven bei $1^1/_2$ Athmosphären sterilisiert und nach dem Abkühlen der mittlere Zylinder mit Organstücken beschickt; mit Hilfe der Schraubenpresse werden nun die Organstücke durch das Trichtersieb *J* durchpassiert; die erhaltene Organemulsion ist völlig steril und zur Vorbehandlung der Tiere gebrauchsfertig.

Fig. 16. Organpresse nach Nefédiéff.

Die auf die eine oder andere Weise zerkleinerten Organe hat man verschiedentlich bereits zur Antigenbildung verwendet; es genügt dabei häufig, wie bei dem zuletzt beschriebenen Apparat, bereits das Herstellen einer Organemulsion, da in die Salzlösungen so viel von den wirksamen Eiweißkörpern übergeht, als zur Antigenbildung nötig ist. Indessen hat die Verwendung von gröberen Emulsionen dadurch eine besondere Schwierigkeit, weil die Resorption der subkutan eingeführten Stoffe eine höchst langsame und mangelhafte ist, wodurch die an der Injektionsstelle verbleibenden Massen leicht zur Abszeßbildung führen.

Bessere Resultate sind jedoch dann zu erzielen, wenn in den zerstückelten Organen durch Zerreiben mit Quarzsand, Glaspulver oder Kieselgur eine Zertrümmerung der Zellen wie bei dem Buchner-Hahnschen Verfahren oder mittels Durchpassierens durch Metallsiebe nach Nefédiéff herbeigeführt wird. Hat man es dabei mit sterilen Organen zu tun, so kann man das Zerreibungsmaterial wie z. B. den Sand, der vorher durch Waschen mit Salzsäure gereinigt werden kann, durch Ausglühen in Eisenschalen sterilisieren und in sterilen Mörsern die Organe fein zerreiben. Die erhaltene Masse kann nun verschieden weiter verarbeitet werden. Man kann, wie dies Tarassévitch und Korschun und Morgenroth für die Darstellung hämolytischer Antigene taten, den Organbrei mit dem fünf- bis zehnfachen seines Gewichtes mit physiologischer Kochsalzlösung aufschwemmen, mehrere Stunden in dem Schüttelapparate schütteln, so daß man eine mehr oder minder gleichmäßig getrübte Flüssigkeit erhält. Auf diese Weise hergestellte Organextrakte können frisch verwendet werden, lassen sich aber auch nach den beiden letzteren Autoren ohne Einbuße ihrer Eigenschaften bei —10° und —15° eingefroren gut konservieren. Bemerkenswert bleibt jedoch bei den auf diese Weise von Korschun und Morgenroth gewonnenen Hämolysinen, daß sie sich von den Hundehämolysinen dadurch unterscheiden, daß sie eine nur sehr beschränkte Spezifizität zeigen und die Blutkörperchen derselben Spezies, ja sogar desselben Individuums lösen, daß sie koktostabil und insofern alkohollöslich sind, als sie erst durch das 10fache Volumen 96%igen Alkohols gefällt werden, daß sie nicht komplex gebaut sind und vor allem nicht zur Antikörperbildung führen. Nach Tarassévitch sollen nur die makrophagen Organe, wie Milz, Peritoneum, Mesenterialdrüsen und die Verdauungsdrüsen ein Lösungsvermögen besitzen; benützt wurden dabei die Organe des Meerschweinchens, Kaninchens und Hundes.

Im Anschluß an die Untersuchungen von Korschun und Morgenroth sei erwähnt, daß Kullmann aus Karzinomgewebe durch Verreiben desselben mit Glassplittern und Glyzerinkochsalzlösung nach Filtration durch Tonkerzen, welche nach 24 Stunden der Extraktion nachfolgte, ein sehr energisch hämolytisch wirkendes Blutgift erhielt, das ebenfalls für homologe Blutkörperchen nicht spezifisch war, sich als wasser- und alkohollöslich und koktostabil erwies, keinen komplexen Bau zeigte und nicht identisch war mit den autolytischen Fermenten des Karzinoms und der normalen Organe. Es wäre wünschenswert, auch dieses hämolytische Gift einer genaueren Untersuchung zu unterziehen.

In jüngster Zeit konnte Friedemann zeigen, daß speziell die Bauchspeicheldrüse des Rindes neben einem lähmenden und hämorrhagischen, in seiner Wirkung dem Krotalusgifte sehr ähnlichen Gift, ein komplex gebautes Hämolysin enthält, welches wie die Hämolysine des Schlangen- und Bienengiftes durch Lecithinzusatz aktiviert werden kann und Lecithide bildet; es soll insbesondere im Pankreasfistelsaft enthalten sein; aber auch die mit Alkohol erschöpfte Drüsensubstanz des Pankreas enthält ein komplexes Hämolysin, welches durch Blutserum, sowie durch dessen Alkohol- und Ätherextrakte, nicht aber durch Lecithin zu komplettieren ist. Die Darstellung dieser Hämolysine erfolgte derart, daß die zu einem Brei zerkleinerten Organe durch ein Tuch gepreßt worden sind und der Saft zunächst mit dem mehrfachen Volumen 96%igen Alkohols gefällt und dann unter wiederholter Erneuerung des Alkohols mehrere Tage mit demselben digeriert worden ist; hierauf wurde die

Fällung mit Äther extrahiert und im Vakuum getrocknet. Das erhaltene Pulver wurde ein bis zwei Tage im Eisschrank mit Wasser extrahiert und dieser Extrakt nach nochmaliger Alkoholfällung zur Hämolyse verwendet; in der Regel gelangten 5 %ige Lösungen der Organpulver zur Benützung. In ähnlicher Weise wie Friedemann konnte auch Wohlgemuth im Pankreassaft des Menschen ein durch Lecithin in seiner Wirkung etwa um das 20 fache verstärkbares komplexes Hämolysin nachweisen.

Statt der Kochsalz- oder Wasserextrakte der zerkleinerten Organe wurden dort, wo es nicht auf neutrale Reaktion oder Isotonie der betreffenden Extrakte ankam, vielmehr ein recht reichlicher Eiweißgehalt erwünscht schien, auch Alkalien zur Extraktion verwendet. So schwemmte Forssner zur Erzielung von präzipitinogenen Substanzen den Organbrei in 0,5 ‰ iger Ammoniaklösung auf und die so erhaltene Organemulsion wurde als solche nach Filtrieren durch doppelte Gaze als Antigen verwendet. Zweckmäßiger als Extrakte erwiesen sich für die Herstellung organspezifischer Präzipitine, wie sie Forssner neben anderen hergestellt hatte, nach den Untersuchungen von Grund Preßsäfte, welche nach der Buchner-Hahnschen Methode (siehe pag. 382 u. ff.) gewonnen waren. Der Eiweißgehalt derartiger Organ-Preßsäfte schwankte für Nieren zwischen 4,5 % und 10 %, für Leber zwischen 5,5 und 11,5 % und betrug für den Preßsaft der Magenschleimhaut etwa 4 %. Ein Vorzug dieser Methode liegt auch darin, daß jede chemische Einwirkung auf das Material vermieden wird und die Preßsäfte ohne jede Filtration sowohl eingespritzt als auch nach Abzentrifugieren des Kieselgurs zu Reaktionen in vitro verwendet werden können. An Stelle der Buchnerschen Presse kann natürlich unter geeigneten Verhältnissen, insbesondere bei Verwendung kleiner Organmengen auch das Macfadyensche Verfahren, dessen ausführliche Beschreibung auf pag. 385 u. ff. wiedergegeben ist, zur Zerkleinerung der Organe dienen.

Ohne Herstellung von Preßsäften ermöglicht eine vor kurzem von Wiechowski beschriebene Extraktionsmethode die Verwendung von chemisch unveränderten Extrakten und Lösungen verschiedener Organe; dieselbe ist imstande, die Organproteine und Organfermente in dem Zustande darzustellen und zu konservieren, in welchem sie sich beim Tode des Tieres befinden. Die Methode Wiechowski beruht darauf, daß die auf eine der früher beschriebenen Arten zerkleinerten Organe rasch getrocknet und in trockenem Zustande in einer besonderen Mahlmühle mit Toluol gemahlen und dann in der Kälte nacheinander mit Toluol, Aceton oder Alkohol extrahiert werden. Auf diese Weise werden die Organe als feine, wägbare Pulver erhalten, die frei von Lipoiden und Extraktivstoffen sind, wobei die Eiweißkörper und Fermente der zertrümmerten Organzellen unverändert löslich und haltbar bleiben; die Salze werden nicht, die Farbstoffe der Organe dagegen nahezu vollständig entfernt.

Die einzelnen methodisch bemerkenswerten Phasen des Verfahrens sind folgende:

1. Das Trocknen der Organe. Um die zerkleinerten Organe möglichst von bindegewebigen Anteilen, Blutgefäßen und Ausführungsgängen zu befreien und eine gleichmäßige feine Verteilung des Organbreies zu erzielen, wird der grobe Organbrei durch Siebe aus Kupferdrahtnetz passiert und dabei nötigenfalls zunächst ein gröberes und dann erst ein feinmaschiges Sieb benützt. Dieser so erhaltene feine Zellbrei wird mit etwas Toluol versetzt in dünner Schicht auf Glasplatten gestrichen und

dieselben in einem mäßig warmen, gut ventilierten Raume eingestellt. Da nach POHLS Untersuchungen bestimmte Eiweißkörper im Organplasma bereits bei 37° koagulieren, empfiehlt es sich, die Trocknung unterhalb dieser Temperatur vorzunehmen. Es gelingt in günstigen Fällen bereits in vier Stunden die Organe auf diese Weise völlig zu trocknen und so die Organeiweißkörper samt ihren Fermenten unverändert zu erhalten.

2. Das Zermahlen der getrockneten Organe wird in einer Farbenreibmühle (Salbenreibmühle der Apotheker) vorgenommen (Fig. 17). Dieselbe besteht aus einer abnehmbaren Scheibe *A*, welche durch den Hebel *C* und die Achse *D* mittels der Flügelschraube *c* nach oben gegen den gleichfalls abnehmbaren, durch drei Flügelschrauben (*a*) auf einem Gestell *E* fixierten Konus *B* angedrückt wird. Die Berührungsflächen sind etwa 2 mm breite schräge Schliffe (*ss*), gegen die sowohl am Konus als an der Scheibe kleine Rinnen führen, welche am Konus und der Scheibe entgegengesetzt verlaufen. Die Scheibe *A* balanziert auf der durch Zahnradübertragung drehbaren Achse *D*, welche durch die Übertragung *g* und *h* die Scheibe in Rotation versetzt. Die drehbare Achse kann entweder mit einer Kurbel für Handbetrieb oder mittels eines mit einem Elektromotor betriebenen Schwungrades in Bewegung versetzt werden. Sowohl die Scheibe wie auch Zylinder müssen, um auch in wässerigen Flüssigkeiten mahlen zu können, durch Vernickelung vor Rost geschützt sein. Durch die Flügelschraube des Hebels (*c*) lassen sich die schleifenden Flächen von Scheibe und Zylinder einander so nähern, daß selbst sehr leicht bewegliche Flüssigkeiten, wie Äther, Toluol nicht heraussickern und erst beim Drehen der Scheibe in den kapillaren Schleifraum gezogen und dann, von einer auf dem Scheibenmantel schleifenden Feder *f* aufgenommen, in ein untergestelltes Gefäß abtropfen. Der Apparat, der manche übrigens verbesserungsfähige Übelstände noch aufweist, eignet sich nicht zum Mahlen sehr harten Materials von ungleicher Korngröße, während er für getrocknete tierische Organe, die nicht sehr hart sind, gut verwendbar ist.

Fig. 17. Farbenreibmühle.

In diesem Apparate werden nun die getrockneten Organe zusammen mit Toluol, eventuell mehrmals hintereinander zu einer feinen Suspension

vermahlen; der Zylinderinhalt läßt sich dabei durch Nachspülen mit Toluol unter Zuhilfenahme eines Borstenpinsels nahezu quantitativ gewinnen. Von den in Betracht kommenden Extraktionsmitteln Petroläther, Äther, Xylol, Benzol und Toluol hat sich das letztere als das weitaus beste erwiesen, doch können auch Benzol und Xylol verwendet werden, dagegen nicht Äther und Petroläther wegen ihrer Leichtflüssigkeit. Die auf die beschriebene Weise hergestellten Suspensionen enthalten keine intakten mit Methylenblau färbbaren Zellen und Zellkerne mehr. Vorbedingung für ein derartiges Resultat ist jedoch die ausschließliche Verwendung von getrocknetem Material, da frische Zellen durch den kapillaren Schleifraum leicht durchschlüpfen.

3. Die Extraktion der feinen Suspensionen kann wegen der Feinheit derselben weder in einem automatischen Extraktionsapparate, noch durch Waschen auf dem Filter vorgenommen werden, sondern ist am besten auf einer Nutsche durch Waschen mit Toluol durchzuführen. Noch zweckmäßiger ist es, den auf der Nutsche scharf abgesaugten Kuchen nochmals mit frischem Toluol zu vermahlen und diese Prozedur bis zur Erschöpfung fortzusetzen, wobei man das Toluol jedesmal einige Stunden bei 37—40° auf das Organpulver einwirken lassen soll.

Endlich wird der scharf abgesaugte Kuchen grob zerdrückt und das noch anhaftende Lösungsmittel bei 37° verdampft. Das resultierende feine Organpulver verhält sich ebenso, wie die Organe im frischen resp. getrockneten Zustande und behält seine spezifischen Eigenschaften nach monatelangem Aufbewahren in Glasbüchsen bei Zimmertemperatur. Mit Wasser erhält man zum Unterschiede von frischen Organemulsionen gut durch Papier filtrierbare Suspensionen, und aus den Filterrückständen lassen sich entweder durch Waschen oder besser durch Abnehmen und Verreiben mit Salzlösungen nahezu alle löslichen Eiweißkörper gewinnen; dieselben zeigen auch die Eigenschaften des Pohlschen Organplasmas, indem sie mit sehr verdünnter Essigsäure ausfallen, bei 37°, ja sogar nach längerer Zeit auch bei Zimmertemperatur koagulieren, weshalb die Filtration in der Kälte empfehlenswert ist.

Die mit Toluol extrahierten Organpulver enthalten häufig noch sehr reichlich alkohollösliche Stoffe, welche teilweise in Wasser, völlig jedoch in mit Toluol versetztem Aceton löslich sind. Diese alkohollöslichen Stoffe lassen sich aus dem trockenen Pulver in derselben Weise extrahieren, wie die toluollöslichen, ohne daß eine Schädigung der Eiweißkörper und Fermente eintritt, unter der Voraussetzung der absoluten Abwesenheit von Wasser. Da Alkohol bei offenem Arbeiten leicht Wasser aus der Luft anzieht und dann die Eiweißkörper denaturiert, ist die Extraktion mit Aceton, das weniger eiweißfällend wirkt, vorzuziehen und geschieht am besten so, daß das Pulver abermals in der Farbenmühle mit Toluol angerieben wird und man die erhaltene Emulsion in viel wasserfreien Alkohol oder in entwässertes Aceton eingießt, in verschlossenen Flaschen einige Zeit extrahieren läßt, dann abnutscht und mit Toluol nachspült.

Die auf diese Weise erhaltenen reinen Organpulver stellen nur noch mit Salzen vermengte Organproteine dar, welche mit wässerigen Flüssigkeiten in der Farbenmühle verrieben Emulsionen liefern, die nur sehr langsam einen Bodensatz absetzen und daher bequem mit Pipette oder Meßzylinder dosierbar sind; sie lassen sich auch durch Filtration, Zentrifuge oder Salzfällung gut fraktionieren. Die Methode dürfte sich nach Wiechowski auch für die Bearbeitung pflanzlicher Organe (Samen), wie auch Bakterien verwenden lassen.

Zu erwähnen bleibt noch eine von BIERRY eingeschlagene Darstellungsmethode von zytotoxischen Antigenen aus Organen, welche darin besteht, daß Nukleoalbumine der betreffenden Organe zur Antigenbildung benützt wurden. Dieselben wurden gewonnen durch 24stündige Extraktion des betreffenden Organs (Niere, Leber) mit Natriumkarbonat in Gegenwart von Chloroform und Toluol, Fällung des Extraktes mit Essigsäure und Waschen mit Wasser; die erhaltenen Produkte wurden durch wiederholtes Auflösen und Fällen gereinigt, in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert oder in schwacher Sodalösung gelöst, 5 Minuten gekocht und Kaninchen eingespritzt; das nach mehrwöchentlicher Vorbehandlung erhaltene Blut soll an Hunden nephrotoxische respektive hepatotoxische Wirkungen zeigen.

WEICHARDT gibt an, daß das aseptisch ausgepreßte Muskelplasma von Tieren, insbesondere Warmblütlern (Meerschweinchen, Kaninchen, Mäusen), die mit Kohlenoxyd betäubt worden waren oder deren Gesamtmuskulatur einer Faradisation im luftverdünnten Raume unterzogen worden war, die beste Ausbeute an Ermüdungstoxin liefert; es entsteht auf diese Weise toxinhaltiges Muskeleiweiß, das durch Dialyse von Salzen und Eiweißabbauprodukten (Harnstoff, Extraktivstoffen usw.) gereinigt und durch Zusatz von Salzsäure und nachträgliche Neutralisation mit Natronlauge von einem Teil der Eiweißkörper befreit werden soll. Das Endprodukt im Vakuum bei 25° getrocknet, liefert in Wasser leicht lösliche Schüppchen, die ein mäßig toxisches Gemisch von Ermüdungstoxin und Muskeleiweiß darstellen. Das Toxin soll wegen seiner großen Labilität am besten in flüssiger Luft aufbewahrt werden. 10 mg des Trockengiftes töten bei intravenöser Injektion Kaninchen unter Temperaturabfall und hochgradigen Ermüdungserscheinungen; Mäuse wurden bei intraperitonealer Injektion von 10 mg, Meerschweinchen bei subkutaner Injektion von 30 mg getötet; dieses Antigen liefert bei Vorbehandlung von Pferden spezifische Antitoxine.

Über die Darstellung respektive Wiedergewinnung verschiedener bakteriellen Gifte aus Organen liegen einige ältere Arbeiten aus der ersten Zeit der Immunitätsforschung vor; es ist überflüssig zu erwähnen, daß die Darstellung dieser Gifte auf Grund der späteren experimentellen Forschung EHRLICHS und auf Grund der modernen physikalisch-chemischen Anschauungen über die Bindung und Neutralisierung der Toxine durch Organbestandteile und Körpersäfte sehr viel von ihrem Wert eingebüßt hat. Es möge hier daher nur ganz kurz auf die dabei verwendeten Methoden, welche zumeist parallel mit der Darstellung der Toxalbumine aus den Bakterienkulturen gehen, hingewiesen werden. Es handelte sich meistens um die Darstellung des Diphtherie- und Tetanustoxins, des Typhus- und Choleragiftes und das Verfahren, welches dabei BRIEGER, WASSERMANN, PROSKAUER und andere einschlugen, war dem des von BRIEGER und FRÄNKEL für die Darstellung der Gifte ausgearbeiteten nachgebildet. Die Organe der an den betreffenden Erkrankungen verstorbenen Menschen und Tiere wurden mit einer Mischung von Glyzerin (40 g) und physiologischer Kochsalzlösung (60 ccm) durch Verreiben extrahiert, keimfrei filtriert und das Filtrat mit der 10fachen Menge 60—70%igen Alkohols, welchem einige Tropfen Essigsäure zugesetzt worden waren, gefällt; der nach 24 Stunden abfiltrierte Niederschlag wurde in Wasser gelöst, mit der doppelten Menge gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, die ausgefallenen Albumosen salzfrei dialysiert und abermals mit Alkohol gefällt, wobei die letztere Fällung nach vorangegangener Lösung öfters wiederholt wurde. Nach

dieser Methode hatten z. B. Wassermann und Proskauer aus einem durch Diphtherietoxin getöteten Kaninchen nur eine sehr geringe Menge (0,0015 bis 0,002 g) einer Substanz gewonnen, welche in ihren Reaktionen mit einer aus Diphtheriekulturen in gleicher Weise dargestellten giftigen Substanz übereinstimmte. Jedoch gelang es nicht, Tiere damit zu immunisieren. Aus den Organen von menschlichen Typhusleichen versuchten Brieger und Wassermann in analoger Weise Gifte darzustellen, welche die gewöhnlichen Eiweißreaktionen gaben und von denen 0,1 g in 1 ccm H_2O gelöst bei intraperitonealer Injektion Meerschweinchen in drei Tagen töteten; auch aus dem Serum und dem Milzextrakte konnten so giftige Stoffe gewonnen werden, welche in einer Menge von 0,03 g Mäuse und in einer solchen von 0,1 g Meerscheinchen nach 24—48 Stunden töteten. In ähnlicher Weise versuchte man aus Tetanusleichen oder aus dem Kadaver an Impftetanus eingegangener Tiere die spezifischen Toxalbumine zu erhalten (Kitasato, Immerwahr). Pasquini versuchte das Gift mit kohlensaurem Natron aus dem Nervensystem zu extrahieren und aus dem Extrakt mit Alkohol zu fällen. Die erhaltenen Resultate sind äußerst schwankend und die positiven wohl vielfach abhängig von der Anwesenheit der mitextrahierten toxischen Bakterien. Auch das von Hueppe beim Menschen gefundene Choleratoxopepton wird durch Alkohol ausgefällt, der Alkoholniederschlag gut getrocknet und in Kochsalz oder Nährbouillon gelöst. Die Wirkung des alle Peptonreaktionen gebenden Giftes auf Meerschweinchen bestand in der Hervorrufung von Krämpfen, Lähmungen, fibrillären Zuckungen und vor allem in einem bedeutenden Temperaturabfall bis auf 29°; nach dem Tode fanden sich zahlreiche Hämorrhagien in den Organen.

Von größerer praktischer Bedeutung ist die hierher gehörende Darstellung des sporenhaltigen Impfmaterials aus dem Fleische rauschbrand kranker Tiere, wie sie Arloing, Cornevin und Thomas durchführten, und welche Methode als das sogenannte „Lyoner“ Impfverfahren eine ausgedehnte Anwendung gefunden hat. Die Darstellung des Impfstoffs geschieht derart, daß rauschbrandige Muskelstücke ausgepreßt werden und der abfließende sporenhaltige Fleischsaft rasch auf Tellern bei 32—40° getrocknet wird, in welchem Zustande die Sporen jahrelang virulent bleiben. Der von den Tellern dann abgekratzte Saft wird, mit Wasser angefeuchtet, teilweise in einem Ölbade durch 6 Stunden auf 100—104° C (I. Vaccin), teilweise auf 85—90° erhitzt, wobei das Präparat wieder eintrocknet; es wird hierauf fein gemahlen und als Pulver aufbewahrt. Soll es zur Impfung an Rindern verwendet werden, muß das Pulver unter aseptischen Kautelen in einem Mörser mit Wasser zerrieben werden; die nach Filtration durch Leinwand erhaltene Flüssigkeit wird zur subkutanen Impfung verwendet.

D. Verwendung von fermenthaltigen Substraten als Antigene.

Seit den Untersuchungen von Hildebrandt, Briot und Morgenroth über das Auftreten von Immunerscheinungen im tierischen Organismus nach Einverleibung von Emulsin und Labferment und der dadurch hergestellten Analogie mit den bakteriellen Antigenen wurde eine große Reihe von fermenthaltigen pflanzlichen, wie tierischen Substraten zur Antigenbildung mit mehr oder minder günstigem Erfolge verwendet; neben der in Erscheinung tretenden Immunitätswirkung war es auch die Spezifizität der Fermentwirkung, welche eine gewisse Ähnlichkeit mit der

Toxinwirkung aufwies. Indeß muß, wie bereits erwähnt, betont werden, was übrigens auch zahlreiche auf diesem Gebiete arbeitende Experimentatoren wie MORGENROTH, SACHS, HAHN und LANDSTEINER erwähnen, daß die erzielten Immunwirkungen im allgemeinen bei weitem nicht mit den bei bakteriellen Antigenen zu erreichenden Resultaten sich vergleichen lassen und in günstigen Fällen nur eine Steigerung der bereits im nativen Serum des unvorbehandelten Tieres vorhandenen Hemmungswirkung darstellen. Man kennt bereits seit langer Zeit derartige thermolabile Antifermente des normalen Serums, wie das Antilab (RÖDEN und HAMMARSTEN), das Antitrypsin, Antipepsin (FERMI und PERNOSSI, HAHN) und andere, und daneben eine ganze Reihe anderer in den verschiedensten Organismen und Organsäften vorkommenden Hemmungsstoffe, welche zum größten Teile hitzebeständig sind, wie ein von KORSCHUN im normalen Serum gefundenes hitzebeständiges Antilab, die von LEO POLLAK in dem Pankreasextrakt erhaltene Antiglutinase, die von WEINLAND in der Wand des Magendarmkanals von Askariden und in verschiedenen Organen gefundenen Antitrypsine und auch das von OSWALD SCHWARZ durch Erhitzen von Pepsin erhaltene Antipepsin, welches nach Art der Toxinantitoxinverbindungen Pepsin abzusättigen vermag; auch an das bereits an anderer Stelle angeführte, im Pepsin und der Schweinemagenschleimhaut gefundene kochbeständige Antikrotin JACOBYS sei hier erinnert. Es muß jedoch dahin gestellt bleiben, ob diese die Fermentwirkung hemmenden Substanzen mit den immunisatorisch erzeugten Antifermenten in irgendwelcher Beziehung stehen.

Zu Immunisierungszwecken, also als Antigene, wurden ausnahmslos ungereinigte Fermentpräparate verwendet, wie sie zumeist im Handel vorrätig sind oder durch Extraktion aus Organen gewonnen werden können, so daß bei der Antigenwirkung natürlich nicht allein die Fermente, sondern auch die Wirkungen der verschiedenen anhaftenden Eiweißkörper in Frage kommen. Speziell die vielen Fermenten zugeschriebene toxische und nekrotisierende Wirkung, wie z. B. jene des Trypsins, Emulsins, Steapsins und anderer Fermente muß, selbst wenn sie auch beharrlich trotz mancher Reinigungsversuche den Fermentreaktionen anhaftet, viel mehr als eine von den Fermenten unabhängige Komponente des die Fermentwirkung enthaltenden Substrates, denn ein integrirender Bestandteil des Fermentes selbst angesehen werden, eine Anschauung die, wie mir scheint, mit vollem Rechte auch von JACOBY vertreten wird. Eine Stütze für diese Ansicht scheint mir in der recht verschiedenen toxischen Wirkung bei gleichbleibendem Fermentgehalt mancher Präparate zu liegen und auch darin, daß es manchmal durch gewisse Reinigungsmethoden gelingt, die toxische Wirkung zu entfernen oder bedeutend herabzumindern. So z. B. konnte HILDEBRANDT Kaninchen gegen die schwer toxische Wirkung seiner Emulsinpräparate nur derart immunisieren, daß er das Emulsin per rectum einführte, während BEITZKE und NEUBERG aus einem gut wirksamen käuflichen Kahlbaumschen Emulsinpräparat nach Extraktion mit Toluolwasser bei 38° durch 20 Stunden ein fermentativ äußerst kräftiges Filtrat erhielten, das bei subkutaner Injektion sehr gut und ohne Gewichtsverlust der Versuchstiere ertragen wurde. Die Verwendung von ungereinigten fermenthaltigen Substraten als Antigene im Zusammenhange mit der stets erzielten geringen Immunwirkung können meines Erachtens nicht ganz die Vorstellung verdrängen, daß die Antifermente ihr Entstehen möglicherweise nicht dem Ferment als solchem, sondern einer in geringen Mengen vorhandenen oder wenig wirksamen Substanz verdanken,

welche direkt oder indirekt in den „Rezeptorenapparat" der Zelle derart eingreift, daß unter anderem auch die Produktion der Antifermente statthat, ähnlich, wie durch eine Reihe ganz heterogener, mit den Blutkörperchen nicht zusammenhängender Substanzen spezifische Immunhämolysine erzeugt werden können.

Daß die richtige Wahl des Versuchstieres und Ausschaltung individueller Schwankungen von äußerster Wichtigkeit für den Erfolg ist, geht aus allen Untersuchungen hervor und daher besagen gerade bei der Fermentimmunität negative, an einer einzigen Tierspezies erhaltenen Resultate viel weniger als in jedem anderen Zweige der Immunlehre. Es wurden dementsprechend neben Ziegen, Kaninchen, Meerschweinchen mit Vorliebe auch Vögel, wie Gänse und Hühner als Versuchstiere benützt, um dem einzuverleibenden Ferment einen möglichst fremdartigen tierischen Organismus zu bieten. Denn für die geringen Erfolge bei der Fermentimmunisierung gegenüber der Toxinimmunisierung liegt nach Morgenroth eine Erklärungsmöglichkeit auch darin, daß es sich bei den Fermenten um normale Körperbestandteile handelt, bei deren Zuführung die bereits vor gebildeten Regulationsvorgänge in Aktion treten, während die Toxine körperfremd sind, eine Erklärung, die wohl nicht für alle Fälle zutrifft; Hahn sieht die Gründe der geringen Wirkung nach Enzymbehandlung in der mangelhaften Resorption der Enzyme, ferner in der Bindung und Zerstörung der Fermente durch zirkulierende Eiweißstoffe und Kohlehydrate, bevor sie mit den Zellen in Reaktion zu treten in der Lage sind. Dastre und Delezenne glauben, daß die als Antifermente bezeichneten Substanzen nur Antikinasen sind, welche die Aktivierung der Fermente durch entsprechende Kinasen verhindern.

Von den hier in Betracht kommenden tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Fermenten wurden tierisches und pflanzliches Lab (Briot und Morgenroth), Fibrinferment (Bordet und Gengou), Trypsin respektive Pankreasextrakt (Landsteiner, Achalme, Dean, P. Bergell und A. Schütze), Pepsin (H. Sachs), Lactase (A. Schütze) Diastase (Ascoli und Bonfanti und L. Preti), Steapsin (A. Schütze, Beitzke und Neuberg, Bertarelli), Emulsin (Hildebrandt und Beitzke und Neuberg) Papayotin (Achalme, v. Stenitzer) Tyrosinase (Gessard), Hefezymase (Jacobsohn und Hahn) Hefe-Endotryptase (Hahn), proteolytische Bakterienfermente (v. Dungern, Glässner und Rosculez), Urease (Moll, Hahn), Pyocyanin (Charrin, Gheorghiewsky) verwendet; der Effekt war ein schwankender, wenn auch nach der Angabe der meisten Autoren ein immerhin sichtbarer; doch hängt natürlich der erzielte Erfolg mit der Feinheit der angewandten Prüfungsmethode ab, weshalb auch darüber einiges angeführt werden soll. Von den verwendeten tierischen und pflanzlichen Präparaten waren die meisten käufliche Handelspräparate, welche direkt oder nach vorhergegangener Reinigung injiziert worden sind. Sofern deren Darstellung methodisches Interesse bietet, seien sie hier kurz angeführt.

a) Immunisierung mit Lab.

Als Antigen verwendete Morgenroth eine Lablösung, welche durch Extraktion von käuflichem Witteschen Labpulver mit Glyzerin und 10%iger Kochsalzlösung *aa* unter mehrtägigem Schütteln so hergestellt war, daß das Extrakt ca. einem 2%igen Labpulver entsprach. Dasselbe wurde durch Zufügen von 10% einer $^1/_{10}$ Jodlösung, die durch eine Natriumhyposulfitlösung stets entfernt werden kann, sterilisiert; im Dun-

keln und in der Kälte aufbewahrt, behält diese Lablösung ihren Wert durch 1½ Jahre.

Als pflanzliches Lab benützte Morgenroth die von Rasetti dargestellte Cynarase, ein Labenzym, das durch Fällen des wässerigen Extraktes der Blüten von Cynara cardunculus mit Alkohol hergestellt wird; die Blüten werden in einigen Teilen Italiens zur Käsebereitung verwendet. Das durch Alkoholfällung hergestellte trockene Präparat wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, von den ungelösten Bestandteilen durch Zentrifugieren befreit und durch Zusatz von Jodlösung sterilisiert.

Als Versuchstiere dienten Ziegen und geprüft wurde die Hemmung des Immunserums auf die Milchlabung. Die Labpräparate erzeugten nach Applikation von mehreren Grammen (von der Cynarase an 8 g, von dem tierischen Lab mehr), beginnend mit 0,1 g und allmählich steigend, eine Immunität, die insofern eine deutliche Spezifizität aufwies als das Antilab der Milch zu 4% zugesetzt dieselbe gegen die 20fache die reine Milch koagulierende Labmenge, dagegen nur gegen das 3fache der wirksamen Cynarasemenge schützte, während dieselbe Menge Anticynarase zu 3% zugesetzt die 2½—3½fache wirksame Labmenge und die 27—30fache wirksame Cynarasemenge neutralisierte. Als Reagens benützt Morgenroth frisch gemolkene Milch, die durch anhaltendes Schütteln mit Chloroform gesättigt ist und sorgfältig vor Licht geschützt aufbewahrt wird.

Zur Prüfung werden Proben von 5 ccm Kuhmilch mit abgestuften Labmengen versetzt, 12 Stunden bei 0°—8° gehalten, wobei keine Labung eintritt. Die geringste wirksame Labmenge läßt sich sehr exakt dann derart bestimmen, daß man nunmehr die Proben in den Brutschrank bei 32° bringt. Bei stärkerem Labzusatz tritt die Labung sofort ein, bei schwächerem nach 2—3 Stunden. Für die Anstellung von Reihenversuchen und Ermittlung von Grenzwerten hat Fuld eine Tabelle verfertigt, deren Benützung eine genaue Berechnung der gefundenen Werte bequem ermitteln läßt.

b) Immunisierung mit Emulsin.

Die Reinigung des Emulsins durch Beitzke und Neuberg wurde bereits oben erwähnt; sie verwendeten in Zwischenräumen von 6—8 Tagen je 5—10 ccm der jedesmal frisch bereiteten Fermentlösung und hielten nach Einverleibung von 90 ccm die Immunisierung für beendet.

Hildebrandt injizierte eine Woche hindurch Kaninchen in das Rektum täglich 0,1—0,3 g Emulsin unter allmählicher Steigerung der Dosis; in der zweiten Woche wurde weiter gestiegen, bis 1 g erreicht war; während immune Tiere diese Dosis ohne jede Erscheinung gut vertrugen, wurden normale Tiere von derselben rektal applizierten Dosis innerhalb 24—28 Stunden getötet. Nach Erreichung dieser Grenze kann dann subkutan mit 0,01 g Emulsin bis zu 1 g Emulsin (gelöst in 20 ccm 0,6%iger NaCl-Lösung) fortgesetzt werden.

Da Emulsin nicht allein spaltende Wirkungen auf Glycoside, wie Amygdalin, Salizin, Phloridzin, Arbutin, Coniferin, sondern auch diastatische Wirkungen besitzt, sowie auch Paarungen mit Glycuronsäuren aufhebt, wie Neuberg und Neimann und Hildebrandt nachweisen konnten, so wird durch Immunisierung mit Emulsin bis zu einem gewissen Grade ein „polyvalentes“ Antifermentserum erzeugt. Von Interesse ist es, daß emulsinfeste Tiere auch an der Konjunktiva gegen-

über einer sonst auf lokal appliziertes Emulsin eintretenden Entzündung resistent sind. Auf die von Beitzke und Neuberg gefundene, so überaus interessante synthetische Wirkung des Antiemulsin auf Traubenzucker und Galaktose zu Milchzucker, sowie dessen begünstigende Wirkung für die Synthese der gepaarten Glycuronsäuren kann hier nur verwiesen werden.

c) Immunisierung mit Steapsin.

Für Versuche mit Steapsin oder Lipase verwendete Schütze, wie auch Beitzke und Neuberg eine von G. Grübler in Dresden in Fläschchen zu 50 ccm bezogene „Steapsinsolution", welche eine ölige, klare bernsteingelbe Flüssigkeit darstellt, die von den letzteren Autoren in Dosen von 1—2 ccm in Zwischenräumen von 8—12 Tagen injiziert worden war, während Schütze in Abständen von 3—4 Tagen 5 ccm davon Kaninchen subkutan injizierte; nach Beitzke und Neuberg rufen größere als die von ihnen verwendeten Dosen schwere Substanzverluste der Haut hervor, so daß die Versuchstiere unverwendbar werden. Nach einer Einverleibung in der Gesamtmenge von 50—60 ccm und weniger trat bereits eine antifermentative Wirkung auf zum Unterschiede von der Wirkung des Normalserums, welches die fettspaltende Wirkung des Steapsins, wie dies Beitzke und Neuberg zuerst gezeigt haben, wesentlich erhöht.

Die fettspaltende Wirkung der Lipase, welche sich in der Zerlegung der Fette in Fettsäuren und Glyzerin äußert, wird am zweckmäßigsten auf Rizinusöl derart geprüft, daß 10 ccm Rizinusöl in ein flaches Erlenmeyerkölbchen nebst der entsprechenden Menge der Steapsinlösung und des zu prüfenden Serums gefüllt und durch Schütteln gut vermengt werden. Die Kölbchen werden durch einige Stunden im Brutschrank gehalten. Behufs Titration der gebildeten Fettsäuren kann entweder so verfahren werden, daß in die einzelnen Kölbchen behufs besserer Vermischung des öligen Inhalts mit der Titrierflüssigkeit 20 ccm 93 %igen neutral reagierenden Alkohols zugefügt wird und nach gründlichem Schütteln mit einer Normallauge auf Phenolphthalein titriert wird oder daß die Titration sofort mit einer alkoholischen Normallösung durchgeführt wird. Es ist selbstverständlich, daß von den gefundenen Fettsäurewerten die vorher bestimmte Azidität des Ricinusöl abgezogen werden muß. In den Versuchen von Schütze vermochte erst die 5—10fach größere Menge von Serum als die Menge der zur Spaltung benützten Steapsinlösung die lipolytische Wirkung völlig aufzuheben. Die antilipolytische Wirkung des Immunserums erfährt durch einstündiges Erwärmen auf 56° keine Einbuße.

Ausführliche Untersuchungen über Lipasen als Antigene hat vor kurzem Bertarelli angestellt, der nicht allein tierische Lipasen, sondern auch pflanzliche Lipasen als Antigene verwendet hat und dabei, ähnlich wie Morgenroth beim Lab, feststellen konnte, daß die Lipasen verschiedener Herkunft voneinander verschieden sind, sich durch ihre Antikörper (Antilipasen) trennen und sogar auf diese Weise identifizieren lassen. So konnte es Bertarelli zu mindestens wahrscheinlich machen, daß das in den früheren Versuchen angewandte Grüblersche Steapsin eine Ricinlipase ist oder ihr sehr nahe steht. Bertarelli verwendete von pflanzlichen Lipasen eine aus der Nuß und aus Ricinussamen stammende Lipase, das Steapsin Grüblers, von tierischen Lipasen

die Lipase aus der Bauchspeicheldrüse und der Leber des Ochsen, sowie die Serumlipase.

Die Organlipasen wurden so dargestellt, daß die frischen und im sterilen Mörser zerdrückten Organe mit steriler physiologischen Kochsalzlösung 24 Stunden bei 8⁰ mazeriert und durch Chardinpapier filtriert worden sind. Eine Reinigung mit Uranacetat führte zu keinem günstigen Resultat. Auf Ricinuslipase wurden die Ricinussamen verarbeitet, nachdem dieselben von der äußeren Hülle befreit worden sind; doch ist die so dargestellte Ricinuslipase leicht giftig. Eine Darstellung eines reinen Präparates (Lipasidin) gelingt nach einer Methode von Nicloux. Die in der Nuß vorhandene Lipase wurde so dargestellt, daß die Nußsamen in physiologischer Kochsalzlösung zerdrückt und 24 Stunden lang bei 8⁰ digeriert worden sind; die Flüssigkeit wurde hierauf filtriert.

Die einzelnen auf diese Weise dargestellten Präparate wurden Kaninchen und Hunden alle 6—7 Tage injiziert, wobei verschiedene Quantitäten des Materials benützt wurden, je nach dem lipolytischen Vermögen, das vorher durch Spaltung des Ricinus- oder Olivenöls bestimmt wurde. Ein Hund, welcher 5 Monate mit Rizinuslipase vorbehandelt wurde, lieferte eine Antiricinlipase, die sich jedoch interessanterweise völlig unabhängig von der Serumlipase des Hundes bildet; das Hundeserum der mit Steapsin Grübler immunisierten Tiere hemmt die Wirkung der Ricinuslipase, während Kaninchen, welche mit der wenig beständigen und auch schlecht antigenwirkenden Nußlipase behandelt worden sind, in ihrer Serumwirkung sowohl von den Wirkungen der Ricinuslipase, wie auch des Steapsins verschieden sind. Das Antisteapsinserum beeinflußt wieder seinerseits keine der angeführten tierischen Lipasen und auch nicht die Nußlipase, wirkt dagegen stark hemmend auf die Ricinlipase. Bei Zusatz des Antisteapsinserums tritt infolge der ungeschwächten Wirkung der Serumlipase stets eine Erhöhung der Azidität des Öles ein. Bemerkenswert bleibt auch, daß durch Antisteapsin-Behandlung von Tieren kein Gegenkörper zu erzielen ist, so daß der lipolytische Wert des Serums nicht erhöht wird.

Die tierischen Lipasen erzeugten trotz monatelanger Vorbehandlung von Hunden und Kaninchen keine Immunkörper, deren Bildung jedoch auch bei manchen Kaninchen nach Darreichung pflanzlicher Lipasen des öfteren ausbleibt.

d) Immunisierung mit diastatischen Fermenten.

Über zuckerspaltende Fermente liegen Untersuchungen in größerer Zahl zunächst von A. Schütze vor. Derselbe benützte das von Beyerinck in bestimmten Hefearten, speziell in der Kefirhefe gefundene milchzuckerspaltende Ferment, die Laktase, zur Immunisierung von Kaninchen und Hühnern. Die Darstellung des Fermentes erfolgt derart, daß in einem sterilen Gefäße 50 g echter kaukasischer Kefirkörner mit 200 ccm destillierten Wassers übergossen und nach gründlichem Durchschütteln mit Watte verschlossen, 20—24 Stunden bei 37⁰ bebrütet werden. Hierauf wird die Flüssigkeit durch ein Reichelsches Thonfilter filtriert; das so gewonnene Filtrat, welches im Eisschrank aufbewahrt wird, liefert die Laktase. Die Wirkung derselben wird derart geprüft, daß die bei der Spaltung des zugesetzten Milchzuckers sich bildenden Hexosen, die Glukose und Galaktose, durch Darstellung der betreffenden Osazone charakterisiert werden. Da sowohl das Glukosazon als auch das Galaktosazon in heißem Wasser viel schwerer löslich ist, als das Laktosazon, so läßt sich schon

auf diese Weise neben Bestimmung des Schmelzpunktes, der Krystallform und Analyse der Osazone das Eintreten oder Nichteintreten der Milchzuckerspaltung leicht konstatieren.

Das normale Kaninchen- und Hühnerserum übt keine Hemmung auf die Spaltung des Disaccharids aus, während subkutane oder intramuskuläre Injektionen von Kefirlaktase sowohl bei Kaninchen, wie auch beim Huhn nach Verwendung einer Gesamtmenge von 70 ccm der Fermentlösung innerhalb sechs Wochen (in einem zweiten Falle allerdings von 200 ccm innerhalb drei Monaten) das Auftreten einer diese Spaltung hemmenden Substanz zu erzeugen vermag. Die Proben werden derart angestellt, daß 10 ccm einer 5 $^0/_0$ igen Milchzuckerlösung mit einer bestimmten zur Spaltung ausreichenden Menge von Kefirlaktase versetzt werden, welchem Gemisch dann fallende Mengen des betreffenden Serums zugesetzt werden; die Proben bleiben 24 Stunden im Brutschrank, werden dann nach Essigsäure und Kochsalzzusatz in der Hitze oder durch Aussalzen mit Ammonsulfat enteiweißt und in den Fitraten mittels der Phenylhydrazinreaktion die Osazone dargestellt. Das Kaninchenantiserum erleidet durch zweistündiges Erhitzen auf 60 ^{0} in seiner antifermentativen Wirkung keine Einbuße.

Für die Darstellung von Antidiastasen wurde von Ascoli und Bonfanti das Pankreatin verwendet; dasselbe ist gewöhnlich mit Alkohol gefällter Glyzerinextrakt des Pankreas. Das Blutserum normaler Kaninchen besitzt nach diesen Autoren eine Vielheit diastatischer Fermente, die auf verschiedene Stärkearten mehr oder minder spezifisch wirken. Durch Behandlung derselben mit Pankreasdiastase erscheint im durch Erwärmen inaktivierten Immunserum zuweilen eine Antidiastase, welche die diastatische Wirkung des Pankreatins auf Stärkesuspensionen hemmt. Preti benützte zur Darstellung von Antidiastasen das Parke-Davissche Pankreatin, die Takadiastase, ein von einer auf Reis wachsenden Pilzart, Eurotium Oryzae, erzeugtes verzuckerndes Ferment, Mercksches Ptyalin und Maltin, welche mit Wasser zerrieben und nach Chloroformzusatz im Brutschrank 12 Stunden lang digeriert worden waren; die klaren Filtrate wurden durch Chamberlandkerzen filtriert und intraperitoneal Kaninchen eingespritzt. Die Menge des abgespaltenen Zuckers wurde nach Enteiweißen durch Kochen mit Essigsäure und Kochsalz mittels Titration des Filtrates mit Violettescher Kupfersulfatferrocyankaliumlösung bestimmt. Eine Bakterienwirkung muß vorher durch absolute Sterilität, eventuell erzielt durch Zusatz von Toluol, sicher ausgeschlossen werden. Preti fand, daß das inaktivierte Blutserum des durch Pankreatin und Maltin immunisierten Kaninchens die Wirkung dieser Fermente nicht hemmt und die Diastasen begünstigende Fähigkeit des normalen Serums, wie es auch Pozerski fand, beibehält. Das auf Takadiastase und Maltin nicht wirkende Blutserum von Kaninchen kann durch Immunisierung mit diesen Fermenten die für das betreffende Ferment spezifische Fähigkeit gewinnen, die amylolytische Wirkung des betreffenden Fermentes zu hindern.

Schütze und Bergell haben mit einem Invertin von Merck Kaninchen subkutan in Zwischenräumen von 5—10 Tagen, 4—5 Monate hindurch injiziert, wobei stets 0,2 g des Präparates, in steriler Bouillon gelöst, verwendet worden waren, so daß die Tiere bei Beendigung des Versuches ca. 6 g Invertin einverleibt erhielten. Die Prüfung auf die Antifermentwirkung geschah derart, daß nach zweistündigem Stehen einer mit Immunserum, Rohrzucker und Invertin versetzten Probe im Brutschrank das Eiweiß koaguliert und der Reduktionswert durch Wägung

des reduzierten Kupferoxyduls resp. Kupfers bestimmt wurde. Während 1 g Rohrzucker bei Zusatz von 0,2 g Invertin und 1 ccm Normalserum eine Menge von etwas über 2,0 g Kupfer bei der Reduktion lieferte, ergaben die Bestimmungen unter sonst gleichen Verhältnissen und Zusatz des Immunserums ca. 1,8 g bis 1,9 g Kupfer, also eine Verminderung der Reduktion; es handelt sich also auch hier nur um eine Begrenzung des Fermentprozesses bis zu einem gewissen Grade, keineswegs um eine Aufhebung der Fermentwirkung.

Hier wären auch die Versuche von JACOBSOHN und HAHN, mit Hilfe der Hefe-Zymase, welche Zucker in Alkohol und Kohlensäure zu zerlegen vermag, Immunkörper zu erzeugen, anzuführen. Als Antigen verwendeten diese Autoren sterile, pulverförmige Dauerhefe „Zymin" aus der Preßhefefabrik SCHRODER in München; das Präparat wurde mit physiologischer NaCl-Lösung in einer Reibschale zu einem Brei gleichmäßig verrieben und es wurden mit dieser Emulsion Ziegen, wie Kaninchen subkutan vorbehandelt, wobei die Behandlung mit 1 g Zymin in 10 ccm 0,9 %iger NaCl-Lösung begonnen und die Dosis in drei bis vier Wochen auf 4 g bis 6 g, welche in 20 ccm NaCl-Lösung gelöst worden waren, erhöht wurde. Die Einspritzungen werden schlecht vertragen, so daß eine große Tierzahl für diese Versuche nötig ist. Der Ablauf der Zuckergährung wurde durch die Menge der gebildeten Kohlensäure bestimmt, indem diese nach einem an die Kohlensäurebestimmung von BUNSEN und die Triebkraftbestimmung der Hefe nach MEISSL sich anlehnenden Verfahren durch Gewichtsverlust ermittelt wurde. Die Prüfung erfolgt derart, daß in kleine Erlenmeyerkölbchen je 5 ccm 80 %iger Rohrzuckerlösung, das zu prüfende Serum (ca. je 5 ccm), ferner 2 g des gährkräftigen Zymins und 0,2 ccm Toluol gefüllt werden und das Kölbchen mit Bunsenventil und Gährverschluß nach MEISSL verschlossen wird. Die abgewogenen Kölbchen werden in den Brutschrank bei 24° eingestellt und nach zwei bis drei Tagen der durch die Gährung erfolgte CO_2-Verlust durch abermalige Wägung bestimmt*). Während die von HAHN mit Dauerhefe und mit frischem Preßsaft erhaltenen antifermentativen Wirkungen des Serums durchaus negative waren, hatte JACOBSOHN in einem Versuche, wenn auch eine mäßige, so immerhin positive Antifermentwirkung beobachten können.

e) Immunisierung mit proteolytischen Fermenten.

Eine Immunisierung mit proteolytischen Fermenten hat zuerst v. DUNGERN ausgeführt, indem er auf Grund der Wahrnehmung, daß das Blutserum von Menschen und Tieren, die mit bestimmten peptonisierenden Bakterien infiziert waren, wie mit Cholera, Milzbrand, Staphylokokken, die Eigenschaft besitzt, die Wirkung der eiweißspaltenden Fermente der betreffenden Bakterien zu vernichten, Versuchstiere mit diesen Bakterienkulturen vorbehandelte und auf diese Weise eine beträchtliche Steigerung der antiproteolytischen Fähigkeit des Serums gegenüber den spezifischen proteolytischen Bakterienfermenten erzeugte. Diese Eigenschaft war innerhalb gewisser Grenzen eine spezifische, so daß sie v. DUNGERN als eine diagnostische Serumreaktion verwerten zu können glaubte. Die Fermentprüfung wurde mit Hilfe der weiter unten zu beschreibenden Fermischen Thymolgelatinemethode ausgeführt. GLÄSSNER

*) Die ausführliche Beschreibung der gewichtsanalytischen Bestimmung der Gährkraft siehe: E. und H. BUCHNER und M. HAHN; Zymasegährung. München und Berlin bei Oldenbourg 1893 pag. 80 und ff.

und Rosculec haben bei ihren Studien über Bakterienfermente, deren Entwicklung durch den Eiweißreichtum des Nährbodens begünstigt wird, die fermenthaltigen Kulturfiltrate als Antigene mit Erfolg benützt. Die Züchtung der Bakterien auf eiweißreichen Nährböden befördert die Entstehung eines außerordentlich wirksamen Antifermentes; Sauerstoffzufuhr hat auf die Fermentbildung keinen Einfluß und das Alter der Kultur hemmt die Fermentproduktion.

Hierher gehört auch nach Gheorghiewsky die zuerst von Charrin beobachtete Tatsache, daß der Bacillus pyocyaneus, der im Normalserum (z. B. des Kaninchens) im Verlaufe von sechs bis sieben Tagen den charakteristischen blauen Farbstoff entwickelt, keinen Farbstoff bildet, wenn er sich im Serum eines mit Pyocyaneusbazillen immunisierten Tieres entwickelt. Charrin führte diese Tatsache auf eine Destruktion der Bazillen durch das Immunserum zurück; doch konnte Gheorghiewsky, der Tiere sowohl mit lebenden, wie auch abgetöteten Bakterien, als auch mit dem Wassermannschen Pyocyanustoxin immunisiert hatte, zeigen, daß diese Hemmung der Farbstoffbildung durch das so dargestellte Immunserum von Meerschweinchen nichts mit einer Beeinflussung der völlig lebensfähig bleibenden Bakterien zu tun habe, sondern mit Wahrscheinlichkeit auf die durch das Immunserum bedingte Hemmung der Proteolyse zurückzuführen sei. Es genügt sogar der Zusatz von Immunserum zu einem für die Farbstoffentwickelung sonst günstigen Normalserum, um die Farbstoffbildung zu verhindern, während andererseits der Zusatz von ein paar Tropfen einer sterilen Peptonlösung oder eines proteolytischen Fermentes, wie des Papayotins, genügt, um das für die Farbstoffproduktion nötige Eiweißabbaumaterial zu liefern und die Farbstoffbildung rasch in Gang zu bringen.

Das proteolytische Enzym der Hefe, die sogenannte Hefe-Endotryptase, hat Hahn als Antigen verwendet, indem er Ziegen und Kaninchen für die Darstellung eines Immunserums benützte, das zum Teil bereits Jacobsohn durch Immunisierung der Tiere mit Dauerhefe erhalten hatte. Die Prüfung fand derart statt, daß 10 ccm frischen Hefepreßsaftes mit steigenden Serummengen versetzt und mit Kochsalz auf 20 ccm aufgefüllt in verschlossenen Gefäßen sechs Tage lang bei 37° digeriert wurden. Nach dieser Zeit wird das saure Reaktionsgemisch unter Zusatz von Wasser und konzentrierter Kochsalzlösung nach Neutralisation koaguliert und im Filtrat der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Die Versuche ergaben, daß bereits normales Kaninchen- und Ziegenserum eine die Endotrypsinwirkung hemmende Eigenschaft besitzen, die durch die Immunisierung mit Dauerhefe etwas, aber nicht sehr stark gesteigert wird. Während unter den gegebenen Verhältnissen normales Kaninchenserum erst in einer Menge von 2,5 ccm die Hefetryptase zu hemmen vermag, tritt bei dem spezifischen Immunserum schon bei Zusatz von 0,5 ccm eine deutliche Hemmungswirkung ein, so daß die Wirkung mindestens um das fünffache gesteigert wurde.

Von pflanzlichen proteolytischen Fermenten wurde weiter das Papayotin als Antigen von Achalme und von v. Stenitzer zu verwenden gesucht und zwar in Form der durch Ton- und Porzellanfilter gejagten wässerigen oder Kochsalzlösungen der Handelspräparate. Indes scheiterten alle Versuche Achalmes, die er mit intraperitonealer Immunisierung von Meerschweinchen durchführte und die Tiere zeigten, ähnlich wie die v. Stenitzer benützten Ziegen, selbst wenn sie die intraperitoneale Injektion gut vertrugen, bei subkutaner Injektion immer wieder

schwere Nekrosen, die auf die nekrotisierende Wirkung des Papayotinpräparates zurückzuführen ist.

Die Befunde v. STENITZERS sind dabei umso bemerkenswerter, als er eine Ziege durch mehr als $^1/_2$ Jahr in 10—14tägigen Intervallen subkutan mit je 1 g Papayotin, welches in 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst war, behandelte; dabei erfolgte neben der subkutanen Behandlung durch mehrere Monate täglich noch Darreichung von 1 g Papayotinpulver per os; trotzdem wurde eine nach einem Vierteljahr versuchte Steigerung der Dosis auf 1,5 g von dem Versuchstier nicht vertragen. Mühevolle Versuche v. STENITZERS, dieses toxische Prinzip von dem die Proteolyse bedingenden zu trennen, führten bisher zu keinem eindeutigen Resultate. Antitryptisches Serum ist nach ACHALME nicht imstande die Einwirkung des Papayotins auf Milch zu beeinflussen und ebensowenig sind trypsinfeste Meerschweinchen gegen die deletäre Papayotinwirkung geschützt. Auch Versuche von SCHÜTZE und BERGELL, mit Hilfe von Papayotin antiproteolytisch wirkende Sera zu erzeugen, lieferten nur geringe Differenzen, welche nach der Seite der Antikörperbildung verwertet werden können.

Unter Versuchen, mit den tierischen proteolytischen Fermenten Antikörper zu erzeugen, sind an erster Stelle die Versuche H. SACHS mit Pepsin zu erwähnen. SACHS immunisierte mit einem von WITTE in Rostock stammenden Pepsinpräparat intraperitoneal Gänse; dieselben erhielten im Verlaufe von 2—5 Monaten 12 gr dieses Pepsins. Die Prüfung des Immunserums erfolgte mit Hilfe der Fermischen Thymolgelatine und zwar so, daß die Pepsinserumgemische zunächst 40 Minuten lang in dem Brutschrank gehalten, dann erst mit 2 ccm 7 %iger Thymolgelatine versetzt und zur Verdauung weiter in den Brutschrank gebracht wurden. Der Salzsäuregehalt betrug 0,1 %. Das erhaltene Resultat zeigte, daß bei Anwesenheit von 1 ccm Antipepsinserum mehr als 20mal so viel Pepsin nötig ist, um die Gelatine zu verflüssigen, als wenn dieselbe Menge normalen Gänseserums, welches an sich nur eine geringe Pepsinhemmung ausübt, zugesetzt wird. Die Antipepsinbildung läßt sich jedoch über ein gewisses Maß hinaus nicht steigern.

Die tryptischen Fermente hat zuerst LANDSTEINER als Antigene zu benützen versucht; obwohl er in großen Mengen Trypsin Kaninchen einspritzte, blieb trotzdem ein Steigen der antitryptischen Serumwirkung aus. DEAN berichtete dagegen über günstige Ergebnisse bei der Immunisierung einer Gans und zweier Ziegen mit Trypsin. ACHALME, der sich in ausführlichen Untersuchungen mit der Immunisierung gegen die Fermente des Pankreas beschäftigte, benützte ein Pankreatin des Handels, welches aus Schweinepankreas durch Behandlung mit Alkohol und Äther als trockenes und gesiebtes Pulver dargestellt wird. Dieses Pulver war in Wasser schlecht löslich und erst durch Digestion mit Chloroformwasser bei 37° durch 24 Stunden wurde eine gut wirksame Lösung erzielt, die in einem Gehalte von ca. 5 % des Trockenpankreas zur Verwendung gelangte. Bei Anwendung von Lösungen geringerer Konzentration treten, da größere Mengen der Lösungen injiziert werden müssen, leicht schwere Nekrosen auf. Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch Papier und Porzellanfilter bei 35—38° filtriert, wodurch man gut wirksame Filtrate, jedoch mit einem Verlust von 25—35 % der ursprünglichen Wirkung erhält. Als Prüfungsmethode bei dem durch Behandlung von Meerschweinchen erhaltenen antitryptischen Serum wurde die Lösung des durch das Ferment aus einer gut abgerahmten Milch ausgefällten Kaseins

bis zur völligen Klärung der Flüssigkeit verwendet, indem je ca. 3 ccm Milch in Eprouvetten, die hernach bei 120° ½ Stunde hindurch sterilisiert wurden, verteilt worden waren. Die Beobachtung fand bei 45° statt. Man beobachtet dabei, welche von den Röhrchen, die Immunserum und Trypsin in verschiedenen Mengen nebst der Milch enthalten, nach einer bestimmten Zeit, z. B. nach 24 Stunden, unverändert bleiben, und hat auf diese Weise ein Maß der antitryptischen Wirkung. Die Immunisierung fand intraperitoneal statt, welche Applikationsweise schon wegen des Ausbleibens der Nekrosen der subkutanen vorzuziehen ist; man kann so jungen Meerschweinchen 5 ccm der Lösung, dann 10 ccm beibringen, und nach dem drittenmal bereits die subkutane Injektion mit steigenden Dosen ausführen. Doch ist auch hier großes Tiermaterial nötig, da die Tiere rasch abmagern und bis ¼ ihres Körpergewichtes verlieren. Das Blut der mit Trypsin immunisierten Tiere zeichnet sich nach Achalme dadurch aus, daß der Blutkuchen sowie die roten Blutkörperchen bei aseptischem Aufbewahren lange Zeit vor Zerfall geschützt bleiben, im Gegensatze zum Blute normaler Tiere; außerdem besitzt das antitryptische Serum auch die Eigenschaft, in vitro mit dem Trypsin gemischt, die Tiere gegen die nekrotisierende Substanz des Trypsins, deren Wirkung Achalme als eine vasomotorische ansieht, zu schützen. Durch Erhitzen bei 64—65° wird die antitryptische Fähigkeit des Immunserums aufgehoben, doch soll dasselbe die Eigenschaft besitzen, normales Serum zu sensibilisieren und zu einer stärkeren antitryptischen Wirkung befähigen. Bei Immunisierung von Gänsen mit frischem, zerriebenem Hundepankreas beobachtete Achalme ebenfalls eine Steigerung der antitryptischen Wirkung; dieses Serum soll gleichzeitig die Eigenschaft besitzen, die Sekretion des Pankreatins frischer Pankreaszellen zu beschleunigen.

Zu erwähnen bleibt noch, daß Bergell und Schütze den Versuch anstellten, Kaninchen mit Pancreatinum purissimum der Fabrik Rhenania in Aachen zu immunisieren und die Antipankreatinwirkung derart kontrollierten, daß eine 10%ige Lösung von Seidenfibroinpepton mit Pankreatin im Verhältnis 1:50 versetzt, schwach alkalisch gemacht und filtriert wurde. Zu 10 ccm des Gemisches wurden je 2 ccm normalen Serums oder Immunserums zugesetzt und die Lösung bei 37° digeriert. Die Fermentwirkung wurde durch Auskristallisieren des Tyrosins bestimmt. Das Immunserum enthielt jedoch kein Antiferment, welches die Spaltung des Peptons in Tyrosin und Leucin gehemmt hätte. Ebenso scheiterte der Versuch dieser beiden Autoren, ein von Bergell und Lewin aus der Leber dargestelltes, auf Seidenpepton wirkendes Ferment als Antigen zu benützen. Trotz der durch drei Monate fortgeführten subkutanen Behandlung eines Hundes mit dem Ferment hatte das Serum keine Antifermentwirkung gezeigt.

Von den bisher angeführten Methoden, die proteolytische Wirksamkeit zu prüfen, wurde die Fermische Thymolgelatinmethode am häufigsten verwendet und möge daher deren Ausführung hier genauer beschrieben werden. Da das vielfach als Reagens für Proteolyse benützte Fibrin bei schwachen oder stark verdünnten Fermenten im Stiche läßt, da sich dessen erfolgte Lösung nicht immer nachweisen läßt und ebenso die Biuretreaktion mitunter nicht gut verwendbar ist, zumal bei biuretgebenden Fermentpräparaten, hat Fermi eine Gelatine benützt, welche derart hergestellt ist, daß 5—10 gr sogenannter Goldgelatine mit 93 gr wässeriger Thymol- oder Karbolsäurelösung so lange im Kolben gekocht werden, bis eine Verflüssigung der Gelatine eintritt. Diese Lösung wird zu

10 ccm in Eprouvetten verfüllt und in senkrechter Stellung zum Erstarren gebracht. Zur längeren Aufbewahrung empfiehlt es sich, die Reagenzröhrchen nach Erstarrung der Gelatine, um sie vor dem Vertrocknen zu schützen, umgekehrt in einem Glase mit etwas Wasser aufzubewahren. Die auf Fermentgehalt zu prüfende Flüssigkeit wird ebenfalls mit Thymol oder Karbolsäure versetzt, um eine durch Mikroorganismen etwa bedingte Proteolyse auszuschließen. Die Ausführung der Prüfung geschieht in der Weise, daß zu den Gelatinröhrchen einige Kubikzentimeter der zu prüfenden Flüssigkeit zugesetzt werden. Bei Anwesenheit eines Fermentes wird die Gelatine in regelmäßiger, meßbarer Schicht gelöst; erfolgt nach 5—6 Tagen keine Lösung der Gelatine, so ist die Flüssigkeit fermentfrei. Nach FERMI ist es nötig, die Versuche bei einer Temperatur anzustellen, welche einige Grade unter dem Schmelzpunkte der Gelatine liegt, also bei gewöhnlicher Zimmertemperatur. Ferner soll es vermieden werden, der Gelatine Stoffe zuzuführen, welche ihre Beschaffenheit ändern, wie Alkalien, Säuren, welche die Gelatine lösen, und Tannin, Glyzerin und Metallsalze, welche sie unlöslich oder schwer löslich machen; daher ist auch die Anwendung von Glyzerinextrakten von Fermenten dabei zu vermeiden. Konzentrierte Gelatine ist viel weniger empfindlich, als verdünnte; 3 %ige liefert die beste Konzentration, wobei ein Zusatz von 1—7 % Soda die Empfindlichkeit steigert, während Ammoniakzusatz dieselbe herabsetzt. Sehr empfindlich wird die Reaktion durch die Anwesenheit von feinsten Kohlenpartikelchen, ebenso wird sie durch Schiefstellung der Röhrchen, wodurch ein Abfluß der verflüssigten Gelatine ermöglicht wird und durch Luftdurchleiten, wodurch das Enzym mit der Gelatine besser in Kontakt tritt, empfindlicher. Mit diesen Verfeinerungen läßt sich nach FERMI Trypsin bei einer Verdünnung von 1 : 1 Million nachweisen, bei Verwendung von 1 %iger Gelatine sogar im Verhältnis von 1 : 4 Millionen. Von anderen Substraten wurden noch Alkalialbuminate und zwar Ammoniakalbuminat von 20 %, auch Kalialbuminat als zweckmäßig gefunden, weniger Natriumalbuminat, wobei wieder Ochsenserum dem Schweineserum vorzuziehen ist; Eiereiweiß ist unbrauchbar. Bequem ist bei der Fermischen Methode die Verwendung von graduierten, ca. 8—10 mm im Durchmesser fassenden Eprouvetten; um quantitative Maße zu erhalten, ist es nötig zunächst eine Trypsinlösung genau in verschiedenen Verdünnungen auszuwerten und darnach die Fermentlösung von unbekanntem Gehalt einzustellen.

Eine der Fermischen Methode ähnliche und nach den Angaben des Autors verläßlichere hat MALFITANO angegeben; das Verfahren ist höher oben bereits beschrieben. Zu bemerken bleibt, daß auch HAHN die Methode von FERMI nur als zur Orientierung geeignet ansieht; für genauere quantitative Versuche findet er nur die chemische Analyse auf Grund der Stickstoffbestimmung brauchbar.

DE WAELE, SUGG und VANDEVELDE bestimmen die Verflüssigung der Gelatine so, daß sie zu 40 ccm der Gelatinbouillon 10 ccm Wasser und 160 ccm 94 % Alkohols zusetzen; in der so resultierenden Mischung, die ca. 70 % Alkohol enthält, sind nach den Autoren die durch die Gelatinspaltung entstandenen Albumosen und Peptone noch löslich und lassen sich dann leicht nachweisen.

Die bekannte Methode von METT, welche wegen ihrer relativen Einfachheit mitunter recht gute Dienste leisten kann, besteht darin, daß Glasröhrchen von 1—2 mm lichter Weite durch Ansaugen mit Hühnereiweiß gefüllt werden, worauf das Eiweiß darin durch Eintauchen der

Röhrchen in ein heißes Wasserbad koaguliert wird. Die Röhrchen werden nun in Stücke von 1—2 cm Länge zerschnitten und können sofort durch Eintauchen in die zu prüfende, im Brutschrank eingestellte Fermentlösung (gewöhnlich Pepsin) verwendet werden. Den Ablauf der Verdauung mißt man mittels Lupe in Millimetern der verdauten Eiweißsäule.

Eine bequeme und empfindliche Methode, die tryptische Verdauung zu messen, ist nach Obermayer und Pick die refraktometrische Bestimmung. Neuerdings haben Abderhalden und Koelker zur quantitativen Bestimmung der Fermentwirkung optisch-aktive Polypeptide verwendet, welche, in der zu bestimmenden Fermentlösung gelöst, in einem mit einem Metallmantel, durch den Wasser von 37° geleitet wird, umgebenen und mit einem Thermometer versehenen Polarisationsrohr angefüllt werden. Der durch die Drehung leicht festzustellende Abbau der Polypeptide liefert ein Maß der Fermentwirkung.

f) Immunisierung mit Fibrinferment.

Für das Fibrinferment und Fibrinogen des Blutes haben Camus, Bordet und Gengou Antikörper erzeugt. Während Camus die von ihm auf ähnliche Weise wie von den beiden anderen Autoren erzeugte Immunität der Einwirkung der erzielten Immunkörper auf das Fibrinogen zuschrieb, konnten Bordet und Gengou feststellen, daß es sich in der Hauptsache um einen auf das Fibrinferment wirkenden Gegenkörper handle, wenn auch das Fibrinogen dabei eine Veränderung erfährt, die dasselbe für das Zustandekommen der Gerinnung weniger tauglich macht. Bordet und Gengou benützten als Antigene Meerschweinchen- und Kaninchenserum, resp. Kaninchenplasma, das nach einer der früher angegebenen Methoden (Paraffinmethode) sorgfältig bereitet worden war; mit diesen wurden sowohl Meerschweinchen wie auch Kaninchen vorbehandelt; dabei wurden ca. 5 ccm des Serums oder des Plasmas 3 bis 4 mal injiziert. Es ergab sich, daß Tiere der Art A, vorbehandelt mit Plasma oder Serum der Art B, ein Immunserum lieferten, welches das Fibrinferment des Blutes oder das Serum der Art B neutralisierte. Wenn die Tiere mit Plasma behandelt worden sind, so ergibt das Plasma der Art B Fällungen, welche auch das Fibrinogen in seiner Gerinnungswirkung modifizieren. Die Wirkungen dieser Antigene zeigen, wenn auch keine absolute, so immerhin eine deutlich ausgesprochene Spezifizität, die sich darin kundgibt, daß ein von Kaninchen stammendes Serum oder Plasma am besten gegen das Fibrinferment des Kaninchenblutes, weniger gegen des Meerschweinchenblutes und gar nicht oder sehr wenig gegen jenes des Hunde- und Hammelblutes wirkt, eine Beobachtung, die für die Verschiedenheit und Vielheit der Fibrinfermente verschiedener Tierarten spräche. Das Prinzip der von diesen Autoren angewandten Prüfungsmethode beruht darauf, daß Gänseplasma, das aus dem sorgfältig aufgefangenen (nach den früher beschriebenen Methoden siehe S. 420) und dann spontan nahezu ungerinnbaren Blute bereitet worden war, mit einem frischen, also Ferment enthaltenden Serum gemischt, sofort gerinnt. Wird dieses Serum jedoch durch ca. $^3/_4$ Stunden auf 58,5° erhitzt, so verliert es die gerinnungsfördernde Eigenschaft; ein Gemisch von normalem Kaninchenserum und erhitztem Meerschweinchenserum bleibt infolge der Anwesenheit des nicht erhitzten Kaninchenserums wirksam; ein Gemisch von normalem Kaninchenserum dagegen und erhitztem Meerschweinchenimmunserum, das durch Injektion von Kaninchenserum gewonnen worden war, bleibt infolge der Neutralisierung des Fibrinfermentes des Kaninchen-

serums durch das Antiferment des erhitzten Meerschweinchenserums für das Gänseplasma unwirksam. Auf diese Weise läßt sich durch die Variation in den zugesetzten Serummengen auch die Wirksamkeit des Immunserums bestimmen. Der Antikörper wird durch das Erhitzen auf 58° nicht geschädigt.

Die Antigenwirkungen, welche durch das gerinnungshemmende Prinzip des Blutegels, das Hirudin, erzeugt worden sind (Wendelstadt, Schütze), können wohl nicht zu den antifermentativen gerechnet werden und sind daher an anderer Stelle bereits angeführt.

g) Immunisierung mit oxydativen Fermenten.

Von oxydativen Fermenten wurde die Tyrosinase Bertrands zur Antigenbildung benützt, ein Ferment, dessen spezifische Wirkung auf das Tyrosin und ähnliche hydroaromatische Derivate nach A. Bach hauptsächlich auf die spezifische Natur der in der Tyrosinase enthaltenen Peroxydase und nicht auf die Oxygenase zurückzuführen ist. Gessard, der zuerst eine Hemmung verschiedener Normalsera gegenüber der durch Umwandlung des Tyrosins in ein rot, violett und schwarz gefärbtes Melanin sich charakterisierenden Tyrosinasewirkung beobachtet hatte, versuchte Kaninchen mit pflanzlicher Tyrosinase subkutan zu immunisieren. Die von ihm benützten Tyrosinasepräparate waren derart hergestellt, daß die betreffenden Pilze (Russula- und Lactariusarten) im Vakuum über Schwefelsäure oder bei 40° getrocknet, pulverisiert und hierauf mit Chloroformwasser (3 g in je 15 ccm) 12 Stunden lang mazeriert wurden; das Gemisch wurde dann im Filtrierbeutel ausgepreßt, und die erhaltene Flüssigkeit durch eine Chamberlandkerze, welche die Fermentwirkung nicht schwächt, durchgejagt. Die Menge des Ausgangsmaterials betrug ca. 340 g Pilze, welche mit 400 g Chloroformwasser extrahiert worden waren; von der endlich resultierenden Fermentlösung wurde Kaninchen 8 bis 11 mal je 10 ccm eingespritzt. Für die Prüfung der Antifermentwirkung bediente sich Gessard der nach Bourquelot dargestellten Präparate, indem er die frischen Pilze (255 g) mit Glyzerin (860 g) extrahierte; auf diese Weise erhält man eine gut haltbare Lösung, welche zu Versuchszwecken nur mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt zu werden braucht. Die Stammlösung wird zweckmäßig, um bei wiederholter Entnahme aus einem größeren Gefäße eine Schädigung der Fermentlösung zu vermeiden, in kleine Fläschchen eingefüllt. Das Reagens für einen Tropfen Fermentlösung stellten stets ca. 2 ccm einer 0,05 %igen Tyrosinlösung dar. Die erzielte Wirkung des Antifermentes bestand in einer bedeutenden Verzögerung des Auftretens des Melanins. Während das Serum eines normalen Kaninchens in einer Menge von 12 Tropfen der Tyrosin-Tyrosinasemischung zugesetzt, die Färbung innerhalb 24 Stunden auftreten läßt, verzögert der Zusatz von 3 Tropfen des Serums eines behandelten Kaninchens die Melaninbildung unter den gleichen Verhältnissen um 24 Stunden, bei 5 Tropfen um 3 Tage, bei 8, 9 und 10 Tropfen um 6 Tage. v. Fürth, der sich um das Studium der tierischen Tyrosinasen und deren Wirkungen große Verdienste erworben hat, konnte mittels kolorimetrischer Messungen in gemeinsam mit Jerusalem ausgeführten Versuchen über Antityrosinasebildung mit Fermenten, die aus der Drüse des Tintenfisches isoliert waren, keine spezifische Gegenwirkung nachweisen.

Im Anschluß an Immunisierungen mit Tyrosinase seien Czapeks originelle Versuche erwähnt, die er an geotropisch gereizten Pflanzen (Lupinenwurzeln) ausführte und die ebenfalls zu einer Hemmungswirkung

auf das der Laktase Bertrands ähnliche, in den Wurzelspitzen vorhandene Oxydationsferment führten, die Czapek auf ein neu entstandenes Antienzym, eine Antioxydase, bezieht. Dieses Ferment verwandelt die aus dem Tyrosin durch die Wirkung der Tyrosinase entstandene Homogentisinsäure*) noch weiter in eine Silbernitrat nicht mehr reduzierende Substanz und läßt sich durch Bestimmung der Homogentisinsäure nach der Methode von Baumann und Wolkow durch Titration mit ammoniakalischer Silberlösung in seiner Wirkung leicht quantitativ nachweisen. Werden die Wurzelspitzen nun geotropisch gereizt, so tritt nach ziemlich kurzer Zeit, nach ca. $^1/_2$ Stunde, eine Vermehrung der Homogentisinsäure ein und man kann, wenn man die Wurzelspitzen mit Glasstaub fein verreibt und mit Chloroformwasser bei 40° digeriert, nachweisen, daß auch zugesetzte Homogentisinsäure in den Digestionsproben aus geotropisch gereizten Wurzelspitzen bedeutend später verschwindet als in Proben die aus ungereizten Proben hergestellt worden sind. Es gelingt auch durch einen ganz geringen Zusatz von gereiztem Wurzelbrei zu einer ungereizten Probe, also gewissermaßen durch Zusatz des Antifermentes, bereits eine bedeutende Oxydationshemmung in der letzteren herbeizuführen. Der hemmende Stoff ist in Wasser löslich, in Alkohol unlöslich und wird durch Kochen zerstört.

h) Immunisierung mit Urease.

Harnstoffzersetzende Bakterienfermente haben Moll und M. Hahn zur Antigenbildung benützt, indem ersterer aus den Kulturen von Mikrococcus ureae Pasteur durch Alkoholfällung die Urease darstellte, während letzterer ein aus gleicher Kultur hergestelltes Acetonpräparat verwandte. Die Bereitung der Urease geschieht nach Moll so, daß ca. eine Woche alte Kulturen ohne filtriert zu werden mit Alkohol gefällt werden; der Niederschlag wird bei 30—35° getrocknet und pulverisiert. Ein längeres oder ein kürzeres Wachstum der Kultur ergibt nur schwächere Fermentbildung. Das Ferment läßt sich vom Bakterienleib durch Filtration nicht trennen, es verträgt im trockenen Zustande Erhitzen bis 70°, während es beim Erhitzen auf 80° abgetötet wird. Das Ferment bleibt lange Zeit unverändert wirksam, zumal bei Zusatz von Natriumfluorid (1 ccm einer 0,4%igen Lösung); Toluol und Chloroform schädigt dasselbe. Eine ähnliche Urease konnte Moll auch aus den Kulturen von Staphylokokkus pyog. aureus, Bakterium koli und Proteus vulgaris, dagegen nicht aus denen von Streptococcus pyog. aureus gewinnen. Das Bakterienfermentpräparat ist giftig für Kaninchen, indem drei bis fünf subkutane Injektionen von je 0,1 g desselben pro die genügen, um Tiere mittleren Gewichtes unter allgemeiner Abmagerung, Durchfall und Temperaturabfall zu töten. Durch Behandlung von Kaninchen mit dieser Urease konnte die bereits normalerweise vorhandene Hemmung des harnstoffzersetzenden Fermentes um 20—55% gesteigert werden.

Die Immunisierung wurde mit 0,05 g des Fermentpräparates pro Injektion durchgeführt. Die Antigenprüfung wurde derart vorgenommen, daß ein Gemisch von 10 ccm 2%iger Harnstofflösung, Ferment, Serum und 1 ccm NaFl-Lösung 72 Stunden bei 35° gehalten und nachher die

---

*) Nach E. Schulze und N. Castoro entsteht indes beim Abbau des Tyrosins in den Keimpflanzen keine Homogentisinsäure und es ist daher zweifelhaft, ob das von Czapek titrierte Produkt Homogentisinsäure oder ein anderer vom Tyroton abstammender Körper war, was jedoch für das hier besprochene Phänomen von untergeordneter Bedeutung ist.

Menge des übrig gebliebenen Harnstoffs nach der Methode von Mörner-Sjöquist bestimmt wurde. Weder das auf 80°—100° erhitzte Fermentpräparat, noch andere ureasefreie, aber giftige und auf gleiche Weise, wie die Urease aus Subtiliskulturen dargestellte Präparate sind imstande, eine Steigerung der Hemmungswirkung des Serum zu erzeugen. Die hemmende Substanz im Normalserum ist verschieden von jener im Antifermentserum, indem das letztere seine Wirkung bei 65° verliert, während das erstere weder bei 65°, noch selbst durch sechsstündiges Erhitzen bei 56° alteriert wird. Moll hält es für wahrscheinlich, daß die Ursache der geringen Wirkung des Antifermentes darin liege, daß das Harnstofferment vom Zelleib nur schwer trennbar ist. M. Hahn, dessen Fermentpräparat in Mengen von 0,3—2 g Harnstoff in fünf Tagen zersetzte, konnte nach Injektion insgesamt derselben Fermentmenge kein wesentliches Ansteigen der Hemmungswirkung des Serums wahrnehmen und sieht den Grund für das Ausbleiben der Bildung des Fermentantikörpers in dem Umstande, daß das Ferment durch Zusammentritt mit dem im Blute zirkulierenden Harnstoff verbraucht wird ohne mit den Zellen in Reaktion zu treten.

i) Anhang (Nukleasen und Produkte der Organautolyse).

Nicht im strengen Sinne des Begriffes als Antigene, wohl aber als fermentartige Substanzen, welchen die Auslösung von Immunreaktionen zugeschrieben werden, mögen hier noch die von Emmerich und Löw aus verschiedenen Bakterienkulturen dargestellten Nukleasen Erwähnung finden.

Zahlreiche Mikroorganismen produzieren Fermente, welche bei genügender Konzentration sowohl die sie sezernierenden Bakterien, als auch andere Bakterien aufzulösen vermögen. Insbesondere löst das Enzym des Bacillus pyocyaneus nach Emmerich und Löw auch Anthrax-, Diphtherie-, Typhus-, Cholera- und Pestbazillen. Die Wirkung der Antikörper und der Immunsera soll nach diesen Autoren im Wesentlichen auf derartige enzymatische Bakterienwirkungen zurückzuführen sein und insbesondere hat das Ferment des Pyocyaneus durch die Darstellung eines kräftig wirkenden Präparates ein theoretisches und neuerdings durch Escherich und Jehle (Anwendung bei Meningitis cerebrospinalis) auch ein gewisses praktisches Interesse erlangt. Nach Emmerich und Löw erfolgt die Darstellung der Pyocyanase aus alten, in einer bestimmten Nährflüssigkeit (Pepton 5,0, Asparagin 2,0, Dikaliumphosphat 2,0, Natriumacetat 5,0, Chlornatrium 2,0, Magnesiumsulfat 0,1 auf 1000) gezüchteten Pyocyaneuskulturen in der Weise, daß nach völliger Neutralisierung der alkalischen Flüssigkeit dieselbe im Vakuum bei 25—30° auf etwa $^1/_{10}$ des ursprünglichen Volumens eingedampft, dann einen Tag im fließenden Wasser dialysiert und hierauf durch Chamberland- oder Berkefeldfilter filtriert wird.

Diese konzentrierte Lösung kann entweder direkt verwendet oder durch Fällung mit Alkohol nach Zusatz von Dextrin in fester, haltbarer Form gewonnen werden. Um aus dieser Pyocyanase genannten Nuklease einen immunisierenden Körper zu erhalten, ist es nach den Autoren nötig, dieselbe mit einem Eiweißkörper zu einem größeren Komplex zu verbinden, welcher der Zerstörung im Tier besser widersteht. Hierzu eignen sich am besten Eiweißkörper aus einem frisch getöteten Tiere (Blut, Milz), welche nach Zugabe von 0,1—0,3% Ätzkali oder kohlensaurem Kalium unter aseptischen Kautelen mit der Ezymlösung einige

Stunden bei 37° C digeriert werden. Diese so erhaltenen Verbindungen werden Immunproteidine genannt und Emmerich und Löw unterscheiden je nach der Herkunft Pyocyanaseimmunproteidin, Typhaseimmunproteidin, Diphtheraseimmunproteidin usw. Im Immunserum sollen diese Verbindungen gelöst sein.

Es ergab sich bei einschlägigen Versuchen, daß Kaninchen, welche vor 12 Tagen mit Pyocyanaseimmunproteidin geimpft worden waren, die vieltausendfache tötliche Dosis virulenter Milzbrandbazillen vertrugen. Das Immunproteidin wirkt besser bei Luftabschluß als bei Luftzutritt, ist hitzebeständig und verträgt zweistündiges Verweilen im strömenden Dampf. Je nachdem die Nuklease spezifisch auf die eigene Bakterienart oder auf eine fremde einwirkt, wird sie als homöoforme oder heteroforme Nuklease bezeichnet. Auf die vielfach den Befunden von Emmerich und Löw widersprechenden Angaben anderer Autoren kann hier nicht eingegangen werden. (Siehe Dietrich, Klimoff, Petrie).

Die Darstellung bakterizider und antitoxischer Körper durch autolytische Fermentprozesse studierten Conradi und L. Blum im Institute Hofmeisters. Während Preßsäfte der Organe mit Ausnahme von Lymphdrüsen keine bakteriziden Eigenschaften aufwiesen, zeigte sich nach Conradi die aseptische und antiseptische Autolyse von Leber, Hoden, Thymus, Nebennieren, insbesondere von Muskeln, Lymphdrüsen, Milz befähigt, stark bakterizid wirkende Flüssigkeiten zu liefern. Der bei der Autolyse gebildete bakterizide Stoff ist hitzebeständig, passiert ungeschwächt Tonkerzen, diffundiert und ist alkohollöslich und ätherunlöslich. Die alkoholische Lösung läßt beim Stehen einen kristallinischen Niederschlag sich absetzen, gibt mit Bromdämpfen oder mit Phosphorwolframsäure einen Niederschlag und zeigt die Millonsche und Xanthoproteinreaktion, so daß wahrscheinlich ein hydrolytisches Spaltungsprodukt der Proteinsubstanzen vorliegt, welches zu dem aromatischen Komplex des Eiweißmoleküls in Beziehung steht.

L. Blum, prüfte im Anschlusse an Conradis Untersuchungen die Entstehung antitoxischer Stoffe bei der Organautolyse auf Tetanus-, Diphtherietoxin und Kobragift. Er setzte insbesondere die lymphatischen Organe: Lymphdrüse, Milz und Thymus vom Rind, Pferd und Hund der antiseptischen Autolyse aus und fand, daß nur die Autolyse von Rinderlymphdrüsen Gegengifte gegen Tetanustoxin liefert. Dabei treten die autolytischen Antikörper bereits nach 36tägiger Autodigestion auf und nehmen bei längerer Dauer (bis zu 1 Jahr) bedeutend zu. Die aus frischen Organen hergestellten Preßsäfte haben keine antitoxische Wirkung. Diese durch Autolyse entstehenden antitoxischen Stoffen lassen sich nur zum Teile durch Chamberlandkerzen filtrieren, werden bei der Koagulationstemperatur der sie begleitenden Eiweißkörper unwirksam, vertragen jedoch kürzere Einwirkung verdünnter Säuren und Alkalien. Unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt sind sie durch einen Monat und länger haltbar. Die wirksame Substanz läßt sich nicht mit Alkohol und mit Alkoholäther ausfällen, wohl aber teilweise mit Ammonsulfat aussalzen. Durch Trypsinverdauung wird die Substanz zerstört.

II. Chemische und physikalische Methoden der Reinigung und Isolierung der Antigene.

Bereits in den früheren Kapiteln wurden bei den verschiedenartigsten Antigenen neben den für die Gewinnung und Darstellung ein-

geschlagenen Methoden auch vielfach die Verfahren angeführt, nach denen diese Antigene gereinigt worden waren, weil die dabei eingeschlagenen Methoden in den meisten Fällen auch für die physiologische Wirkung der gewonnenen Präparate von maßgebendem Einflusse sind.

Nirgends beeinflussen die verwendeten chemischen oder physikalischen Methoden die physiologischen Wirkungen so sehr, wie bei den Antigenen, deren Wirkungen durch die Beziehungen zu den verschiedenartigsten Zellen des tierischen Organismus und durch die große Empfindlichkeit der von ihnen ausgelösten Reaktionen am anschaulichsten die von dem Antigen durchgemachten Eingriffe wiederspiegeln. Ein klassisches Beispiel dieser Art liefern die Präzipitinogene, deren Beeinflussung durch die mannigfachsten Eingriffe die Untersuchungen von Obermayer und Pick erwiesen haben. In dem folgenden handelt es sich darum, diejenigen Methoden anzuführen, welche bisher zur chemischen Charakterisierung der einzelnen Antigene benützt worden waren, was am zweckmäßigsten durch Anführung der einzelnen Isolierungsversuche, welche zur Reindarstellung der wirksamen Prinzipien von verschiedenen Autoren unternommen worden waren, durchgeführt werden kann. Wir werden daher neben den bereits früher bei der Gewinnung der einzelnen Antigene besprochenen Methoden hier zusammenfassend anzuführen haben:

A. Die Fällungs- und Isolierungsmethoden;
B. Die Dialyse;
C. Die Konzentrationsmethoden und endlich
D. Die Konservierungsmethoden.

A. Fällungs- und Isolierungsmethoden der Antigene.

1. Fällung durch Neutralsalze.

Die vorwiegend oder ausschließlich kolloidale Natur der Antigene einerseits und ihre Labilität gegenüber zahlreichen Reagentien anderseits bestimmten von vornherein die Auswahl der Fällungsmittel und da waren es vor allem die verschiedenen Neutralsalze, wie Kochsalz, Magnesiumsulfat, Natriumsulfat und Ammoniumsulfat, welche bei der Ausfällung der verschiedenartigsten Antigene die häufigste Verwendung gefunden haben. Da es sich dabei um Aussalzungsverfahren ohne jeden tiefer gehenden chemischen Eingriff handelt, so gehören diese Verfahren zu den schonendsten der Antigendarstellung, vorausgesetzt, daß die Lösungen der Salze nicht durch sekundäre Veränderungen während ihrer Bereitung, so durch Dissoziation und Säurebildung, wie dies bei der Bereitung gesättigter Ammonsulfatlösungen leicht eintreten kann, oder durch Beimengung fremdartiger Bestandteile, so der Kalksalze beim Kochsalz, der Eisen- und Kupfersalze bei den Sulfaten, einen schädigenden Einfluß auf die labileren Antigene ausüben, ein Übelstand, der jedoch leicht vermieden werden kann. Trotzdem findet man Angaben in der Literatur, daß unter Umständen selbst Neutralsalze auf Antigene bei Konzentrierungsversuchen schädlich wirken. So z. B. geben Grassberger und Schattenfroh an, daß das allerdings sehr empfindliche Rauschbrandgift durch Ausfällen mit schwefelsaurem Ammon stark geschädigt wird. Doch scheint es, daß für das Mißlingen derartiger Aussalzungsversuche weniger das Salz, als vielmehr die besonderen Verhältnisse der Kulturflüssigkeit, wie z. B. das Vorhandensein giftiger nicht mehr aussalzbarer Produkte maßgebend sind.

Die zur Aussalzung durch Neutralsalze nötigen Konzentrationen der Salzlösungen sind in der Regel sehr hohe und man verfährt am sichersten derart, daß man in die betreffenden Giftlösungen die festen, fein gepulverten Salze bis zur vollen Sättigung einträgt, wobei es in der Regel zweckmäßig ist, um eine möglichst vollständige Lösung des eingetragenen festen Salzes zu erzielen, die mit Salz beschickten Lösungen eine zeitlang (mehrere Stunden) bei Brutschranktemperatur stehen zu lassen; auch Schütteln der mit Salz beschickten Lösungen am Schüttelapparate wird zur Unterstützung einer möglichst guten Salzlöslichkeit und Salzsättigung häufig angewandt. Auch dann hat man jedoch nicht immer die Gewähr, insbesondere nicht bei den bakteriellen Toxinen, quantitative Ausbeuten an Gift zu erhalten.

Man kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen nicht ein sicheres Urteil darüber abgeben, ob die Wirkung der Neutralsalze, im speziellen auf die Toxine, ähnlich ist, wie bei der Aussalzung der Eiweißkörper und bestimmten Gesetzmäßigkeiten folgt, oder ob es sich, wie manche Autoren glauben, nur um mechanisches Mitgerissenwerden der an sich nicht aussalzbaren toxischen Produkte durch die ausgefällten Eiweißkörper und deren niedere Abbauprodukte handelt. Der letzteren Ansicht huldigt insbesondere Brieger, der sich mit seinen Mitarbeitern um die chemische Darstellung und Charakterisierung der toxischen Bakterienprodukte, so des Tetanus- und Diphtherietoxins besondere Verdienste erworben hat; diese seine Ansicht stützt sich u. a. auf die Beobachtung, daß gerade giftige Tetanustoxinlösungen häufig die Eigenschaft verlieren, durch Neutralsalze, insbesondere durch das am stärksten fällende Ammonsulfat, welches bereits Tizzoni und Cattani zur Darstellung des Tetanustoxins verwendet haben, ausgesalzen zu werden.

„In dem Maße, wie die Giftigkeit der Tetanuskulturen zunimmt, vermindert sich die Fähigkeit des Ammoniumsulfates das Tetanusgift aus den Kulturfiltraten niederzuschlagen und erlischt diese so schätzbare Eigenschaft des Ammoniumsulfates bei hochgiftigen Kulturen schließlich ganz und gar. Da die Giftbildung nach Brieger und Cohn auf Kosten der Peptone oder richtiger gesagt Albumosen erfolgt, so wird eben mit dem Schwinden der letzteren auch die von der Gegenwart der Albumosen abhängige Niederschlagskraft des Ammoniumsulfats mehr und mehr herabgesetzt werden. Die Entziehung des Tetanusgiftes aus seinen Lösungen wird also durch das niedergerissene Eiweiß rein mechanisch vermittelt, gleichwie bei dem Zusammentreffen von Schwefelsäure und Baryt durch den entstehenden schwefelsauren Baryt etwa noch in Lösung befindlicher salpetersaurer Baryt und selbst Baryumchlorid, an und für sich äußerst leicht lösliche Verbindungen, mit niedergerissen werden und alsdann nur mit großer Mühe oder kaum noch von ihrer unlöslichen Komponente getrennt werden können. Demgemäß wird auch bei eintretendem Mangel an Albumosen das Ammonsulfat als Fällungsmittel schließlich gänzlich versagen.“

Auch die auf andere Weise durch Metallsalzfällungen hergestellten höchst giftigen Tetanustoxinpräparate Briegers erwiesen sich vielfach als durch Ammoniumsulfat nicht mehr aussalzbar. Ähnlich, wenn auch nicht völlig gleich, verhält sich das Diphtherietoxin. Aus eiweißhaltigen Lösungen des Diphtherietoxins ist nach Brieger mittels Ammonsulfats eine viel größere Ausbeute an Gift zu erzielen, als aus Tetanustoxinlösungen, da der Diphtheriebazillus nicht imstande ist, die Albumosen in seinen Kulturen vollständig umzuwandeln. So erhielt Brieger aus

alten Diphtheriekulturen, in denen nur wenig Gift vorhanden war — 0,1 ccm bakterienfreies Filtrat tötete erst innerhalb 48 Stunden ein Meerschweinchen von 500 g — durch Ammonsulfatfällung ein so konzentriertes Gift, daß 0,001 g davon genügten, um den gleichen Effekt hervorzubringen. Da das Diphtheriegift überdies relativ leicht durch Pergament dialysiert, so glaubt Brieger auch bei diesem annehmen zu müssen, daß der Vorgang der Fällung durch irgend ein organisches oder unorganisches Eiweißfällungsmittel nichts anderes darstellt, als das mechanische Mitreißen der Gifte durch den gleichzeitig vorhandenen Eiweißkörper.

Prinzipiell anders als das Tetanusgift und das Diphtheriegift soll sich nach Brieger und Fränkel das Cholera-, Typhusgift und das Gift des Bakterium coli verhalten. So findet Brieger, daß auch das Choleragift aus alten Kulturen, in welche es aus abgestorbenen Bakterienleibern allmählich hineindiffundiert, durch Ammonsulfat nicht ausgeschieden werden kann, wenn die Albumosen darin verschwunden sind. Da die Cholerabakterien die Albumosen mit großer Energie zerstören, so treffe dieses Verhalten in den meisten Fällen zu.

Die hier aufgeworfenen Fragen hängen mit der Eiweißnatur der Gifte und der Antigene innig zusammen. Die bereits in der Einleitung skizzierte Auffassung der Antigene als Adsorptionsverbindungen läßt mir die von Brieger vorgebrachten Tatsachen über die Aussalzbarkeit der Gifte, soweit es sich dabei um Antigene handelt, auch in anderer Weise erklärlich erscheinen und ist durchaus mit der Vorstellung vereinbar, daß wir es bei der Wirkung der Neutralsalze im besonderen und der Eiweißfällungsmittel im allgemeinen mit wirklichen Fällungen dieser kolloidalen giftigen Adsorptionsverbindungen zu tun haben und durchaus nicht mit einem mechanischen Mitreißen der Gifte durch die hervorgebrachten Fällungen.

Daß gewisse Gifte, wie z. B. jene in stark proteolytisch wirkenden Kulturen, so das Tetanustoxin, unter Umständen nicht mit Neutralsalzen aussalzbar werden, beweist ebenso wie das Fehlen gewisser Eiweißreaktionen nichts gegen die Eiweißnatur der durch Neutralsalze aussalzbaren Gifte und auch nicht viel dagegen, daß die nicht aussalzbaren und biuretfreien Toxine eben höhere Spaltungsprodukte der aussalzbaren Toxalbumosen wären, etwa Toxopeptone oder Toxopeptide. Es bleibt ja jedenfalls auffallend, daß es mitunter auch nach Briegers Angaben gelingt, die nicht mehr aussalzbaren Toxine nach Durchführung gewisser Konzentrationsmethoden, wie z. B. durch Versetzen des mit Ammoniumsulfat übersättigten Tetanuskulturfiltrates mit 5%iger Lösung von Aluminiumsulfat, nunmehr und zwar quantitativ mit Ammoniumsulfat auszusalzen. Man kann dann in derartigen konzentrierten Lösungen, wie übereinstimmend zahlreiche Autoren angeben, dann wieder allen Eiweißreaktionen begegnen, welche die nicht konzentrierten Lösungen vermissen lassen. Gegen ein bloß mechanisches Mitreißen der Toxine scheint der Umstand zu sprechen, daß überall dort, wo es sich nicht um eiweißfällende Mittel handelt, sondern um die Erzeugung andersartiger Niederschläge, z. B. durch anorganische Salze, wie etwa Calciumphosphat, die Ausbeute an Gift, eine sehr geringe ist, weshalb auch derartige Darstellungsmethoden in der Praxis auch bald verlassen worden sind. Daß auch bei derartigen Niederschlägen nicht von einem nur mechanischen Mitreißen gesprochen werden kann, sondern vielmehr von Adsorptionserscheinungen, die unter Umständen sogar eine gewisse Spezifizität aufweisen können und mit

Wahrscheinlichkeit auf die kolloidale Natur der betreffenden Giftsubstrate zurückzuführen sind, darauf scheinen die Untersuchungen von Landsteiner und Biltz und ihren Mitarbeitern hinzuweisen.

Indes läßt sich sogar bei manchen Toxinen direkt ein gewisses konstantes Verhältnis gegenüber der Aussalzbarkeit durch Neutralsalze nachweisen, so daß ich der Ansicht hinneige, daß bei einem genaueren Studium der einschlägigen Verhältnisse sich gewisse Gesetzmäßigkeiten zwischen Toxinen und Salzen bezüglich der Fällbarkeit in ähnlicher, wenn auch nicht in ganz gleicher Weise feststellen lassen, wie zwischen Eiweißkörpern und deren komplexen Derivaten und Salzen. Wird z. B. nach den älteren Angaben von Brieger und Fränkel die Diphtheriebouillon bei 30° mit Magnesiumsulfat gesättigt, so scheidet sich ein geringer ungiftiger Niederschlag aus, während aus dem Filtrate durch Ammoniumsulfat oder Natriumsulfat oder durch Alkohol das Gift gefällt werden kann. Wird z. B., was mich auch eigene Versuche lehrten, die Diphtheriebouillon mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Ammonsulfatlösung gefällt, so entsteht ein Niederschlag, der wohl zahlreiche Albumosen enthält, aber nur einen geringen Teil des Diphtheriegiftes; würde es sich um rein mechanisches Mitreißen handeln, so sollte man erwarten, daß gerade die ersten Portionen der fraktionierten Fällung den größten Giftanteil aufweisen, während derselbe erst aus dem Filtrate der Halbsättigung durch Ganzsättigung zu gewinnen ist.

Wenn es auch nicht gelingt, das Gift mit einer bestimmten Salzfraktion abzuscheiden, so darf nicht vergessen werden, daß die Verhältnisse bei der Aussalzung von Toxinen aus einem eiweißhaltigen Milieu viel komplizierter sein können, als die Aussalzung der Eiweißkörper an sich. Denn es ist von vornherein möglich, daß das Toxin bereits in der Zelle mit bestimmten Eiweißkörpern zusammenhängt, durch deren Zerfall in der toxischen Bouillon eben die verschiedenartigsten toxischen Eiweißabbauprodukte entstehen, die sich naturgemäß auch den Salzen und vielleicht auch verschiedenen anderen Agentien gegenüber ungleich verhalten können. Andererseits wissen wir, daß auch Toxine ähnlich wie Fermente, und Dauwes sowie Jacobys neueste Untersuchungen über Adsorption der Fermente durch Kolloide haben uns wichtige Aufklärungen über diese Verhältnisse gebracht, vielfach unter Beibehaltung ihrer toxischen Wirkung — systematische und quantitative Untersuchungen über diesen Punkt stehen allerdings noch aus — von den Kolloiden adsorbiert werden; diese Adsorption, sei es daß sie zu einer chemischen Bindung zwischen Toxin und dem kolloiden Substrat führt, sei es, daß sie auf Grund einer festen Lösung im Sinne des Verteilungsgesetzes erfolgt, kann naturgemäß in einer toxischen Bouillon von den mannigfachsten darin befindlichen kolloidalen Stoffen abhängig sein und diesbezüglich sind ja die schönen Untersuchungen von Michaelis und Rona mit Mastix und Lecithin sowohl in bezug auf die Fermente, wie auch auf Toxine äußerst instruktiv. Es bedarf dabei durchaus nicht erst einer Fällung oder eines festen kolloidalen Substrates, um derartige Bindungen herbeizuführen; dieselben können in der ungefällten Bouillon auftreten und werden dann den Neutralsalzen gegenüber sich durchaus so verhalten, wie die sie bindenden oder adsorbierenden Eiweißkörper, respektive Kolloide. Es wird stets das jeweilige Milieu die Adsorptionsverhältnisse und auch Fällungsverhältnisse bestimmen und wir werden daher auch die mehr oder minder weit vorgeschrittene Proteolyse der Bouillon in diesem Sinne für die leichtere oder schwerere Fällbarkeit der Toxine

durch Neutralsalze verantwortlich machen. Daß es sich bei derartigen Adsorptionen um sehr feste Bindungen handelt, das weiß man aus zahlreichen Beispielen, wie z. B. aus der Adsorption von Pepsin durch Fibrin oder Eiereiweißwürfel u. a. Diese Tatsachen scheinen mir die Anschauung zu stützen, daß wir es bei der Wirkung der Neutralsalze auf die Toxine durchaus nicht um ein mechanisches Niederschlagen der letzteren, sondern um ganz bestimmte gesetzmäßige, freilich komplizierte Erscheinungen zu tun haben, deren Aufklärung von weiteren Studien zu erwarten ist. Ich möchte diesbezüglich auch auf andere Wirkungen der Neutralsalze auf Toxine verweisen, so auf die konservierende und die Resistenz gegen Erwärmen erhöhende Wirkung mancher Salze, wie sie Buchner und Knorr bezüglich der Toxine beobachteten und wie sie neuerdings Ferrata in bezug auf Hämolysine beschrieben hat.

Günstiger als bei den bakteriellen Toxinen scheinen die Verhältnisse für die Möglichkeit einer fraktionierten Aussalzung mit Neutralsalzen bei den verschiedenen Phytotoxinen zu liegen, bei denen es, wie schon die älteren Untersuchungen zeigen (siehe die Kapitel über Crotin, Ricin und Abrin im 1. Teile dieser Abhandlung), leicht gelingt, durch Aussalzen mit Magnesiumsulfat, Natriumsulfat oder Ammoniumsulfat die betreffenden Gifte mit einer bestimmten Eiweißfraktion mehr oder minder quantitativ abzuscheiden. Der Unterschied gegenüber den bakteriellen Toxinen in dem auszusalzenden Milieu ist der, daß die Phytotoxine, sowie auch die Zootoxine, wie das Schlangengift, sich zumeist in Eiweißlösungen finden, welche nicht allein Eiweißabbauprodukte wie Albumosen, Peptone, Peptide und die höheren Spaltungsprodukte enthalten, sondern native Eiweißkörper, wie Globuline und Albumine aufweisen, die mit ihren äußerst scharf abgegrenzten physikalischen Eigenschaften auf die eventuelle Bindung und Abscheidung der toxischen Produkte auch von verschiedenem Einflusse sein werden; so erklären sich die älteren Angaben, welche diese Toxine entweder als Globuline oder Albumine auffassen. Daß derartigen Angaben, falls sie auf Grund sorgfältiger Untersuchungen angestellt sind, eine gewisse Berechtigung nicht abgesprochen werden kann, zeigen die neueren Untersuchungen von Osborne, Mendel und Harris, welche das Ricin auf Grund sorgfältiger Fraktionierungsversuche als Albumin ansprechen.

Bereits Stillmark und Cushny zeigten, daß Ricin quantitativ durch Aussalzen mit Magnesiumsulfat gefällt werden kann, zumal wenn die Lösung, wie es Cushny vornahm, durch 24stündiges Schütteln mit dem Salze vollständig gesättigt wurde; eine Albumose, welche im Filtrate der Magnesiumsulfatfällung durch Salzsäure unvollständig und durch Ammoniumsulfat vollständig gefällt werden kann, erwies sich nach Cushny ungiftig, so daß in der Tat das gesamte Gift der Globulinfraktion angehören sollte. Brieger, der das Mercksche Ricin mit Magnesiumsulfat fraktionierte, wobei er nach dem Aussalzen die Lösungen längere Zeit erst bei Zimmertemperatur, dann bei Bruttemperatur und dann wieder bei Zimmertemperatur stehen ließ, fand im Magnesiumsulfatniederschlag ein Gift, das wohl die für die Ricinvergiftung typischen Blutungen, aber keine sulzige Nekrose des Unterhautzellgewebes erzeugte, während das Filtrat der Magnesiumsulfatfällung ein Gift enthielt, das wieder keine Spur einer Entzündung hervorrief, die Kaninchen jedoch unter starker sulziger Infiltration des Unterhautzellgewebes tötete. Jacoby, der nach dem Muster der Hofmeisterschen Fraktionierungsmethode fraktionierte Fällungsversuche mit Ammonsulfat in systematischer Weise

vornahm, verfuhr folgendermaßen: 0,6 g Merckschen Ricins werden in 75 ccm 10 $^0/_0$ iger Kochsalzlösung und 25 ccm Glyzerin gelöst. 0,85 ccm dieser Lösung töten in 24—36 Stunden 1 kg Kaninchen unter typischen Symptomen. 10 ccm dieser Lösung werden mit gesättigter Ammonsulfatlösung nacheinander auf $^1/_{10}$ Sättigung (Fraktion I), $^6/_{10}$ (Fraktion II) und $^8/_{10}$ (Fraktion III) Salzsättigung gebracht, die erhaltenen Niederschläge durch Zusatz von Wasser mit Hilfe des auf dem Filter verbliebenen Ammonsulfatrestes gelöst, durch erneuten Zusatz der entsprechenden Menge Salzlösung wieder ausgefällt und schließlich in 20 ccm einer Glyzerinkochsalzlösung (10 $^0/_0$) gelöst. Die Prüfung der einzelnen Fraktionen ergab folgendes:

Tabelle 6.

Fraktion I $^1/_{10}$	Fraktion II $^1/_{10}$—$^6/_{10}$	Fraktion III $^6/_{10}$—$^8/_{10}$
5 ccm töten nicht ein 1600 g schweres Kaninchen, also über 3 ccm nicht 1 kg Kaninchen	1 ccm tötete in 24 Stunden ein 1190 g schweres Kaninchen mit typischem Sektionsbefund, also 0,8 ccm sind für 1 kg tötlich	10 ccm bewirken bei einem Kaninchen von 1662 g nur lokale Reizung.

Es ist daher bei weitem der größte Teil des Giftes in die Fraktion II $^1/_{10}$—$^6/_{10}$ gegangen, welche Fraktion stärker wirksam ist, als theoretisch zu erwarten war, während die beiden anderen Fraktionen nur Spuren des Giftes enthalten. Die so mit Ammonsulfatfällung gefundene Grenze entspricht ungefähr der durch das Magnesiumsulfat nach Stillmark und Cushny erzielten Fällbarkeit.

Eine andere Art der Fraktionierung, die unter Umständen bei der Isolierung und Reinigung von Giften gute Dienste leistet, ist die Sättigung der toxinhaltigen Flüssigkeit mit Kochsalz bei schwach saurer Lösung, wodurch häufig ein Teil der ungiftigen Eiweißkörper entfernt wird, und die nachherige Fällung des giftigen Filtrates mit Magnesium oder Ammoniumsulfat.

Zu erwähnen bliebe, daß auch Antigene, denen nicht ein direkter Toxincharakter zukommt, wie das Tuberkulin, auf dem Wege des Aussalzungsverfahrens einer Reinigung unterzogen wurden. So hat Hahn den wirksamen Stoff des Kochschen Tuberkulins derart zu isolieren versucht, daß er die wässerigen Lösungen der Kochschen Lymphe, wie auch das gereinigte Tuberkulin nach Klebs nach vorhergehender Neutralisation mit Ammoniumsulfat fällte. Der wirksame Körper fällt in Form eines flockigen, weißgelben Niederschlages aus, der typische Albumosenreaktionen gibt. Diese Albumosen sieht Hahn als Träger der spezifischen Wirksamkeit an. Kühne, der sich im Anschluß an seine Albumosenstudien mit der chemischen Darstellung der wirksamen Substanz aus dem Kochschen Tuberkulin ebenfalls beschäftigte, fand durch fraktionierte Fällung des Rohtuberkulins in demselben: 1. ein Albuminat; 2. eine eigentümliche mit Essigsäure fällbare Albumose (Acroalbumose); 3. eine mit Ammonsulfat fällbare Deuteroalbumose und 4. Spuren von Pepton. Die ersten drei Stoffe wirken wie das Tuberkulin temperaturerhöhend bei tuberkulösen Meerschweinchen; da indes auch die sterile Kulturflüssigkeit Kochs nahezu dieselben Eiweißkörper enthielt und da die Züchtung der Tuberkelbazillen auf proteinfreien Nährlösungen (außer

anorganischen Salzen enthielten dieselben Glyzerin, Leucin, Tyrosin, Asparagin, schleimsauren NH_3 und Taurin) wirksame Tuberkulinpräparate ergab, welche keine Albumosen und Peptone und nur Spuren eines Albuminstoffes aufwiesen, so glaubt Kühne, daß die wirksame Substanz diesen Produkten lediglich anhaftet und die Albumosen nur eigentümlich begünstigte Träger der gesuchten Substanz seien.

2. Fällung mit Alkohol.

Neben den Neutralsalzen fand, zumal in den älteren Arbeiten, Alkohol als Fällungsmittel der toxinhaltigen Eiweißkörper vielfache Anwendung, insbesondere zum Zwecke der Konzentrierung. Auch die Alkoholfällung ist eine Eiweißfällung, die jedoch viel eingreifender ist, als die Aussalzungsmethoden, da sie Zustandsänderungen der Eiweißkörper schafft, die bei längerer Einwirkung des Alkohols nicht mehr reversibel bleiben, wodurch die physiologischen Wirkungen der alkoholbehandelten Körper dann bedeutend abgeschwächt werden. Es ist daher bei derartigen Alkoholfällungen stets nötig, daß die betreffenden Substanzen wieder so rasch als möglich der Einwirkung des Alkohols entzogen werden.

Die Alkoholfällung wurde des öfteren auch mit der Fällung mit Neutralsalzen kombiniert, wie z. B. in den älteren Darstellungsverfahren der Toxalbumine von Brieger, Fränkel, Wassermann und Proskauer, die weiter unten angeführt sind. Koch verwendete die Alkoholfällung zur Reinigung seines Tuberkulins, indem er drei Teile 60%igen Alkohols zu zwei Teilen Tuberkulin zusetzte, der entstandene dekantierte Niederschlag wurde wiederholt mit 60%igem Alkohol und endlich mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das erhaltene Präparat war in Wasser leicht löslich, jedoch verlor es mit der Zeit seine Wirksamkeit; auch dieses Präparat wies die typischen Albumosenreaktionen auf. Dixson wandte die fraktionierte Fällung mit Alkohol behufs Reinigung des Ricins an und fand, daß jeder mit Alkohol erzeugte Niederschlag der Ricinlösungen Eiweiß enthielt und giftig war. Die erhaltenen Niederschläge sind weder in Wasser, noch in Kochsalzlösung wieder vollständig löslich; dieses Verhalten wiederholt sich bei jeder Fällung, bis am Ende sehr wenig lösliche Substanz übrig bleibt. Das Gift scheint diesen Angaben entsprechend dieselbe Löslichkeit in Alkohol zu haben, wie das Ricinuseiweiß.

Darstellung der Toxalbumine nach BRIEGER und FRÄNKEL, WASSERMANN und PROSKAUER.

Die älteste Darstellung des spezifischen toxischen Prinzips der Bakterienkulturen verdanken wir Brieger und Fränkel, welche in ihren ursprünglich an die Ptomainstudien Briegers angeschlossenen Untersuchungen über Bakteriengifte die Fällungen mit Neutralsalzen kombiniert mit der Alkoholfällung zum erstenmal für eine nähere chemische Charakterisierung dieser Körper anzuwenden versuchten.

Die von diesen Autoren angewandte Methode bestand zunächst darin, daß die durch Chamberlandfilter filtrierten Diphtheriekulturen durch Übersättigung von Ammoniumsulfat oder Natriumsulfat gefällt und die Niederschläge salzfrei dialysiert worden sind; aus der salzfreien Lösung läßt sich durch Fällung mit Alkohol, wobei die Flüssigkeit tropfenweise in absoluten Alkohol eingegossen wird, ein weißlichgrauer Niederschlag

gewinnen, welcher sich nach Zusatz von Essigsäure absetzt und abfiltriert wird; derselbe wird durch Lösen in Wasser und abermaliges Fällen mit Alkohol, welche Prozedur öfters wiederholt wird, gereinigt. Endlich wird die Substanz bei 40° im Vakuum getrocknet. Bei der Aussalzung der Diphtherie, wie Tetanuskulturen mit Ammoniumsulfat gingen die Autoren in der Weise vor, daß sie diese Operation in Erlenmayerschen Kolben ausführten. Bei voller Sättigung der Flüssigkeit mit dem Salze steigt das ausgefällte Gift mit den Albumosen an die Oberfläche und kann dann von dem bis zum Rande gefüllten Kolben leicht mit einem Platinspatel abgeschöpft werden. Durch Aufstreichen auf Tonteller wird die anhaftende Flüssigkeit entfernt, so daß die Gefahr der Ammonsulfatvergiftung der Versuchstiere nicht zu befürchten steht. Derartiges Rohgift im Vakuum getrocknet, enthält noch ca. 6,5% Ammoniumsulfat und soll die gesamte in der Tetanusbouillon befindliche Giftmenge quantitativ umfassen. Die so dargestellte Giftsubstanz bildete für die weiteren tiefer unten noch zu bespsrechenden Reinigungsmethoden Briegers und seiner Mitarbeiter G. Cohn und Boer das Ausgangsmaterial.

Eine andere von Brieger und Fränkel ebenfalls angewandte Darstellungsmethode des Diphtheriegiftes beruhte im Eindampfen der Bakterienfiltrate bei 30° auf ein Drittel und im Zusatz der zehnfachen Menge absoluten Alkohols und einiger Tropfen Essigsäure. Nach 12stündigem Stehen im Eisschrank wird der Niederschlag filtriert, durch sechs- bis achtmaliges Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol gereinigt, die Lösung dialysiert und im Vakuum bei 40° getrocknet. Man erhält eine schneeweiße, amorphe, krümelige, sehr leichte, in Wasser leicht lösliche, in Alkohol unlösliche Masse, welche nicht ausgeschieden wird durch Kochen, Natriumsulfat, Kochsalz, Magnesiumsulfat, Salpetersäure, verdünntes Bleiacetat, wohl aber durch Kohlensäure in gesättigter Lösung, konzentrierte Mineralsäuren, gelbes Blutlaugensalz und Essigsäure, Phenol, organische Säuren (der Niederschlag ist im Überschuß löslich), Kupfersulfat, Silbernitrat, Quecksilberchlorid. Positiv sind naturgemäß auch die Eiweißreaktionen mit Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid, Kaliumwismutjodid, Pikrinsäure ebenso wie die Biuretreaktion, die Millonsche und Xanthoproteinreaktion. Mit Gold- und Platinchlorid erhält man ebenfalls Fällungen; das erhaltene Produkt gibt eine Verbindung mit Benzoylchlorid, keine aber mit Phenylhydrazin. Die Lösungen ergaben beim Polarisieren eine Linksdrehung. Auf Grund des chemischen Verhaltens steht das von den Autoren erhaltene Produkt in Verwandtschaft mit den Albumosen und Peptonen. 2,5 mg des Diphtherie-Trockenpräparates stellten pro Kilogramm Tier eine sicher tödliche Dosis dar. Ähnliche Produkte konnten die Autoren aus Tetanus-, Typhus-, Cholerakulturen, sowie aus Kulturen des Staphylococcus pyog. aur. darstellen, ebenso auch aus wässerigen Extrakten von Milzbrandorganen. Die aus Typhus-, Cholera- und Staphylokokkenkulturen erhaltenen giftigen Eiweißkörper sind jedoch schwer löslich, respektive unlöslich in Wasser und sollen eher den Globulinen als den Albumosen näher stehen.

Dieses Verfahren von Brieger und Fränkel haben Wassermann und Proskauer in der Weise modifiziert, daß sie das keimfreie, durch Zusatz von 10—12 ccm Normalnatronlauge alkalisch gemachte Filtrat im Vakuum bei 27—30° auf ein Zehntel seines Volumens eindampften und zur Entfernung dialysabler Salze und Peptone und Fällung der Globuline gegen fließendes Wasser dialysierten. Die im Dialysator zurückbleibende Flüssigkeit wurde klar filtriert und mit der zehnfachen Menge 60 bis

70%igen Alkohols, welcher mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt worden war, gefällt. Der abgesetzte Niederschlag wird nach 24 Stunden abfiltriert und der ablaufende Alkohol in absoluten Alkohol fließen gelassen, wobei ein weiterer Niederschlag entsteht. Beide Niederschläge werden getrennt behandelt, indem sie zunächst in wenig Wasser gelöst und hierauf mit der doppelten Menge Ammoniumsulfatlösung gefällt werden; die ausgefallenen Albumosen werden wieder in Wasser gelöst, salzfrei dialysiert und hierauf abermals mit Alkohol gefällt. Die Fällung mit Alkohol und das Lösen des Niederschlages in Wasser wird so oft wiederholt, bis die erhaltene Lösung völlig klar ist.

Die auf diesem Wege gewonnenen Präparate zeigten, wie jene von Brieger und Fränkel alle Albumosenreaktionen. Doch zeigte sich, daß nur der mit verdünntem Alkohol gefällte Körper giftig war, während der durch Fällung mit absolutem Alkohol gewonnene keine Giftigkeit aufwies. Der gleichen Methodik bedienten sich Wassermann und Proskauer auch bei der Verarbeitung von Organen, aus denen „Toxalbumine“ dargestellt werden sollten. (Näheres siehe im 1. Teile dieser Abhandlung).

3. Fällung mit Metallsalzen.

Die Fällung und Reinigung der Toxine mit Metallsalzen, insbesondere mit den Salzen der Schwermetalle wurde vor Allem von Brieger und seinen Mitarbeitern in mühevollen Untersuchungen versucht. Das Prinzip der Fällung besteht vielfach darin, daß die erzeugten Fällungen, welche nach Brieger Doppelverbindungen der betreffenden Metallsalze mit den Toxinen darstellen, durch Alkalisalze oder falls es sich um resistentere Gifte, wie z. B. das Schlangengift handelt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt werden, wodurch die gereinigten Toxine in Freiheit gesetzt werden.

Von den Metallsalzen lieferte zunächst Quecksilberchlorid, selbst bei vorsichtiger Fällung, wie auch Schütteln mit Zinkstaub, welcher nach Kobert die Eiweißkörper entfernen soll, kein günstiges Resultat, da die Verunreinigungen keineswegs weggeschafft und die Giftwirkungen ganz erheblich abgeschwächt werden. Wenig zweckentsprechend erwiesen sich auch mit Ausnahme des Aluminiumhydroxyds die Hydroxyde, welche in statu nascendi angewendet, das Toxin, speziell das Tetanustoxin, infolge der alkalischen Reaktion rasch zerstören. Dagegen leistete das Uranacetat vermöge seiner Neigung, sich mit anderen Stoffen sehr leicht zu Doppelverbindungen zu paaren, bei der Fällung des Tetanustoxins gute Dienste; doch ist es schwierig, den Niederschlag zu zerlegen. Schütteln mit Wasser, selbst wenn es schwach sauer oder alkalisch ist, vermag weder den nassen, noch den getrockneten Niederschlag zu zerlegen; nur durch Anwendung einer 5%igen Lösung von metaphosphorsaurem Natron ist man imstande, das Tetanusgift wieder zu isolieren, welches jedoch nach dieser Methode gewonnen, in seiner Wirksamkeit eine ziemliche Einbuße erleidet; es zeigt auch noch die Biuretreaktion, ist aber durch Ammoniumsulfat nicht mehr fällbar.

Auch Alaunlösungen verwandte Brieger zur Reinigung von Toxinpräparaten; die mit Hilfe sehr verdünnter Alaunlösungen hergestellten Fällungen ergaben Flüssigkeiten, aus welchen in dem vom Alaunlack befreiten, wasserklaren Filtrat Ammonsulfat eine Substanz ausschied, welche salzfrei gemacht, die Biuretreaktion öfters nicht gab, obwohl die Giftigkeit, wenn auch abgeschwächt, fortbestand. Wie bereits früher er-

wähnt, eignet sich für die Ausfällung von Gift, das mit Ammoniumsulfat nicht mehr aussalzbar ist, Aluminiumsulfat, das in 5%iger Lösung aus dem ammonsulfatgesättigten Filtrat das Gift ausfällt. Die Ausbeute an Gift ist dabei zufriedenstellend, wenn man den auf Ton abgesaugten und gut getrockneten Niederschlag mit Wasser extrahiert, dialysiert und in vacuo eindampft. Häufig fällt nach Brieger das Gift aus solchen Lösungen wiederum durch Ammonsulfat quantitativ aus.

Reindarstellung der Toxine nach Brieger und Brieger und Cohn.

Zur Ausfällung des Tetanusgiftes aus hochgiftigen Kulturen eignet sich sehr gut das neutrale Bleiacetat und zwar genügen ca. 5 g davon, um 100 ccm einer Kultur nach tüchtigem Schütteln das gesamte Gift zu entziehen. Nach Auswaschen des Niederschlages, wobei Spuren von Gift verloren gehen, wird aus demselben vorteilhaft durch Schütteln mit schwefelsaurem Natron das Tetanustoxin in Freiheit gesetzt. Schütteln des Bleiniederschlags mit ein wenig Ammoniak isoliert zwar auch das Tetanustoxin, schädigt aber dasselbe sehr in seiner Wirksamkeit.

Brieger und Cohn benützten zur Reinigung des durch Ammonsulfatsättigung ausgefällten Giftes die Fällung mit basischem Bleiacetat unter Zusatz minimaler Mengen von Ammoniak. Es gelingt auf diese Weise die Eiweißstoffe zu entfernen, ohne die Giftigkeit herabzusetzen; indes kann man Mißerfolge manchmal deshalb nicht vermeiden, da sowohl bei einem Überschusse als auch bei einem zu geringen Zusatze an Blei Eiweiß in Lösung gehalten wird. Die weitere Reinigung geschah durch 24—48stündige Dialyse, an welche sich Eindampfen im Vakuum bei 20—22° C anschloß. Die Versuche, das dialysierte Gift durch absoluten Alkohol auszufällen, versagten häufig, da sich dann eine weißlich opaleszierende Lösung ergab, aus der weder durch Säure oder Kochsalz, noch durch Äther oder Aceton eine Wiederabscheidung erfolgte. Das gereinigte Gift, das sich in gelblichen, durchsichtigen Häutchen, die sich in Wasser lösen, abscheidet, gibt keine Millonsche, keine Xanthoproteinreaktion, dagegen eine, wenn auch schwache Biuretreaktion. Die Lösungen drehen schwach nach links.

Mit Ausnahme des Ammoniumsulfats fällen dieses gut gereinigte Tetanusgift nicht die anderen Mittelsalze, wie Kochsalz, Natriumsulfat, Magnesiumsulfat, sowie die charakteristischen Eiweißfällungsmittel, wie Essigsäure und Ferrocyankalium, Salpetersäure und Quecksilberchlorid. Auch das Calciumphosphat, welches Roux und Yersin bei der Darstellung des Diphtheriegiftes mit Erfolg benützten, sowie kohlensaure Magnesia, Aluminiumhydroxyd, wenn auch wiederholt damit geschüttelt wurde, reißen das gereinigte Tetanusgift aus seinen Lösungen nicht nieder. Das Gift enthält keinen Phosphor und bei entsprechender Reinigung von Ammoniumsulfat nur noch unwägbare Spuren von Schwefel. Die kräftigsten so gereinigten Gifte töteten in subkutanen Gaben von 0,00000005 g eine Maus von 15 g. Das feste Gift geht bei längerer Aufbewahrung selbst bei Abhaltung von Luft, Licht und Feuchtigkeit leicht zugrunde und wird auch durch verdünnten Alkohol, nicht aber durch absoluten Alkohol, Chloroform, Aceton, wasserfreien Äther zerstört. Die wässerigen Lösungen des gereinigten Giftes, welche bei Erhitzen nicht koaguliert werden, werden schon durch sehr geringe Mengen von Säuren und Al-

kalien, selbst durch länger dauerndes Durchleiten von Kohlensäure stark geschädigt. Durchleiten von Sauerstoff übt keinerlei schädliche Folgen aus, dagegen zerstört ein Durchleiten von Schwefelwasserstoff rasch das Gift.

Reindarstellung der Toxine nach BRIEGER und BOER.

Eine bessere Reinigung der Toxine von den Eiweißkörpern als durch die Anwendung von Bleisalzen ist später BRIEGER nnd BOER mit Hilfe von Zink- und Quecksilbersalzen gelungen, eine Methode, die zunächst für die Darstellung eiweißfreier Antitoxine angewendet worden war.

Versetzt man filtrierte Diphtherie- oder Tetanusbouillon mit Quecksilberchlorid, Zinksulfat oder noch besser mit Zinkchlorid, so wird das Tetanustoxin und Diphtherietoxin quantitativ ausgefällt. Da diese Niederschläge im Wasser gänzlich unlöslich sind, so können sie sorgfältig ausgewaschen werden; nur durch Lösen dieser gereinigten Doppelverbindungen in kochsalzhaltigem oder schwach alkalischem Wasser kann man sich davon überzeugen, daß in den Niederschlägen die Toxine quantitativ vorhanden sind. Versucht man durch Einleiten von CO_2 in die durch Alkali gelösten Zinktoxine das Zink zu entfernen, so verbleibt das Toxin stets beim Zink; Schwefelwasserstoff ist nicht anwendbar, da derselbe die Toxine vernichtet. Eine Sprengung der Zinkverbindung läßt sich nur durch Natriumphosphat, Ammoniumphosphat und Ammoniumbikarbonat bewerkstelligen; erst dadurch wird das Tetanus- oder Diphtherietoxin in Freiheit gesetzt. Das Verfahren der Reindarstellung gestaltet sich folgendermaßen:

Die auf einem geeigneten Nährboden — BRIEGER und BOER benützten eiweißfreien, dialysierten Menschenurin — gezüchteten Diphtheriebazillen werden von der Nährflüssigkeit abfiltriert und mit dem doppelten Volumen 1 %iger Zinkchloridlösung gefällt; der gewaschene Niederschlag wird mit 3—6 %iger Ammoniumbikarbonatlösung geschüttelt, worauf soviel Ammoniumphosphat hinzugefügt wird, bis der ganze Niederschlag in Lösung geht und durch ausgefallenes Zinkphospat eine Trübung bleibt. Diese wird durch gehärtete Filter abfiltriert und das Filtrat mit Ammoniumsulfat gesättigt; aus der Lösung dieses Niederschlags können die noch etwa mit dem Toxin niedergerissenen Peptone durch Schütteln mit Natriumsulfat eliminiert werden; dieselben gehen in das Filtrat des Natriumsulfatniederschlages über. Das so dargestellte Toxin ist sehr empfindlich gegen Säure, Alkohol, Äther, Aceton, Oxydationsmittel, dagegen widerstandsfähig gegen schwache Alkalien und Reduktionsmittel. Die Zinkverbindungen werden nur durch Kohlensäure, nicht durch Mineralsäuren, nicht durch Neutralsalze z. B. Ammoniumsulfat, nicht durch Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure gefällt und geben weder Biuret-, Xanthoprotein-, MILLONsche-, ADAMKIEWICZsche Reaktion; auch bei der Polarisation ergaben sie einen negativen Befund; nur beim Kochen mit Eisenchlorid entsteht eine deutliche Rotfärbung, ein Hinweis auf die Anwesenheit von Amidosäuren.

Bei der Darstellung des Tetanustoxins empfiehlt es sich nach BRIEGER und BOER das Gift zunächst mit Ammoniumsulfat zu fällen, das wiedergelöste Toxin durch schwache Sublimatlösung niederzuschlagen und diese Fällung erst durch Behandlung mit Ammoniumbikarbonat in der oben beim Diptherietoxin geschilderten Weise weiter zu verarbeiten. Ein Liter Diphtherie- oder Tetanusbouillon geben ca. 3,0 g

getrockneter Zinkdoppelverbindung, die nur ca. 0,3 g organischer Substanz enthält, welche die Gesamtmenge der Toxine umfaßt.

Um von vornherein möglichst wenig Eiweißkörper aus der zu verarbeitenden Giftlösung entfernen zu müssen, wurde von Brieger nach dem Vorgange von Guinochet und von Ouchinsky auch die Benützung von eiweißfreien Bakterien-Nährböden versucht. Der vom letzteren Autor für diese Zwecke angegebenen Nährboden, den auch Kühne mit einiger Modifikation für die Tuberkelbazillenkulturen zu gleichen Zwecken benützte, ist auf Nägelis Nährlösungen zurückzuführen und ist folgendermaßen zusammengesetzt:

Wasser	1000	Teile	Magnesiumsulfat	0,2—0,4	Teile
Glyzerin	30—40	„	Dikaliumphophat	2—2,5	„
Chlornatrium	5—7	„	Ammoniumlaktat	6—7—10	„
Chlorcalcium	0,1	„	Asparaginsaures Natrium	3—4.	„

Während Tetanusbazillen auf diesem Nährboden nach Brieger und Boer nicht ohne weiteres gedeihen, konnten Cholerabakterien auch dann recht gut wachsen, wenn Magnesiumsulfat weggelassen wurde. Das Gift ist zwar viel schwächer, als das aus eiweißhaltigem Nährboden gewonnene Choleragift, erweist sich aber als absolut frei von Schwefel, zeigt keine Biuretreaktion und ist optisch inaktiv. Ouchinsky, der sowohl Diphtherie, Cholera als auch Tetanus — diesen nach Zusatz von 1—2 % Traubenzucker — und Schweinerotlauf in derartigen Lösungen kultivierte, gewann Gifte, welche durchaus schwächer waren, als die in Peptonbouillon gebildeten; dieselben wurden von ihm als Produkte der durch die Mikroorganismen ausgeführten Synthese angesehen. Das so gewonnene Diphtherie- und Choleragift ist im 45—55 %igen Alkohol löslich; das Diphtheriegift wird erst durch Alkohol von 70—80° völlig ausgefällt, ebenso auch durch Sublimat, Bleiacetat. In Anbetracht dieser Fällbarkeit, sowie der Farbenreaktionen zählt Ouchinsky diese Gifte zu den aus der Bakterienzelle stammenden Proteinkörpern und zwar zu den Albumosen und Peptonen.

Guinochets Verfahren beruht auf der Beobachtung von D'Espine und Marignac, daß Diphtheriebazillen in Urin gezüchtet werden können; der Urin nimmt giftige Eigenschaften an, doch wirkt auch hier das Gift schwächer, als eine zur Kultur verwendete Bouillon. Guinochet konnte in dem diphtherietoxinhaltigen Urin keine Eiweißkörper nachweisen. Nach den bereits eingangs (s. pag. 335) erwähnten Versuchen von Zinno genügen jedoch äußerst geringe Eiweißmengen, so z. B. das durch den Zerfall der Bakterienleiber frei gewordene Eiweiß, um die Giftproduktion, welche nach Zinno ohne Eiweiß in nennenswerter Menge nicht stattfindet, zu ermöglichen.

Reindarstellung des Tetanustoxins nach Hayashi.

Eine Modifikation des Verfahrens nach Brieger und Boer hat Hayashi in folgender Weise für das Tetanustoxin ausgearbeitet: Die filtrierte Kultur, gezüchtet in karbonatreicher Bouillon, wird mit der halben bis doppelten Menge 1 %iger Zinkchloridlösung versetzt; es bildet sich eine Doppelverbindung, wahrscheinlich eine Zinkkarbonoalbumosat, die ausfällt und das gesamte Gift enthält.

Dieser Niederschlag wird in Wasser suspendiert, hierauf wird Ammonsulfat bis zur Sättigung eingetragen und auf diese Weise einerseits

die Doppelverbindung zerlegt, andererseits das Gift ausgesalzen. Nach Dialyse wird die Lösung des Giftes mit dem gleichen Volumen 0,5 %iger Sublimatlösung gefällt, der Niederschlag abfiltriert, gewaschen, mit 3 %iger Ammoniumbikarbonatlösung gelöst und mit Ammonsulfat abermals zerlegt. Das so freigemachte Gift gibt Eiweißreaktionen; es fehlt nach Hayashi völlig der Beweis, daß das Gift nicht zu den Proteinstoffen gehöre. Magnesiumsulfatsättigung fällt das Gift nur teilweise, Alkoholfällung ruft keine Veränderung weder der toxischen, noch der physikalischen Eigenschaften hervor. Durch Halbsättigung mit Ammonsulfat ist das Gift, wie die primären Albumosen fällbar, so daß Hayashi das Gift zu den primären Albumosen zählt. Selbst aus eiweißarmer und an primären Albumosen armer Bouillon erhält man eine ziemlich gute Tetanuskultur, in welcher die gesamte Giftmenge durch basisches Zinkkarbonat oder durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbar ist.

Isolierung der Toxalbumine nach KOBERT.

Diese Methode wurde von Kobert zum Zwecke der Prüfung von Blut, das eventuell bei der Sektion aus dem Herzen oder den großen Gefäßen gewonnen werden kann, auf Toxalbumine und andere Gifte vorgeschlagen. Zu diesem Behufe schüttelt man das mindestens dreifach mit destilliertem Wasser verdünnte, an sich neutrale oder neutralisierte Blut energisch mit einem Viertel seines Gewichtes Zinkstaub, bis der Blutfarbstoff sich mit Zink verbunden hat, und filtriert; der Filterrückstand wird mit destilliertem Wasser gewaschen. Das von Blutfarbstoff freie Filtrat enthält u. a. Toxalbumine, Alkaloide und Glykoside und kann sofort nach Abscheidung des gelösten, an Menge stets unbedeutenden Zinks probeweise einem Tiere ins Blut gespritzt werden. Treten dabei schwere Vergiftungserscheinungen auf, so fällt man aus einer weiteren Probe die vorhandenen Eiweißstoffe mittels eben hinreichender Mengen von Ferrocyankalium und Essigsäure aus, filtriert wieder und spritzt vom neutralisierten Filtrat einem zweiten Versuchstiere ein. Bleibt dieses gesund, so ist nach Kobert der Verdacht begründet, daß das erste Tier durch ein im Blut vorhandenes Toxalbumin erkrankt ist. Erkrankt das zweite Tier in gleicher Weise wie das erste, so liegt kein Toxalbumin vor. Die Methode der Zinkfällung ist unanwendbar, wenn im Blute Methämoglobin vorhanden ist, da dies vom Zink nicht gefällt wird; erst beim Schütteln mit Chloroform wird dasselbe gefällt. Aus dem Filtrate, welches nach der einen oder der anderen Methode von Blutfarbstoff befreit ist, lassen sich die etwa vorhandenen Toxine der Diphtherie, des Tetanus usw. nach Brieger und Boer durch Chlorzink ausfällen. Nach den Erfahrungen von Brieger und Boer besitzt die Methode von Kobert, für die Reindarstellung der Gifte verwendet, den Nachteil, daß sie die Giftwirkung erheblich schwächt, ohne die eiweißhaltigen Verunreinigungen wegzuschaffen.

Verfahren der Toxindarstellung nach E. FREUND.

Dasselbe stellt eine Vervollständiguug des Chlorzinkverfahrens von Brieger und Boer dar. Freund geht in der Weise vor, daß die toxinhaltigen Flüssigkeiten zunächst mit 2 %iger Chlorzinklösung so lange versetzt werden, so lange ein Niederschlag entsteht; dadurch werden Globuline, Albumine und ein Teil der primären Albumosen ausgefällt,

Nach Zersetzung des Niederschlages mit kohlensaurem Natron können die Globuline durch Aluminiumsulfat gefällt und nach Abtrennung durch einen Überschuß an Lauge wieder in Lösung gebracht werden. Im Filtrate vom Chlorzinkniederschlage kann ein weiterer Teil der Albumosen durch Neutralisierung mit Lauge gefällt werden; der letzte Rest der Albumosen wird durch Versetzen mit neutraler Eisenchloridlösung und Neutralisierung derselben unter Zuhilfenahme von kleinen Mengen Zinkkarbonat abgeschieden. Aus allen Niederschlägen läßt sich der Eiweißbestandteil durch geringe Mengen überschüssiger Lauge (0,1—0,2 % Natronlauge) entziehen. Die zur Gruppe der Peptone gehörigen Toxine lassen sich mittels Salzsäure-Jodwismut-Kaliumlösung, in der die freie Salzsäure durch Lauge abgestumpft ist, fällen und durch Silberoxyd dem Niederschlage entziehen.

Reindarstellung des Ophiotoxins mittels Kupferfällung nach Faust.

Von den mit Metallsalzfällungen ausgeführten Reinigungsverfahren verdient das Verfahren nach Faust besonderer Erwähnung. Dasselbe wird folgendermaßen ausgeführt. Die 2%ige wässerige, klar filtrierte Schlangengiftlösung wird mit einer Lösung von neutralem Kupferacetat oder mit chemisch reinem, namentlich völlig eisenfreiem Kupferchlorid versetzt und dieser kupferhaltigen Lösung nach einiger Zeit verdünnte, etwa 5%ige Kali- oder Natronlauge tropfenweise zugesetzt bis zur schwachen, aber deutlich erkennbaren alkalischen Reaktion; dabei nimmt die Flüssigkeit eine intensive Biuretfärbung an und es fällt ein Niederschlag aus, welcher zum größten Teil aus Kupferoxydhydrat besteht, während die eiweißartigen Beimengungen, wie an der eintretenden Biuretreaktion zu erkennen ist, zum großen Teil in das Filtrat übergehen. Falls auf Zusatz von Lauge keine weitere Fällung entsteht, wird nach dem Absetzenlassen des Niederschlags abfiltriert, dann in schwach essigsäurehaltigem Wasser gelöst und aus der klar filtrierten Lösung durch tropfenweisen Zusatz von Lauge abermals ein Niederschlag erzeugt, während die restlichen Eiweißkörper wieder in dem Filtrate zurückbleiben. Man filtriert den Niederschlag möglichst schnell ab und wiederholt eventuell behufs Reinigung des Niederschlages das Lösen und Fällen nochmals. Auf diese Weise kann man den Kupferlaugeniederschlag von biuretgebender Substanz und durch Waschen von überschüssigem Alkali befreien. Die Zerlegung des Niederschlags und das Befreien des wirksamen Körpers von Kupfer kann entweder in der Weise geschehen, daß der in Wasser suspendierte Niederschlag mit Schwefelwasserstoff unter kräftigem Schütteln zersetzt und der überschüssige Schwefelwasserstoff durch Luftdurchblasen entfernt wird; die von dem ausgeschiedenen Schwefelkupfer abfiltrierte klare, biuretfreie Flüssigkeit stellt das gut wirksame Ophiotoxin dar, das im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet werden kann; derartig dargestellte Präparate erwiesen sich als stickstofffrei. Die zweite Zersetzungsmethode des gewaschenen Kupferniederschlags besteht darin, das derselbe mit Alkohol vom Filter abgespült und zur völligen Entwässerung längere Zeit unter wiederholt gewechseltem 96%igen Alkohol aufbewahrt wird. Durch vorsichtigen Zusatz alkoholischer Salzsäure zu dem überstehenden Alkohol und durch fleißiges Schütteln des Alkohols wird der Kupferniederschlag zerlegt, wobei sich das gebildete Kupferchlorid im Alkohol löst, während das vorher an Kupfer gebundene,

jetzt freie Ophiotoxin in Form leichter, gelblichweißer Flöckchen ausfällt. Die Ausscheidung kann durch Zusatz von wasserfreiem, frisch destilliertem Äther beschleunigt werden. Von dem abgeschiedenen Toxin wird der kupferchloridhaltige Alkohol durch Dekantation entfernt; das abgeschiedene, nochmals mit Alkohol gewaschene Ophiotoxin löst man in Wasser. Nach diesen beiden Methoden dargestellte Giftlösungen erweisen sich infolge der Alkaliwirkung schwächer wirksam als das Ausgangsmaterial, weshalb Faust noch eine dritte, schonendere Darstellungsmethode, welche auf der Ausfällung der Eiweißkörper mit Metaphosphorsäure beruht und später besprochen wird, angewandt hat.

Überblickt man die mit Hilfe der Metallsalze ausgeführten Reinigungsmethoden, welche den Zweck hatten, die Toxine eiweißfrei darzustellen, so kann man auf Grund der erzielten Resultate, so wichtig sich auch die eingeschlagenen Methoden in anderen Richtungen erweisen könnten, in keinem Falle die Nichteiweißnatur der Toxine als erwiesen erachten. Man kann sich speziell bei den mit Metallsalzen durchgeführten Reinigungsprozeduren des Eindruckes nicht entschlagen, daß die erhaltenen Gifte zum großen Teile veränderte Produkte sind, die mit den nativen Giften nicht identifiziert werden können. Das geht schon daraus hervor, daß zahlreiche der angeführten, übrigens recht launenhaften Methoden häufig nur schlecht wirksame Körper liefern; den gut wirksamen Giften bleiben aber zumeist die einen oder anderen Eiweißcharaktere hartnäckig anhaften. Aber auch in jenen spärlichen Fällen, wo diese völlig in Hintergrund treten, muß die Möglichkeit berücksichigt werden, daß wir es mit Eiweißspaltungsprodukten zu tun haben können, welche eben die typischen Eiweißreaktionen bereits vermissen lassen.

In jüngster Zeit haben J. J. Abel und W. W. Ford eine Reindarstellung des Hämolysins aus der Amanita phalloides durch Fällung mit basischem essigsauren Blei und durch Anwendung der Dialyse, kombiniert mit der Metaphosphorsäurefällung, versucht und halten die wirksame Substanz für ein stickstoffhaltiges Glykosid, in welchem die Zuckerkomponente von einer Pentose dargestellt wird. Auch diese Versuche können, soweit die Eiweißnatur geleugnet wird, durchaus nicht als überzeugend gelten, zumal die erhaltenen Präparate in ihrer Wirksamkeit gegen das Ausgangsmaterial sehr erheblich abgeschwächt sind und der Darstellungsgang die Glykosidnatur dieser Körper nur ungenügend zu stützen vermag.

Die Fällungen mit Metallsalzen haben bei der Isolierung von Produkten, welche in der Entwicklung der Lehre von den Giften als Vorläufer unserer Toxine zu betrachten sind, nämlich der sogenannten Ptomaine und Leukomaine eine große Rolle gespielt; es soll der Darstellung dieser Produkte hier nicht allein des historischen Interesses wegen gedacht werden, sondern auch deshalb, weil es nicht unmöglich ist, daß sich von diesen Produkten, denen nach unseren jetzigen Erfahrungen weder irgend ein Toxincharakter, noch Antigencharakter zukommt, gewisse Beziehungen zu giftigen Substanzen des Bakterienstoffwechsels finden lassen, die den Antigenen bereits näher stehen. So ist das aus gefaulter Hefe dargestellte Sepsin Fausts gewissen Ptomainbasen bereits sehr verwandt und es erscheint uns als eine naheliegende Fragestellung, ob es nicht spezifische Bakteriensepsine gibt, denen gewisse toxische Bakterienwirkungen zukommen (Passini, siehe auch Kruse). Aus diesen Gründen halten wir

auch die Berührung der Darstellungsmethodik der zu den Ptomainen gezählten basischen Produkte hier für berechtigt. Mit dem Namen Ptomaine (πτῶμα, Leichnam) bezeichnete Selmi die bei der Fäulnis tierischer Substanzen entstehenden alkaloidartigen Verbindungen (Leichenalkaloide), während Gautier mit Leukomaine (Λεύκωμα, das Eiweiß) die in den Geweben lebender Tiere produzierten Alkaloide, als deren Quelle die Eiweißstoffe anzusehen sind, benannte. Die giftigen Ptomaine bezeichnete Brieger als Toxine. Um die Darstellung der hierher gehörigen Basen haben sich insbesondere Selmi, Gautier, Pouchet, Griffiths, Brieger und Nencki besondere Verdienste erworben und die Zahl der aus den verschiedensten Materialien dargestellten mehr oder minder gut charakterisierten Basen ist eine sehr große. Die hier am meisten interessierende Methodik ist jene der Ptomaindarstellung nach Brieger.

Darstellung der Ptomaine nach Brieger.

Hat man Organe zu verarbeiten, so werden die fein gehackten Massen mit schwach salzsäurehaltigem Wasser durch einige Minuten ausgekocht, filtriert und das Filtrat anfangs über freier Flamme, später am Wasserbade, eventuell im Vakuum (Briegers Vakuumapparat) eingedampft. Der Syrup wird mit 96 % Alkohol aufgenommen, das Filtrat mit warmer alkoholischer Bleiacetatlösung versetzt, der Niederschlag entfernt und das Filtrat neuerdings zum Syrup eingeengt und abermals mit Alkohol gleicher Stärke erschöpft. Nach Verjagung des Alkohols wird der Rückstand in Wasser aufgenommen, das Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt, die Flüssigkeit mit wenig Salzsäure zur Syrupskonsistenz eingeengt, der Rückstand mit Alkohol wiederum erschöpft und die Lösung mit alkoholischer Sublimatlösung gefällt. Der Niederschlag wird mit viel Wasser ausgekocht, wobei Eiweiß und Peptone ungelöst bleiben, die Quecksilberverbindungen der Ptomaine aber in Lösung gehen. Es läßt sich schon jetzt auf Grund der verschiedenen Löslichkeit der Quecksilberdoppelverbindungen eine Trennung einzelner Ptomaine erzielen, indem die schwerer löslichen beim Erkalten auskristallisieren.

Das Quecksilberfiltrat, von Alkohol und nach Aufnahme mit Wasser durch Behandeln mit Schwefelwasserstoff von Quecksilber befreit, wird eingedampft, wobei die überschüssige Salzsäure durch Soda abgestumpft wird, hierauf noch wiederholt mit Alkohol erschöpft, der alkoholische Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung nach Bindung der eventuell vorhandenen Salzsäure durch Soda mit Salpetersäure angesäuert und mit Phosphorwolframsäure versetzt. Die abfiltrierte Verbindung wird durch Bleiacetat unter schwachem Erwärmen am Wasserbade zerlegt, das Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt und die zum Syrup eingedampfte Flüssigkeit kann nun mit Alkohol behandelt werden, wodurch manche Ptomaine als Chlorhydrate eliminiert werden; oder man bewerkstelligt durch Überführung in Doppelsalze eine Trennung dieser Substanzen. Dazu eignen sich Platinchlorid, Goldchlorid und Pikrinsäure.

Von den aus Organen zuerst nach dem Tode auftretenden Ptomainen ist das Cholin $C_5H_{15}NO_2$ zu nennen, das durch Spaltung des Lecithins auftritt. Bei dem weiteren Fortschreiten der Fäulnis und zwar bereits am dritten Tage konnte aus inneren Organen das Neuridin $C_5H_{14}N_2$ gewonnen werden, das sich stets in Begleitung des Cholins vorfindet. Das Cholin schwindet allmählich im Verlaufe der Fäulnis und dafür tritt zuerst Trimethylamin $(CH_3)_3N$ und später Cadaverin (Pentamethylendiamin)

$C_5H_{14}N_2$ auf; vereint mit dem Cadaverin findet sich stets das Putrescin (Tetramethylendiamin) $C_4H_{12}N_2$ vor. Von diesen Verbindungen sind jedoch Neuridin, Cadaverin und Putrescin, sowie noch ein viertes Ptomain, das dem Cadaverin gleich zusammengesetzte Saprin ungiftig und physiologisch indifferent, nur das Cholin äußert in größeren Dosen muskarinähnliche Wirkungen; auch das Trimethylamin muß in größeren Dosen eingeführt werden, um toxische Wirkungen herbeizuführen. Exquisit toxische Substanzen bilden sich erst nach siebentägiger Fäulnis, doch ist auch ihre Menge nach BRIEGER stets sehr klein.

Aus der großen Zahl der Ptomaine, welche aus Kulturen pathogener Bakterien von BRIEGER u. a. gewonnen worden sind, ohne daß jedoch ihre Wirkung mit den spezifischen toxischen Bakterien-Produkten vorläufig in irgend eine Beziehung gebracht werden kann, seien hier angeführt: Das Tetanotoxin: $C_5H_{11}N$, Tetanin $C_{14}H_{30}N_2O_4$ und Spasmotoxin aus giftigen Tetanuskulturen, das Typhotoxin $C_7H_{17}NO_2$ aus Typhuskulturen (BRIEGER 1885), das Mydin $C_8H_{11}NO$ aus Typhuskulturen von menschlichem Bluteiweiß (BRIEGER 1886), das Pyocyanin $C_{14}H_{14}NO_2$ (LEDDERHOSE 1887), das Phlogosin (LEBER 1888) aus Kulturen des Staphylococc. pyog. aureus, das Methylguanidin $C_2H_7N_3 : NH{=}C\,(NH_2).NH\,(CH_3)$ aus Cholera- und Finkler-Prior-Kulturen (BRIEGER 1886), das Milzbrandalkaloid aus Milzbrandkulturen (A. HOFFA 1886) u. a.

Darstellung des Sepsins nach FAUST.

5 kg gewaschener Preßhefe werden mit 3—3½ l Wasser übergossen und vier Wochen faulen gelassen. Die Giftigkeit des Ausgangsmaterials wird derart geprüft, daß 20 ccm der durch Papier filtrierten Flüssigkeit einem Hunde von 6—8 kg Körpergewicht langsam in die Vena saphena injiziert wird, worauf der Tod des Tieres innerhalb 12 Stunden unter charakteristischen Erscheinungen eintritt. Hat die Flüssigkeit den wirksamsten Grad erreicht, so wird dialysiert. Eine eventuell nötige Filtration erreicht man leicht durch Zusatz von Chlorkalcium und einer Sodalösung. Das Dialysat ist zunächst schwach oder überhaupt nicht wirksam; läßt man dasselbe bei Sommertemperatur etwa zwei Wochen stehen, so trübt sich dasselbe durch reichliche Pilzwucherung und ist dann beim Tierversuch annähernd so giftig, wie das Ausgangsmaterial. Das wirksame Dialysat wird nunmehr mit Salzsäure angesäuert und mit Sublimat so lange versetzt als eine Trübung und ein Niederschlag entsteht; gewöhnlich bildet sich nur ein geringfügiger Niederschlag. Das Filtrat wird mit Natriumkarbonat stark alkalisch gemacht und nunmehr mit Sublimat gefällt so lange ein Niederschlag entsteht, wobei darauf zu achten ist, daß die Fällung tatsächlich eine vollkommene ist. Der abfiltrierte Niederschlag wird mit kleinen Mengen Wasser, am besten in einem hohen engen Standgefäß, durch Dekantation an einem dunklen Orte gewaschen, da sonst die Quecksilberverbindung sehr leicht reduziert und das Sepsin verändert wird; im Dunkeln aufbewahrt hält sich die Flüssigkeit monatelang. Der auf diese Weise vom Natriumkarbonat befreite Quecksilberniederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, indem dabei zweckmäßigerweise Schwefelwasserstoff unter größerem Druck bei beständigem Rühren der Flüssigkeit eingeleitet wird.

Nach Abfiltrieren des Schwefelquecksilbers wird das stark sauer reagierende Filtrat durch Luftdurchleiten vom Schwefelwasserstoff befreit zur Entfernung der Salzsäure mit frisch bereitetem kohlensauren Silber

versetzt und das Chlorsilber wie etwa überschüssiges Silberkarbonat abfiltriert. Aus dem Filtrat wird das gelöste Silber durch Einleiten von Schwefelwasserstoff befreit, das Schwefelsilber wird abfiltriert und der Schwefelwasserstoff durch Luftdurchblasen entfernt. Erweist sich nun diese Lösung beim Tierversuch als wirksam, so wird die mehrere Liter (5—6) betragende Flüssigkeit in dem von Faust konstruierten Verdampfungsapparat (siehe das Kapitel Konzentrierungsmethoden) bei 23° C eingeengt und der Rückstand entweder mit absolutem Alkohol ausgezogen oder in möglichst wenig Wasser aufgenommen, die Lösung filtriert und im Vakuumexsikator über Schwefelsäure zum Trocknen gebracht; dieser Rückstand erst wird mit Alkohol extrahiert. In die filtrierte alkoholische Lösung wird in Alkohol gelöste, konzentrierte Schwefelsäure tropfenweise zufließen gelassen; die daraufhin entstehende Trübung schwindet nach 12—18stündigem Stehen und es entsteht ein feiner kristallinischer Beschlag. Auch aus der klaren alkoholischen Lösung kann man Kristalle erhalten, zumal nach Zusatz von Äther. Die Kristalle werden in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt; aus der entstandenen Trübung scheiden sich die Kristalle in Form von feinen Nadeln aus, welche die exquisite physiologische Wirkung ergeben. Aus 5 kg Preßhefe erhält man ca. 0,03 g schwefelsaures Sepsin; die freie Base ist in Wasser leicht löslich und reagiert stark alkalisch. Beim Eindampfen sowohl der Lösung der freien Base, wie auch des schwefelsauren Salzes bei Wasserbadtemperatur wird die Substanz unwirksam, indem bei mehrmaligem Abdampfen das Sepsinsulfat in Pentamethylendiaminsulfat (Briegers „Cadaverin") übergeht, wie sich bereits aus den Untersuchungen von K. Tamba ergibt und wie dies Faust mit Sicherheit nachweisen konnte. Das Sepsin verliert auch sehr schnell seine Wirksamkeit beim Aufbewahren in wässeriger neutraler Lösung, ja selbst beim Aufbewahren im Vakuum über Schwefelsäure, wobei nach Faust die Möglichkeit einer intramolekulären Umlagerung eine Rolle spielen kann. Das Sepsin hat nach Faust die empirische Formel $C_5H_{14}N_2O_2$, das Cadaverin $C_5H_{14}N_2$.

Über die Konstitution des Sepsins kann vorläufig nichts Sicheres ausgesagt werden. Da aus demselben Cadaverin gewonnen werden kann, konnte es als ein Dioxycadaverin, also ein Diamino-Dioxypentamethylen

$$\begin{array}{l} CH_2 \cdot NH_2 \\ | \\ CH \cdot OH \\ | \\ CH \cdot OH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \cdot NH_2 \end{array}$$

aufgefaßt werden; doch liegen auch noch andere Auffassungsmöglichkeiten vor.

Die tödliche Dosis beträgt für einen Hund von 7—8 kg etwa 20 mg Sepsinsulfat = 11,5 mg der freien Base. Bei Injektion in die Vena saphena erfolgt zunächst Beschleunigung der Respiration, Erbrechen, verstärkte Darmperistaltik; nach 1—2 Stunden Erbrechen und Abgang von flüssigen, reiswasserähnlichen, dann blutigen Stühlen, endlich reinem Blut; die Atmung wird tief, wenig frequent und im Coma geht das Tier zugrunde. Bei der Sektion finden sich im Magen- und Darmkanal Hyperämie Ecchymosen und Geschwüre (speziell im Duodenum). Die

Payerschen Plaques sind nur wenig angegriffen; eine allgemeine stärkere oder schwächere Hyperämie ist regelmäßig nachweisbar. Kaninchen scheinen widerstandsfähiger zu sein als Hunde; Frösche sind ganz ungeeignet. Faust hat auch mit Erfolg den Versuch gemacht, Hunde an die Sepsinwirkung zu gewöhnen.

4. Fällung durch Säuren und Basen und deren Einwirkung auf die Antigene.

Säuren können als Isolierungsmittel von Antigenen eine doppelte Rolle spielen 1. dadurch, daß manche Antigene durch Säuren ausgefällt werden und auf diese Weise von den begleitenden Verunreinigungen abgetrennt werden können, 2. dadurch, daß durch bestimmte Säurefällungen ein großer Teil der indifferenten Eiweißkörper entfernt werden kann, so daß derartig unter gewissen Bedingungen eine Reindarstellung der Antigene möglich ist. Daß Säuren auf die nativen Gifte nicht immer einen deletären Einfluß ausüben, wie man anzunehmen gewohnt ist, geht schon daraus hervor, daß gerade freie Säuren und zwar sowohl anorganische wie organische vielfach imstande sind auf die Toxine insofern eine schützende Wirkung auszuüben, als sie gewisse Gifte, wie z. B. das Schlangenhämolysin, vor der Zerstörung durch Hitze und anderen Einflüssen bewahren. Da derartige Verhältnisse bei der Absättigung der mit Säuren versetzten Gifte durch Antitoxin besonders deutlich in Erscheinung treten, so findet die Besprechung der einschlägigen Phänomene, wie sie von Roux und Yersin, Kyes und Sachs, Morgenroth und Dörr am Schlangenhämolysin, Diphtherietoxin, Dysenterietoxin u. a. beobachtet worden sind, an anderer Stelle statt.

Hier sei nur in Kürze angeführt, daß Roux und Yersin nach Ansäuern der filtrierten, sehr giftigen Diphtheriekulturen mit Milchsäure und Weinsäure das Gift derart abschwächen konnten, daß es für Meerschweinchen völlig unschädlich war; sobald man aber diese inaktive Giftlösung wieder neutralisiert hat, erhielt sie einen großen Teil ihrer Giftigkeit wieder; doch wird, falls der Kontakt mit der Säure lange dauert, das Gift sehr abgeschwächt. Am Schlangengift zeigten Kyes und Sachs, daß der Kobraamboceptor in saurer Lösung gegen anhaltendes Erhitzen stabil bleibt, und Flexner und Noguchi fanden, daß das in dem Krotalusgift enthaltene Hämorrhagin durch Behandlung mit Salzsäure zwar entgiftet wird, aber seine Immunkörper bildenden Eigenschaften voll beibehält. An die von Kyes und Sachs gewonnenen Erfahrungen anknüpfend hat dann Morgenroth in mehreren schönen Untersuchungen diese hitzebeständigen, durch Neutralisation vollkommen reversiblen Salzsäuremodifikationen des Kobragiftes, die auch eine Trennung des Toxins vom Antitoxin in neutralen Gemischen ermöglichen, genauer studiert; auf einige hier einschlägige Einzelheiten wurde bereits früher eingegangen. Hier wäre nur noch hervorzuheben, daß Kobragiftlösungen, welche, wie Morgenroth und Pane gefunden haben, in $^1/_{20}$ Normalsalzsäure erhitzt worden waren und das hämolytische Vermögen einbüßten, dasselbe nach mehrtägigem Stehen in neutraler Lösung wieder vollkommen gewinnen; auch in der Kälte erleidet das Toxin bei längerer Einwirkung von Salzsäure eine ganz analoge Abschwächung, wie beim Erhitzen, ein Verfahren, das schonender ist als das Hitzeverfahren. Auch das Neurotoxin kann durch 14tägiges Aufbewahren in $\frac{n}{20}$ HCl im

Eisschrank in die reversible Säuremodifikation übergeführt werden. Doerr hat sowohl beim Diphtherietoxin, als auch beim Dysenterietoxin durch Einwirkung 1—2 %iger Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure (auf das Dysenterietoxin), Milchsäure, Essigsäure und dgl. (auf das Diphtherietoxin) unwirksame, durch Neutralisation mit starker Soda wieder reaktivierbare Giftmodifikationen herstellen können; bemerkenswert ist, daß Essigsäure (4 %) nicht das Dysenterietoxin umzuwandeln vermag. Die Reaktivierung gelingt innerhalb 20 Stunden nach erfolgter ca. 4stündiger Säureeinwirkung; Tetanus, Choleratoxin (El Tor-Stamm), Vibriolysin werden durch Säuren dauernd zerstört. Auch auf die noch später zu erwähnenden Abrinversuche von Landsteiner und Jagič sei hier erinnert, welche durch Säure die Verbindung des Abrins mit den roten Blutkörperchen unter Gewinnung des Abrins wieder zerlegen konnten. Auf die näheren Details dieser interessanten Arbeiten und auf die hier mitspielenden Bindungsfragen zwischen Toxin und Antitoxin einzugehen, muß ich mir versagen und verweise auf die speziellen Abhandlungen dieses Handbuches.

Als Fällungsmittel der sogenannten echten Toxine wenig oder gar nicht verwendbar erwiesen sich die Alkaloidreagentien, wie die Ferrocyanwasserstoffsäure (Essigsäure und Ferrocyankalium), Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Pikrinsäure, Gerbsäure, da durch sie ein großer Teil der betreffenden Gifte zerstört wird. Ebenso verhält sich den Toxinen gegenüber Kaliumquecksilberjodid und wohl auch das analoge Kaliumwismutjodid. Dagegen benützte Klebs neben den übrigen Alkaloidreagentien insbesondere das Natriumwismutjodid in essigsaurer Lösung zur Reindarstellung seiner verschiedenen Tuberkulinpräparate, des Tuberkulocidin, Erethin und Antiphthisin, deren Beschreibung bereits früher (s. p. 364 u. 365) erfolgt ist; da wir es bei den verschiedenen Tuberkulinpräparaten mit für chemische Reagentien überhaupt recht resistenten Körpern zu tun haben, so unterlag deren chemische Charakterisierung, so weit bei dem gegenwärtigen Stande der Dinge von einer solchen gesprochen werden kann, geringeren Schwierigkeiten und wir verdanken insbesondere den Untersuchungen Ruppels einige wertvolle Aufklärungen über die Zusammensetzung der aus den Tuberkelbazillenkulturen dargestellten Gifte, wenn auch manche der von Ruppel dargestellten Produkte behufs einwandsfreier chemischer Charakterisierung einer weiteren Untersuchung noch bedürfen (Burian).

Diese Untersuchungen sind dadurch von besonderem biologisch-chemischen Interesse, weil sie zeigen, daß gewisse Kernsubstanzen auch Träger spezifischer Wirkungen sein können. Bereits Nencki hat im Jahre 1884 nach einer von ihm schon früher ausgearbeiteten Methode aus Milzbrandbazillen durch Extraktion mit 0,5 %iger Kalilauge in der Wärme und Fällung durch verdünnte Säuren sein Mykoprotein, das Anthraxprotein, dargestellt, das keinen Schwefel enthielt, jedoch die Biuretreaktion gab. Später hatte Galeotti und zahlreiche andere Forscher (s. p. 373 u. ff.) aus den verschiedensten Bakterien derartige Nukleoproteide dargestellt. Eine bessere Charakterisierung fanden diese Körper schon durch Nishimura, welcher durch Spaltung von Bakterien, die aus dem Trinkwasser gezüchtet worden waren, Purinbasen erhielt und zwar 0,17 % Xanthin, 0,14 % Guanin und 0,08 % Adenin. Aronson zeigte für Diphtheriebazillen, später auch für Tuberkelbazillen, daß sie Pentosenreaktionen geben; daß tatsächlich die Nukleinverbindungen Träger der Pentosenreaktion sind, machte Bendix sowohl für Tuberkelbazillen, wie auch für ein Gemisch von Darmbakterien wahrscheinlich. Dagegen gelang

es ihm nicht, in den Typhusbazillen Pentosen nachzuweisen. RUPPEL gelang es durch Fällung der Tetanusnährbouillon mit verdünnter Essigsäure ein Produkt abzuscheiden, welches beim Schütteln mit 1 %iger Schwefelsäure in Nukleinsäure und in ein typisches Protamin zerfiel. Dieses Nukleoprotamin, welches in der ursprünglichen Nährbouillon nicht enthalten war, mußte nach diesem Autor bei dem Wachstum der Tetanusbazillen entstanden sein und war durch das Absterben und den Zerfall älterer Zellen in die umgebende Flüssigkeit gelangt. Die genauesten Studien über die durch Säuren isolierbaren Substanzen liegen bei den Tuberkelbazillen vor.

Isolierung der Tuberkelbazillenantigene nach RUPPEL.

Feuchte, durch Filtration von den Kulturflüssigkeiten getrennte Tuberkelbazillen werden behufs Entfernung der „Pflanzenschleime" mit Wasser kräftig geschüttelt und hierauf auf der Saugpumpe abfiltriert. Die so gereinigten Bazillen lassen sich im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure zu spröden Massen trocknen und werden in der von KOCH angegebenen Weise zu einem staubfeinen Pulver, das mikroskopisch keine intakten Bazillen mehr enthält, zerrieben. Der Auszug dieser zertrümmerten Bazillen, welcher mit der 5—10fachen Gewichtsmenge Wasser erhalten wird und ca. die Hälfte des Bakteriengewichtes in Lösung hält, stellt das KOCHsche Tuberkulinpräparat TO dar, während der zurückgebliebene unlösliche Rückstand das Präparat TR bildet. Das Präparat TO, resp. die wässerige Lösung der zerriebenen Tuberkelbazillen, enthält keine koagulierbaren Eiweißkörper, gibt Biuretreaktion und schlägt genuine Eiweißkörper aus ihren Lösungen nieder; aus dieser Lösung können zwei Körper isoliert werden. Erstens eine durch Essigsäure auch im Überschusse fällbare, in Alkalien lösliche phosphorhaltige Verbindung, die ca. 4 % Phosphor enthält. Durch Behandeln dieses Essigsäureniederschlags mit 1 %iger Schwefelsäure kann man denselben aufspalten und erhält das Sulfat eines basischen Produkts, das sogenannte Tuberkulosamin, das sich ebenso verhält wie das Protamin KOSSELs, und in den Tuberkelbazillen an die Nukleinsäure gebunden erscheint, und eine Nukleinsäure, die sogenannte Tuberkulinsäure, die nach Entfernung des basischen Produkts sich in der Essigsäurefällung noch nachweisen läßt. Der Befund eines Protamins in den Tuberkelbazillen ist deshalb merkwürdig, weil Protamine bisher ausschließlich nur in den Köpfen von Fischspermatozoen mit voller Sicherheit nachgewiesen werden konnten. Der zweite Körper ist eine durch Essigsäure nicht fällbare, gleichfalls phosphorhaltige Substanz, welcher die oben erwähnte eiweißfällende Eigenschaft zukommt, und welche an sich keinerlei Proteinreaktionen liefert, keinen Schwefel enthält und in ihrem ganzen chemischen Verhalten mit den Nukleinsäuren übereinstimmt. Dies ist die freie Tuberkulinsäure oder Tuberkulonukleinsäure; sie enthält 9,2—9,4 % Phosphor und liefert bei längerem Erhitzen ihrer wässerigen Lösung auf dem Wasserbade Spaltungsprodukte, welche aus Nukleinbasen einerseits und aus einer phosphorhaltigen Säure, der Tuberkulothyminsäure, andererseits bestehen. Unter den basischen Spaltungsprodukten lassen sich reichliche Mengen von Guanin neben geringen Mengen von Xanthin und Adenin nachweisen.

BEHRING und KITASCHIMA prüften die Wirksamkeit der von RUPPEL dargestellten Präparate und fanden, daß die Tuberkulin-

säure die spezifischen Eigenschaften des Kochschen Tuberkulins in erhöhtem Maße besitzt, eine Tatsache, welche nach Ruppel dadurch an Bedeutung gewinnt, daß Kitaschima bei Behring zeigen konnte, daß die spezifische Wirksamkeit der Tuberkulinsäure an die Thyminsäuregruppe dieser Nukleinsäure gebunden ist. Wurde die Tuberkulinsäure in der früher erwähnten Weise auf dem Wasserbade gespalten, so haftete den hierbei erhaltenen basischen Produkten keine, der Thyminsäure dagegen erhöhte spezifische Wirksamkeit an. Der Befund Kitaschimas legt nach Ruppel die Annahme nahe, daß die Verschiedenheiten im Verhalten der Nukleinsäure auf die differente Zusammensetzung der im Nukleinsäuremolekül enthaltenen Thymingruppe zurückzuführen sind. Auch dem Tuberkulosamin sind spezifische Wirkungen eigentümlich, so daß Ruppel wahrscheinlich ist, daß der Tuberkulinsäure und dem Tuberkulosamin eine Atomgruppe gemeinschaftlich ist, welche an sich erst das eigentliche Tuberkulosetoxin darstellt.

Die mit Wasser völlig erschöpften Rückstände der Tuberkelbazillen, also das TR, liefern, wie bereits an anderer Stelle erwähnt wurde, in Alkalien lösliche und durch Essigsäure fällbare Nukleoproteide; nach der Extraktion mit Alkalien verbleiben in den Bazillen Substanzen, welche hauptsächlich aus Neutralfetten und Wachsarten bestehen; bei der Verseifung derselben erhielt Ruppel neben Glyzerin Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und eine vierte hochschmelzende, nicht näher charakterisierte Säure und zwei Alkohole, von denen der eine bei 79° schmolz und wahrscheinlich Cerylalkohol ($C_{27}H_{56}O$) ist, der andere bei 85° schmolz und dem Myricilalkohol ($C_{30}H_{62}O$) ähnlich war. Nach dem Erschöpfen der Tuberkelbazillen mit Alkohol und Äther verbleiben die äußerst schwer löslichen, von Ruppel zu den „Proteinoiden“ gerechneten Eiweißkörper.

Ein Überblick über die quantitative Verteilung der angeführten Verbindungen in der Leibessubstanz der Tuberkelbazillen ergibt nach Ruppels Untersuchungen folgendes: 100 g scharf getrockneter Tuberkelbazillen bestehen aus 8,5 g Tuberkulinsäure, 24,5 g Nukleoprotamin, 23 g Nukleoproteid, 26,5 g Fett resp. Wachs, 9,2 g Mineralbestandteilen und 8,3 g Proteinoid.

Fällung von Toxalbuminen mit Nukleinsäure nach Tichomiroff.

Wurden in dem Vorhergehenden zur Ausfällung von antigenwirkenden Nukleoproteiden Säuren verwendet, so hat Tichomiroff unter A. Kossels Leitung umgekehrt die eiweißfällenden Eigenschaften der Nukleinsäuren zur Ausfällung einiger Toxine benützt. Sowohl genuine Eiweißkörper als auch Albumosen werden durch Nukleinsäure in saurer Lösung gefällt; unter den Albumosen ist es nach neueren Untersuchungen von W. Löbisch insbesondere die Deuteroalbumose A (E. P. Pick), welche sich mit Nukleinsäure verbindet, während die Deuteroalbumosen B und C und die Peptone eine derartige Eigenschaft, mit Nukleinsäure Fällungen zu geben, nicht besitzen. Es ist naheliegend, aus der Fällbarkeit verschiedener Toxine durch die Nukleinsäure auf deren Eiweißnatur respektive Albumosennatur zu schließen; wenn auch ein solcher Schluß nicht zwingend ist, so scheint mir manches dafür zu sprechen, daß es sich auch hier nicht um einfaches mechanisches Mitreißen der toxischen Substanzen handelt, sondern entweder um wirkliche chemische Verbindungen oder um Komplexbildungen, die nach bestimmten physi-

kalisch-chemischen Gesetzen verlaufen; wenigstens scheint zugunsten einer derartigen Annahme der Umstand verwertbar, daß sich die verschiedenen Toxine trotz der in gleicher Weise entstehenden Nukleinsäure-Albumosenfällungen in bezug auf die Wirksamkeit der erhaltenen Niederschläge recht verschieden verhalten. Tichomiroff und Cushny halten die Fällbarkeit der Toxalbumine und des Ricins für ein „Mitgerissenwerden" durch den entstandenen Niederschlag, wenn auch Tichomiroff sich dessen bewußt ist, daß damit eine Erklärung für diese Art der Fällung nicht gegeben ist.

Die Darstellung dieser Nukleinsäurefällungen erfolgt in der Weise, daß die betreffenden Giftlösungen, filtrierte Bouillonkulturen oder wässerige Lösungen fester Präparate, mit Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion angesäuert werden und mit einer 1 %igen Nukleinsäurelösung gefällt werden. Die Nukleinsäure selbst wird am bequemsten nach den Angaben Neumanns aus Organen (Thymus) in der Weise dargestellt, daß das in essigsäurehaltigem Wasser gekochte, dann fein zerkleinerte Organ mit 1,66 %iger Natronlauge und 10 %igem Natriumacetat ½ Stunde auf trichter filtriert, eingeengt, mit Essigsäure neutralisiert, abermals filtriert dem Wasserbade gekocht wird; hierauf wird durch einen Heißwasser- und die erhaltene Flüssigkeit bei 40° mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt; der Niederschlag, welcher die Natriumsalze der Nukleinsäuren enthält, wird mit 50 %igem Alkohol bis zur Biuretfreiheit gewaschen und hierauf auf dem Wasserbade mit Wasser bis zur Lösung gekocht; die erhaltene, beim Erkalten gelatinierende Lösung stellt das nukleinsaure Natron dar.

Tichomiroff gelang es, giftige Verbindungen herzustellen aus Ricin, Tetanustoxin, Diphtherietoxin, dagegen nicht aus Kulturen von Cholera, Typhus, Staphylokokken und Streptokokken. Bei Ricin verwendete er das Mercksche Präparat, von dem 0,005 mg für weiße Mäuse die tödliche Dosis darstellte. 0,15 g dieses Ricins wurden in 300 ccm Wasser gelöst, mit Essigsäure angesäuert und 20 ccm der 1 %igen Nukleinsäurelösung zugesetzt. Der entstandene Niederschlag wurde auf einem gewogenen Filter mit Alkohol und Äther gewaschen, im Exsikkator getrocknet und gewogen. Derselbe wog 0,077 g und hatte in Wasser unter Sodazusatz gelöst folgende Giftigkeit für weiße Mäuse: Eine Menge, welche 0,02 mg der Substanz entsprach, tötete bei subkutaner Applikation in zwei Tagen eine Maus von 18 g Körpergewicht; aber auch eine Menge 0,01—0,006 mg hatte die gleiche Wirkung und eine Menge von 0,005 mg des Niederschlags tötete erst nach fünf Tagen. Es büßte daher das Ricin nahezu nichts von seinen giftigen Eigenschaften ein.

In ähnlicher Weise verhielten sich die aus keimfrei filtrierten Diphtherie- und Tetanusbouillonkulturen dargestellten Niederschläge; auch sie enthielten mehr oder minder intakt die ursprüngliche Giftwirkung der Bouillon, welche sich in den Nukleinverbindungen selbst monatelang ungeschwächt hielt. Die Niederschläge gaben stets sowohl die Biuret-, wie auch die Millonsche Reaktion.

Unabhängig von Tichomiroff haben gelegentlich ihrer Studien über die Beziehungen gerinnungshemmender Substanzen zu der Antitoxinwirkung E. Freund, Grosz und Jelinek sowohl mit Nukleinsäure, wie auch mit Nuklein, sowie mit Histon Fällungsversuche an Toxinen, vor allem an Diphtherietoxin vorgenommen. Diese Versuche zeigten, daß der Zusatz des gleichen Volumens einer neutralen 2 %igen Nukleohistonlösung und ebenso der einer 2 %igen neutralen Nukleinsäurelösung das

Diphtherietoxin fällt; das Filtrat des Niederschlags erwies sich als unwirksam. Dagegen ist der durch das doppelte Volum einer 5 $^0/_0$ igen Histonlösung erzeugte Niederschlag indifferent und das Filtrat wirkt toxisch.

Während 2 $^0/_0$ ige Nukleinsäure und Nuklein mit Diphtherietoxin zu gleichen Teilen gemischt und durch 20 Stunden bei 37^0 stehen gelassen die toxische Wirkung in keiner Weise abschwächen, vermag eine Digestion des Diphtherietoxins mit dem 5 bis 10 fachen Volumen einer 5 $^0/_0$ igen und 10 $^0/_0$ igen Histonlösung durch 20 bis 24 Stunden bei 37^0 die Giftwirkung bedeutend abzuschwächen; ebenso wirkte die 10 $^0/_0$ ige Lösung einer mit Alkohol gefällten sauren Nukleohistonlösung und nach Freund und Grosz auch die nach Kühne aus Wittpepton dargestellten in 7 bis 10 $^0/_0$ ger Lösung angewandten Proto- und Deuteroalbumosen.

Nach I. G. Novy ist Nukleohiston, das nach Lilienfeld dargestellt worden ist, erst bei zweitägiger Berührung mit Tetanustoxin imstande, das letztere abzuschwächen oder zu zerstören; doch wird durch Verwendung einer derartigen Mischung keine Immunität erzeugt. Das Diphtherietoxin wird in der Mischung mit Nukleohiston in weniger als 24 Stunden zerstört; es ist also gegen die Einwirkung von Nukleohiston weniger widerstandsfähig als das Tetanustoxin. Histon, welches durch Spaltung mit 0,8 $^0/_0$ iger Salzsäure und nachherige Alkoholfällung aus Nukleohiston dargestellt und in 10 $^0/_0$ iger Lösung mit Diphtherietoxin gemischt wurde, zerstörte das Toxin innerhalb fünf Minuten. Im Tierkörper gewährt jedoch eine gesonderte Einspritzung von Histon und Gift weder gegen Tetanus, noch gegen Diphtherietoxin irgendwelchen Schutz. Gegen Schweinecholera und Anthrax ist es wirkungslos.

Endlich sei hier auf die Studien von H. und A. Kossel hingewiesen, welche in den aus der Thymus dargestellten Nukleinsäuren, die sie in 1 $^0/_0$ iger Lösung zu gleichen Teilen mit verschiedenen Bakteriensuspensionen in Kochsalz mischten, kräftige bakterizide Stoffe nachwiesen; so wurden Cholerabakterien in $^1/_2$ $^0/_0$ iger Nukleinlösung in 3 bis 5 Minuten, Streptokokken in 2 $^1/_4$ Stunden, Typhusbakterien in 1—1 $^1/_2$ Stunden, Staphylokokken in 6 Stunden abgetötet. Milzbrandsporen blieben noch nach 24 Stunden am Leben. Die Ursache der bakteriziden Wirkung liegt nach diesen Autoren hauptsächlich in der Neigung der Nukleinsäure sich mit Eiweißkörpern zu verbinden; es nimmt daher auch die bakterizide Kraft der Säure ab, sobald dieselbe mit einer Bakteriensuspension im Blutserum gemischt wird, da hier die Nukleinsäure durch Ausfällung der Eiweißkörper des Serums teilweise gebunden wird. H. Kossel hat im Anschluß an diese Untersuchungen die von Miescher und A. Kossel näher studierten basischen Bestandteile der Nukleine, die sogenannten Protamine, in gleicher Richtung untersucht und benützte das nach A. Kossel dargestellte Sturinkarbonat, ein aus den Spermatozoenköpfen des Stöhrs isoliertes Protamin. Von diesem Präparate wirkte auf Choleravibrionen eine Lösung von 1 : 50,000, auf Typhusbakterien von 1 : 10,000, auf Staphylokokken von 1 : 1000 abtötend; auch hier war auf Milzbrandbakterien keine Wirkung festzustellen. Im Gegensatze zu der Nukleinwirkung entfaltet die Protaminlösung, wenn auch abgeschwächt, eine bakterizide Wirkung in Gegenwart von Eiweißkörpern, wie z. B. in Mischungen von frischem Rinderserum.

Reinigung des Ophiotoxins nach FAUST durch Fällung der Eiweißkörper mit Metaphosphorsäure.

Eine 10%ige, schwach mit Essigsäure angesäuerte Kobragiftlösung wird 15 Minuten lang auf dem Wasserbade erhitzt und auf diese Weise von den koagulablen Eiweißkörpern und eventuell einem Teile der Albumosen befreit. Die wirksame Substanz geht mit den Biuretreaktion gebenden Körpern in das Filtrat über. Zur Entfernung dieser wird das Filtrat dialysiert, wodurch allein schon im günstigsten Falle eine eiweißfreie Ophiotoxinlösung erhalten werden kann; doch soll wegen leichter Zersetzlichkeit des Giftes die Dialyse nicht wochenlang dauern, sondern nur bis zur Chlorfreiheit des Dialysats ausgedehnt werden. Die chlorfreie, nicht dialysierende Ophiotoxinlösung wird nunmehr im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur oder durch Eindampfen, wobei immer darauf zu achten ist, daß die Lösungen schwach sauer reagieren, eingeengt und zur Entfernung der biuretartig reagierenden Körper mit einer 10%igen Lösung von Metaphosphorsäure gefällt; dabei ist jedoch ein Überschuß an Metaphosphorsäure zu vermeiden, weil der Niederschlag im Überschuß löslich ist, andererseits soll soviel freie Metaphosphorsäure übrig bleiben, daß die resultierende Giftlösung schwach sauer reagiert. Der durch die Fällung mit Metaphosphorsäure entstandene grobflockige Niederschlag wird abfiltriert und das so erhaltene biuretfreie Filtrat enthält das Gift, welches durch Alkohol nunmehr ausgefällt und durch wiederholtes Lösen und Fällen, am besten in demselben Gefäß, von der etwa anhaftenden Metaphosphorsäure gereinigt werden kann. Die im Vakuum über Schwefelsäure zu einem leichten, schwach gelblich gefärbten, amorphen Pulver getrocknete Substanz enthält keinen Stickstoff, Schwefel und Phosphor, löst sich nach scharfem Trocknen nur langsam in Wasser und ergibt bei der Verbrennung im Mittel einen Kohlenstoffgehalt von 52,01% und einen Wasserstoffgehalt von 6,76%, aus welchen Zahlen sich die empirische Formel $C_{17}H_{26}O_{10}$ berechnet. Die wässerigen Lösungen reagieren auf Lakmus sehr schwach sauer; doch wird Natriumkarbonat durch Ophiotoxin nicht zerlegt, so daß letzteres eine schwächere Säure als Kohlensäure ist. Aus den wässerigen Lösungen wird das reine Gift durch Sättigung der Flüssigkeit mit Ammonsulfat ausgesalzen, dagegen nicht durch Kochsalz und Natriumsulfat; Schwermetallsalze, wie Kupfer, Blei, Quecksilber fällen dasselbe in alkalischer, aber nicht in saurer Lösung.

Die empirische Formel des Ophiotoxins erinnert an die Zusammensetzung mancher pflanzlicher Glykoside. Da es möglich war, daß hier ein tierisches Glykosid vorlag, so versuchte FAUST durch einstündiges Kochen mit konzentrierter Salzsäure einen Kohlenhydratkomplex abzuspalten; doch enthält das Ophiotoxin keine Gruppe, die unter diesen Verhältnissen einen reduzierenden Zucker gibt. Auf Grund der pharmakologischen Wirkungen und der chemischen Eigenschaften zeigt das Gift eine gewisse Ähnlichkeit mit den Körpern, welche unter dem Sammelnamen der „Sapotoxine" zusammengefaßt werden, unterscheidet sich jedoch durch seine Unlöslichkeit in Alkohol, durch den Mangel der Glykosidnatur und die Art der pharmakologischen Wirkung bei den Kalkblütern (kurarinartige Wirkung) von den Sapotoxinen.

Die für das Ophiotoxin berechnete Formel zeigt eine Ähnlichkeit mit dem von FAUST aus dem Hautdrüsensekret der Kröte dargestellten Bufotalin; beide Körper enthalten die gleiche Anzahl von Kohlenstoff-

atomen, der erstere jedoch gerade doppelt soviel Sauerstoffatome wie der letztere ($C_{43}H_{46}O_{10}$), so daß sich Faust vorstellt, daß das Kohlenstoffskelett beider Verbindungen das gleiche ist und das Ophiotoxin nur mehr Hydroxylgruppen enthält als das Bufotalin, eine Annahme, welche auch den Mehrgehalt des Ophiotoxins an Sauerstoff, seine größere Labilität und vielleicht auch größere Wirksamkeit erklären würde. Es ist möglich, daß es sich bei den Amphibien und Reptilien um analoge Stoffwechselvorgänge handelt; da das Bufotalin wahrscheinlich ein Oxydationsprodukt des Bufonins ($C_{34}H_{54}O_2$), eines im Organismus der Kröte vorkommenden Homologons des menschlichen Cholesterins ist, wäre es nicht ausgeschlossen, daß auch im Schlangenorganismus sich ein dem Bufonin der Kröte ähnliches, den Ophidiern eigentümliches cholesterinartiges Stoffwechselprodukt findet, welches durch Oxydation das äußerst wirksame Ophiotoxin liefern könnte.

Reinigung des Bienengiftes durch Fällung mit Ammoniak nach Langer.

Anhangsweise möge die bereits früher erwähnte Reindarstellung des Bienengiftes hier im Zusammenhange mit den anderen Reinigungsmethoden kurz berührt werden; die Befreiung des Giftes von den anhaftenden Eiweißkörpern gelang Langer dadurch, daß er die 2%ige wässerige Giftlösung bei 40° einengte und tropfenweise mit konzentriertem Ammoniak fällte, wodurch ein dicker, käsiger Niederschlag entsteht, welcher die wirksame Substanz enthält, während im Filtrat die unwirksamen, Biuretreaktion gebenden Körper sich vorfinden. Der Niederschlag kann durch Lösen in schwach essigsäurehaltigem Wasser und abermaliges Fällen mit Ammoniak sowie eine Wiederholung dieser Prozedur gut gereinigt werden. Der endlich resultierende Körper gibt die typische Konjunktivalreaktion und ist frei von Substanzen, welche eine Biuret-, Xanthoprotein-, und Millonsche Reaktion geben; der Körper fällt nicht mit Sublimat. Silbernitrat und Bleiacetat, wohl aber durch die üblichen Alkaloidreagentien (Jodquecksilberkalium, Phosphorwolframsäure, Jodjodkalium, Kaliumkadmiumjodid, Jodwismuthkalium, Tanninlösung und Pikrinsäure), so daß Langer das wirksame Prinzip des Akuleatengiftes auf Grund dieser Ergebnisse für eine Base anzusehen geneigt ist.

5. Fällung und Isolierung durch Adsorption und durch Wirkung von Kolloiden.

Bereits früher wurde auseinandergesetzt, daß zahlreiche Fällungen der Antigene, die man früher durch mechanisches Mitreißen zu erklären versuchte, wohl richtiger als durch Adsorption bedingt aufzufassen sind und neuere Untersuchungen, insbesondere von Landsteiner und seinen Mitarbeitern, W. Biltz, Neisser und Friedemann haben gezeigt, daß die Erscheinungen der Adsorption durch anorganische und organische Kolloide bei den Immunphänomenen überhaupt eine große Rolle zu spielen scheinen; es ist die Erwartung nicht unbegründet, daß das hier in Frage kommende Gebiet der physikalischen Chemie durch die Immunstudien manche Befruchtung und Anregung erfährt. Hier ist ferner auf die in jüngster Zeit so häufig geübte Methode der sogenannten Komplementablenkung von Bordet und Gengou, Moreschi, Neisser und Sachs, A. Klein, auf die von Dehne und Hamburger beobachteten Phänomene

und ähnliche andere zu verweisen, die wohl ebenfalls als kolloidalen Adsorptionserscheinungen aufzufassen sind. An dieser Stelle kann nur auf einige Methoden hingewiesen werden, welche für die Darstellung oder Reinigung bestimmter Antigene verwendbar sind, während die eingehendere Diskussion der hierher gehörigen Fragen und Phänomene den speziellen Kapiteln dieses Handbuches überlassen bleiben muß (siehe das Kap. über Kolloide von O. PORGES, II. Bd.). Nur so viel sei hier einleitend bemerkt, daß alle bisherigen Erfahrungen mit den verschiedenen Adsorbentien darauf hindeuten, daß es sehr wesentlich auf die Natur der Adsorbentien ankommt, wobei sowohl die chemische Zusammensetzung als auch die physikalischen Eigenschaften (elektrische Ladung) eine große Rolle zu spielen scheinen.

Die verschiedenen bei den Antigenen zur Isolierung derselben angewandten anorganischen und organischen adsorbierenden Mittel wurden vielfach bereits bei der Darstellung von Fermenten verwendet und wir verdanken beispielsweise die ersten gelungenen Isolierungsversuche des peptischen Fermentes derartigen von ERNST BRÜCKE durchgeführten Adsorptionsversuchen mit phosphorsaurem Kalk oder Cholesterin; in der Folge wurden derartige Adsorptionserscheinungen von Fermenten an Körper mit großer Oberfläche sehr häufig beobachtet und sie sind neuerdings systematisch von GLÄSSNER, F. DAUWE, REICHEL und SPIRO, JACOBY u. a. studiert worden.

Ganz analoge Verhälnisse trifft man auch bei den Antigenen an. Die ersten hierher gehörigen Isolierungsversuche mittels Adsorption haben in vollständiger Analogie mit den alten BRÜCKEschen Pepsinversuchen ROUX und YERSIN beim **Diphtherietoxin**, VAILLARD und VINCENT beim **Tetanustoxin** angestellt. ROUX und YERSIN verfuhren derart, daß sie zunächst Calciumphosphat als Absorptionsmittel verwendeten, indem sie zu einem Diphtheriekulturfiltrat tropfenweise und unter Umrühren eine Calciumchloridlösung zusetzten; es entsteht ein Niederschlag der sich am Gefäßboden sammelt; falls man nicht genügend Chlorcalcium zugesetzt hat, kann man durch einen zweiten und eventuell einen dritten Chlorcalciumzusatz zu der klar abgesetzten Lösung einen zweiten und dritten Niederschlag erzeugen; diese fraktionierte Fällung ist deshalb einer einmaligen vollständigen Fällung vorzuziehen, weil der erste Niederschlag neben dem Diphtherietoxin noch andere Bestandteile der Bouillon umfaßt.

Nach jeder Fällung nimmt der Giftgehalt der überstehenden Lösung ab, während die erhaltenen Niederschläge Toxingehalt annehmen. Man kann dieselben auf einem Filter sammeln und mit destilliertem Wasser auswaschen; im allgemeinen besitzt der zweite Niederschlag den bedeutendsten Giftwert. Die Giftigkeit wird derart geprüft, daß der erhaltene Niederschlag unter die Haut, eventuell in Hauttaschen den Versuchstieren beigebracht wird; ein derartiges Giftpräparat läßt das Gift jedoch bedeutend langsamer zur Resorption gelangen, als etwa die native Giftbouillon, da das Calciumphosphat das Toxin ziemlich energisch festhält. Das im Vakuum getrocknete Pulver wirkt schwächer als der feuchte Niederschlag, löst sich schwerer in sauren Flüssigkeiten und wird auch schlechter resorbiert; doch bewahrt er unverändert seine toxischen Eigenschaften länger als das Kulturfiltrat; der feuchte Niederschlag kann bei 70° und auf dem Wasserbade bei 100° ohne Schädigung erhitzt werden. In Alkohol ist der Niederschlag unlöslich, am Platinblech verbrannt liefert er einen Horngeruch, im zugeschmolzenen Gefäß erhitzt entwickelt er Ammoniak.

Ein zweites von Roux und Yersin mit Erfolg benütztes Mittel, das jedoch schon schlechtere Ausbeute an Toxin lieferte, war der aus gelatinösem Aluminiumhydroxyd bestehende Niederschlag, der durch Zusatz von Aluminiumchlorid zur Diphtheriebouillon erzeugt worden war; dagegen reißt Tierkohle nach denselben Autoren nichts vom Toxin an sich, während Brieger beim Tetanustoxin wohl ein positives Resultat erhielt; doch konnte er das Toxin von der Kohle nicht mehr trennen; Schütteln der Tetanuskultur mit Meerschaum lieferte dem letzteren Autor ein negtives Ergebnis.

Vaillard und Vincent haben in gleicher Weise wie Roux und Yersin das Tetanustoxin aus den Kulturflüssigkeiten mit Calciumchlorid oder mit Aluminiumphosphat auszufällen versucht. Ein Teil des Giftes wird auf diese Weise niedergeschlagen; auch hier bleibt der im Vakuum getrocknete Niederschlag lange Zeit wirksam; $^{1}/_{2}$ mg des Phosphatniederschlages, welcher ein Meerschweinchen tötet, enthält nach diesen Autoren nichts mehr als $^{15}/_{100}$ mg organischer Substanz. Bei allen diesen Methoden können jedoch niemals größere, geschweige denn quantitative Ausbeuten erzielt werden; es handelt sich nahezu immer um relativ geringe Giftmengen, welche auf diese Weise aus der Bouillon absorbiert werden. Brieger hat derartige „mechanische" Ausfällungen des Tetanustoxins ebenfalls erzielt durch sukzessive Behandlung der keimfreien Kulturfiltrate mit Chlorcalcium und phosphorsaurem Natron, wobei jedoch zu bemerken bleibt, daß das nach den früher beschriebenen Methoden „gereinigte" Tetanusgift auf diese Weise nicht niedergerissen wird; ähnliche Fällungen hat Brieger erhalten durch Eingießen einer alkoholischen Stearinsäurelösung, ferner durch Seifenlösungen mit nachfolgender Zersetzung durch Chlorcalcium oder Alaun; anhaltendes Schütteln mit Wasser setzt aus diesen Niederschlägen im feuchten oder getrockneten Zustande das Tetanusgift wieder in Freiheit. Das aus diesen Prozeduren hervorgegangene Tetanusgift läßt größtenteils die Biuretreaktion vermissen und wird auch durch Ammoniumsulfat nicht mehr niedergeschlagen. Benzidinfarbstoffe, so z. B. das von Brieger verwendete Brillant-Purpurine B, welches in Peptonlösungen bei Zusatz einiger Tropfen Essigsäure prachtvoll gefärbte voluminöse Niederschläge erzeugt, vermochte das gereinigte Tetanustoxin nicht zu fällen.

Bereits v. Behring hatte die abschwächende Wirkung von Palladiumasbest auf Toxine beobachtet und Biltz, Much und Siebert haben die Wirkung weiterer hauptsächlich anorganischer Adsorbentien auf Diphtherie und Tetanustoxin geprüft, wenn auch ursprünglich mit der Fragestellung, ob nicht die anorganischen Adsorbentien die supponierte adsorbierende Wirkung der Antikörper bis zu einem gewissen Grade ersetzen können. Von derartigen anorganischen Adsorptionsmitteln würden auf die beiden Toxine — das Diphtherie- und Tetanustoxin — die Hydrogele des Eisenhydroxyds und des Zirconhydroxyds in der Weise einwirken gelassen, daß die betreffenden Toxine mit dem Hydrogel in 25 ccm fassenden Fläschchen mit sterilem Korkverschluß vier Stunden geschüttelt wurden. Das Gemenge von Gift und Hydrogel wurde durch Zentrifugieren und Filtrieren getrennt, und der Giftwert des Filtrates bestimmt.

Die Darstellung des dabei verwendeten kolloidalen Eisenhydroxyds erfolgte aus einer warmen 10$^{0}/_{0}$igen Ferrisulfatlösung durch Fällen mit Ammoniak im Überschusse; der Niederschlag muß sorgfältig mit Wasser bis zur völligen Sulfatfreiheit ausgewaschen werden; das Zirconhydroxyd wurde aus Zirconnitrat von Merck in derselben Weise hergestellt, und

der Niederschlag salpetersäurefrei gewaschen*). Es ergab sich, daß die beiden Hydrogele ungefähr gleich stark entgiftend auf Tetanustoxine wirken, indem der direkte Giftwert der Lösungen um das zehnfache, der indirekte um etwa die Hälfte abnimmt.

LANDSTEINER und BOTTERI prüften in ähnlicher Weise eine große Anzahl organischer Stoffe, insbesondere solche, welche Bestandteile tierischer Gewebe bilden, auf Tetanustoxin und fanden, daß das Tetanustoxin im Gegensatze zu pflanzlichen Agglutininen und normalen Serumagglutininen keine erhebliche Affinität für gewisse untersuchte Eiweißkörper, wie das Kasein, koaguliertes Serumeiweiß, Legumin, Konglutin besitzt; dagegen zeigte sich, daß manche Lipoide, wie das Lecithin und Cholesterin, insbesondere aber das Protagon den Giftlösungen derart Gift zu entziehen vermag, daß entweder eine Verzögerung oder eine Aufhebung der Giftwirkung der Lösung eintritt, während die Giftwirkung an die Adsorbentien übergegangen war, so daß man mit Cholesterin, welches Toxin adsorbiert hatte, Tiere unter Tetanuserscheinungen töten konnte. Das Protagon vermag nicht allein das Tetanustoxin aus den Lösungen aufzunehmen, sondern auch mit dem Gifte Verbindungen zu bilden, die im Tierkörper sogar teilweise beständig sind. Freilich erwiesen sich in anderen Fällen Protagon-Tetanustoxinverbindungen, sowie die analogen Cholesterinverbindungen als im Tierkörper teilweise spaltbar. Auf die Bedeutung dieser interessanten Befunde für weitere theoretische Erörterungen kann hier nur verwiesen werden.

LINGELSHEIM, der insbesondere die absorbierende Wirkung verschiedener Pflanzenschleime auf Antigene prüfte, fand den Schleim des Karragenmooses, das sogenannte Karragen als Adsorbens äußerst wirksam. Derselbe wird von zwei Algenarten geliefert und enthält ca. 80 % Schleim (Pararabin) und etwa 9,5 % Proteinsubstanzen; zu Versuchszwecken verwendete LINGELSHEIM ein bei Zimmertemperatur zähflüssiges, gut filtriertes Dekokt, das 1—1,3 % Trockensubstanz enthielt.

Von diesem Schleim wirken bereits einige Tropfen eiweißfällend, insbesondere nach Ansäuerung und es gelingt auf diese Weise noch eine 500fache Verdünnung von Serum oder Hühnereiweiß nachzuweisen; statt Säurezusatz können auch lösliche Kalksalze angewendet werden. Der Niederschlag mit Karragen ist unlöslich in destilliertem Wasser und Säuren, löslich dagegen — in frischem Zustande — in schwachen Alkalien und Kochsalzlösung. Albumosen werden ebenfalls gefällt und zwar in salzfreier Lösung schon bei neutraler oder auch ganz schwach alkalischer Reaktion. Wie die Albumosen werden auch die Toxine und zwar sowohl das Diphtherie-, wie auch das Tetanustoxin quantitativ ausgefällt. Will man dabei den bei salzhaltigen Lösungen hierzu nötigen starken Säurezusatz vermeiden, so müssen vorher die Salze durch Dialyse entfernt werden. Die Niederschläge sind, wie die im Serum erzeugten, in Kochsalzlösungen und Alkalien löslich. Dabei zeigten sie beim Diphtheriegift jene Giftigkeit, welche der kompleten Giftausfällung entsprach.

Ein dem VON LINGELSHEIMschen im Prinzip nicht unähnliches Verfahren, das sich wohl auch zur Bearbeitung von Toxinen und Antigenen überhaupt brauchbar erweisen könnte, haben L. MICHAELIS und P. RONA ausgearbeitet; dasselbe beruht auf der von BECHHOLD, NEISSER

*) Bezüglich der Darstellung weiterer kolloidaler Lösungen sei auf die Arbeiten von W. BILTZ: Berichte der Deutschen chem. Gesellschaft Bd. XXXV, pag. 4431 (1902) und Bd. XXXVII, pag. 1096 (1904) verwiesen, siehe PORGES, II. Bd.

und Friedemann studierten Fällbarkeit verschiedener Kolloide durch Mastixemulsionen und die Ausflockung der letzteren durch Zusatz geringer Mengen von an und für sich unwirksamen Salzmengen (Metallionen).

Die Methode von Michaelis und Rona, welche zur Ausfällung sowohl koagulierbarer Eiweißkörper (Enteiweißung von Eiweißlösungen), als auch bestimmter unkoagulierbarer Albumosen brauchbar ist, gestaltet sich folgendermaßen: Ein Volumen unverdünnten Blutserums wird mit dem dreifachen Volumen absoluten Alkohols gefällt; dazu fügt man nach einigen Stunden, eventuell, wenn man den Niederschlag entfernt, sofort ein Volumen 50%iger Lösung von Mastix in absolutem Alkohol; hierauf wird verdünnt, bis der Alkoholgehalt der Gesamtflüssigkeit höchstens noch 30% beträgt, schwach mit Essigsäure angesäuert und pro Liter Flüssigkeit mit etwa 10—15 ccm 10%iger Lösung von Magnesiumsulfat versetzt. Die eiweißfreie Flüssigkeit kann sofort abfiltriert werden. Statt Magnesiumsulfat kann man die gleiche Menge gesättigter Kupferacetlösung, wobei das Kupfer leicht mit Schwefelwasserstoff entfernt werden kann, verwenden. Sind Albumosen auszufällen, so wird in ähnlicher Weise vorgegangen, doch ist dabei zu beachten, daß Albumosen zum Unterschiede von Serumeiweiß bereits ohne Zusatz eines Elektrolyten (Salzes) mit einer Mastixemulsion ausfallen: nur bei Sodazusatz entsteht keine Fällung; sie tritt erst bei nachträglichem Ansäuern auf. Es kann demnach bei Entfernung von Gemischen koagulabler Eiweißkörper und Albumosen das Verfahren derart vereinfacht werden, daß man das mit Alkohol gefällte und nach dem Verjagen des größeren Teiles des Alkohols auf dem Wasserbade durch Digestion mit Wasser erhaltene Albumosengemisch unmittelbar vor dem Mastixzusatz durch Soda schwach alkalisch macht; dadurch wird zunächst bei Gegenwart von Albumosen die Fällung unterdrückt und sie tritt erst ein, wenn man nach dem Mastixzusatze mit Essigsäure schwach ansäuert und die Salzlösung zufügt. Die durch Mastix fällbaren Eiweißspaltungsprodukte gehören ausschließlich zu den aussalzbaren Albumosen, doch sind nicht alle aussalzbaren Albumosen durch Mastix fällbar. Aus der Mastixfällung können dieselben dadurch gewonnen werden, daß der auf der Nutsche gut abgepreßte Niederschlag auf einem Tonteller getrocknet und dann im Soxhlet gründlich mit Chloroform von Mastix befreit wird; aus dem zurückgebliebenen Eiweißpeptongemisch können durch wiederholte Extraktion mit Wasser die Albumosen mehr oder minder vollständig gewonnen werden.

Von Toxinen wurde weiters insbesondere beim **Ricin** und **Abrin** die Wirkung verschiedener Absorptionsmittel beobachtet. So berichten Stillmark und Cushny, eine der merkwürdigsten Eigenschaften des Ricins sei es, daß dasselbe mit allen Niederschlägen, besonders mit anderen Proteiden niederfällt. Wenn z. B. eine Lösung des Ricins, durch welche stundenlang ein Kohlensäurestrom durchgeleitet worden war, ohne einen Niederschlag zu erzeugen, zu Blutserum zugesetzt wird und jetzt Kohlensäure durchgeleitet wird bis ein Niederschlag entsteht, so ist dieser letztere sehr giftig und bleibt es, selbst nachdem er lange ausgewaschen worden war. Oder wird zu einer Ricinlösung, die mit Salzsäure ausgefällt worden war und mit dieser Säure keine weitere Trübung mehr gab, eine Eiweißlösung zugesetzt, in welcher die Salzsäure einen Niederschlag erzeugt, so haftet diesem Niederschlag das Ricin an. Aber auch an geronnenem Eiweiß klebt das Ricin; wenn man Fibrinstücke in Ricinuslösungen einige Zeit liegen läßt, so kann das Gift durch Waschen mit Wasser und Kochsalz

bis zum Verschwinden der Proteinreaktionen im Waschwasser vom Fibrin nicht mehr getrennt werden; erst beim Waschen mit einer Sodalösung nimmt die Waschflüssigkeit das Gift auf. Dagegen gelingt es nicht, wie JACOBY gezeigt hat, in Ricinlösungen, welche nach einer alten Beobachtung von SCHAER mit Wasserstoffsuperoxyd Niederschläge geben, welche indifferente Ricineiweißkörper enthalten, auch den wirksamen Körper niederzuschlagen; derselbe bleibt in Lösung. Doch kann man das Ricin auch mit andersartigen Absorbentien gewinnen. Wenn man z. B. eine Ricinlösung mit einer Barytlösung mischt, einen etwaigen Niederschlag abfiltriert und dann den Baryt mit Kohlensäure ausfällt, so enthält der Baryumkarbonat-Niederschlag viel Ricin; ebenso konnte CUSHNY aus sauerer Ricinlösung mit benzoesaurem Natrium einen giftigen Niederschlag erhalten.

LANDSTEINER und STANKOVIČ haben die Fähigkeit sowohl des Ricins als auch des Abrineiweißes, von verschiedenen Stoffen adsorbiert zu werden, systematisch untersucht und dabei festgestellt, daß sowohl das Eiweiß der Abrin- und Ricinlösungen, als auch die wahrscheinlich aus Eiweiß bestehenden, in diesen Lösungen enthaltenen Agglutinine von den verschiedensten festen Proteinsubstanzen, wie z. B. Kasein, Fibrin, koaguliertes Serumeiweiß, Seide gebunden werden; die entstehenden Verbindungen lassen sich durch Erwärmen, ferner durch Einwirkung von Säuren und Basen teilweise wieder zerlegen, eine Beobachtung, die neuerdings auch JACOBY bei der Adsorption des Pepsins und Trypsins durch Eiweiß bestätigen konnte. Durch Behandeln von Kasein mit Acetanhydrid, alkoholischer Schwefelsäure, Acetylchlorid wird dessen Bindungsvermögen für Abrinagglutinin vermindert oder aufgehoben und kann durch Verseifen der gebildeten Produkte wieder hergestellt werden. Die Aufnahme des Abrinagglutinin durch die verschiedenen Eiweißkörper wird nach den Untersuchungen von LANDSTEINER und STANKOVIČ am besten durch folgende Tabelle dargestellt:

Tabelle 7.

Eiweißgehalt der Abrinlösung in Promillen*)	Adsorption durch	Agglutininabnahme in Prozenten
2,1	Kasein	50
0,7	„	90
0,4	„	90
0,02	„	100
0,7	Fibrin	20
0,4	„	20—30
0,04	„	50—75
0,8	Formaldehyd-Casein	50
0,35	„ „	50
0,02	Serumeiweiß, feucht	33
0,2	Seide	50
0,02	„	90—100

Bemerkenswert bleibt dabei, daß mit wachsender Spezifität der Agglutinine (Abrin, Ricin, normale Serumagglutinine, Immunagglutinine) die Eigenschaft der Antigene, von den angewendeten Proteinsubstanzen aufgenommen zu werden, abnahm; das zeigte sich auch darin, daß Crotin,

*) Eine Abrinlösung von 1 ‰ Eiweiß agglutinierte in 500facher Verdünnung eben noch die doppelte Menge 5%iger gewaschener Gänseblutaufschwemmung.

welches verhältnismäßig wenige Blutkörperchenarten agglutiniert, bereits viel schlechter von den Proteinen adsorbiert wird, als Abrin und Ricin. Auch Kaolin, geschlemmte Kreide und Tierkohle absorbieren Abrin, wobei der dadurch bedingte Eiweißverlust der Abrinlösungen dem Agglutininverlust parallel geht.

Die **spezifische Absorption hämolytischer** und **bakterizider Substanzen**, sowie der betreffenden **cytolytischen Komplemente** wurde in der von Ehrlich und Morgenroth einerseits und von Bordet, Bordet und Gengou andererseits geführten Diskussion über die Einheit und Vielheit der Komplemente vielfach angewendet und wir verdanken diesen Forschern, insbesondere aber Ehrlich eine ganze Reihe von Trennungsmethoden, die, wie auch wohl die neuerdings vielfach geübte Methode der Komplementablenkung im wesentlichen auf das Phänomen der spezifischen Absorption zurückzuführen sind. Da diese Methoden in einem speziellen Kapitel dieses Handbuches*) erörtert werden, braucht hier auf dieselben nicht näher eingegangen zu werden. Die gleichen Methoden spielen eine ausschlaggebende Rolle bei der Trennung und Darstellung der **Hämagglutinine, Bakterienagglutinine** und **Präzipitine** und sie wurden auch des öfteren verwendet, um eine Reindarstellung mancher dieser Körper zu ermöglichen. Da liegt es in der Natur der Methode, daß eine völlige, den chemischen Anforderungen entsprechende Isolierung von den die Antigene scheinbar begleitenden Substanzen auf dem Wege der spezifischen Absorption nicht gelingen kann, da ja die spezifischen Adsorbentien selbst wieder zumeist Eiweißkörper sind, deren Natur uns unbekannt ist. Man kann dann nur gewisse indirekte Schlüsse auf die Natur des zu reinigenden Körpers ziehen, denen man jedoch bloß sehr bedingte Giftigkeit zuschreiben kann, ganz besonders dann, wenn es sich um die äußerst schwer zu entscheidende Frage handelt, ob der betreffende Körper als Eiweißkörper anzusehen ist oder nicht, wie bei den Darstellungsversuchen des Hämolysins von Belfanti und des hämolytischen Amboceptors von Moreschi, Versuche, die schon infolge der eingeschlagenen originellen Methodik Interesse verdienen. Die spezifische Absorption wurde auch zur chemischen Darstellung und Reinigung der Normal- und Immunserumagglutinine und zwar sowohl der Bakterien, als auch der Hämagglutinine herangezogen, zum erstenmal von Hahn und Trommsdorff, dann von Landsteiner und Jagič, Verfahren, die so sehr mit den hier zu besprechenden Phänomenen zusammenhängen, daß sie jetzt schon Erwähnung verdienen.

Die Reinigung der Bakterienagglutinine**) nach Hahn und Trommsdorff besteht darin, daß die mit Typhusimmunserum agglutinierten Typhusbakterien durch Zentrifugieren und Waschen mit Kochsalzlösung von den Resten des spezifischen Serums befreit, mit $^1/_{100}$ Normalnatronlauge überschichtet, durchgeschüttelt und eine Stunde bei 37^0 digeriert werden. Die Natronlauge extrahiert auf diese Weise das von den Bakterien adsorbierte spezifische Serumagglutinin. In gleicher Weise kann auch mit anderen Bakterien, so z. B. mit Cholerabakterien, der Versuch durchgeführt werden. Die Fähigkeit des Extraktes, mit Bakterien spezifisch zu agglutinieren, bleibt auch in neutralisierter Lösung erhalten; die Extraktion gelingt in gleicher Weise, wenn statt Natronlauge $^1/_{100}$ Normalschwefelsäure verwendet wird.

---

*) Siehe Sachs, II. Band.

**) Siehe Pribram, II. Band.

Landsteiner und Jagič benützten dasselbe Prinzip der Spaltung der Agglutininverbindung zur Reinigung der die roten Blutkörperchen agglutinierenden Substanz des Normalserums, wobei es den Autoren gelang, die wirksamen Stoffe von dem größten Teile des Serumeiweißes zu trennen. Aus Gänseblutkörperchen werden durch Behandlung mit Toluol und Wasser Stromata hergestellt und dieselben mit einer größeren Menge Rinderserums, das vorher kurz auf 55° erhitzt worden war, durchgemischt und an einem kühlen Ort über Nacht stehen gelassen; der kräftig agglutinierte Bodensatz wird durch Zentrifugieren gut gewaschen und hierauf mit 0,8%iger Kochsalzlösung durch 30 Minuten bei 45° digeriert. Diese Digestionsflüssigkeit agglutinierte bereits in derselben Verdünnung wie das ursprüngliche Serum rote Blutkörperchen und wies ca. 2‰ Eiweiß auf. Dieselbe ließ sich bei 40° im Vakuum eindampfen, ohne dabei ihre Wirkung zu verlieren, so daß man auf diese Weise die Agglutinationskraft um etwa das zehnfache steigern konnte. Die eingedampfte Lösung gab, mit dem gleichen Volumen konzentrierter Ammonsulfatlösung versetzt, einen Niederschlag, der nahezu alle agglutinierenden Substanzen enthielt. Die so erhaltenen agglutinierenden Lösungen enthielten jedoch immer noch Eiweißkörper, die sich durch die spezifische Absättigung als verschieden von den Agglutininen erwiesen. Bemerkenswert ist, daß derartige Flüssigkeiten auch „präcipitable" Substanzen enthielten, die bei dem Agglutinationsvorgang also absorbiert worden waren. In völlig analoger Weise konnten dieselben Autoren aus mit normalem Rinderserum agglutinierten Typhusbakterien antibakterielle und agglutinierende, aus mit Kaninchenimmunserum agglutinierten Vibrionen agglutinierende Stoffe gewinnen; ebenso gelang auch die Darstellung präzipitierender Lösungen aus Eiweißpräzipitaten, die mit spezifischen Immunseren erhalten worden sind, sowie die Abspaltung von Autospermaagglutinin und Heterohämagglutinin (für Pferde- und Taubenblut) aus mit zugehörigem Serum agglutinierten Stiersperma durch Digerieren mit Kochsalzlösung bei 50°.

Die von Belfanti unternommene Darstellung des an das Pseudoglobulin des Serums gebundenen Hämolysins gestaltete sich folgendermaßen: Rote Kaninchenblutkörperchen, auf welche das Pseudoglobulin hämolytisch wirkte, wurden gründlich gewaschen, bis jede Spur der Eiweißkörper des Serums verschwand, das aus dem Serum gewonnene dialysierte und getrocknete hämolytische Pseudoglobulin wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und zu dem Versuch diejenige Pseudoglobulin-Menge verwendet, welche ein Kaninchen bei intravenöser Injektion binnen weniger Minuten zu töten vermochte. Nunmehr werden rote Blutkörperchen und die Pseudoglobulinlösung mehrere Stunden miteinander digeriert, hierauf zentrifugiert, so daß einerseits die Pseudoglobulinlösung, andererseits die gut gewaschenen, globulinfreien rothen Blutkörperchen wieder erhalten werden. Während durch diese Behandlung die Pseudoglobulinlösung ihre tödliche Wirkung völlig eingebüßt hatte, wurde die hämolytische Substanz von den roten Blutkörperchen absorbiert, welche nunmehr die gleiche tödliche Wirkung auf Kaninchen besaßen, wie vorher das Globulin. Ein mit Gehirnzellen angestellter Absorptionsversuch ergab ebenfalls ein positives Resultat. Belfanti zieht aus diesen Versuchen den Schluß, daß das Hämolysin nicht eine Eigenschaft des Globulinmoleküls ist, sondern eine Substanz für sich, die sich ziemlich fest an Eiweiß verankert, es jedoch verläßt, wenn es eine andere Substanz vorfindet, für die es eine größere Affinität besitzt. Auch Moreschis

Schlußfolgerungen über die Nichteiweißnatur des hämolytischen Amboceptors beruhen auf einer ähnlichen Versuchsanordnung, vor Allem auf dem Befunde, daß eine Antikomplementwirkung, welche dann zustande kommt, wenn die Bedingungen zur spezifischen Präzipitation bei Gegenwart eines freien Amboceptors gegeben sind, nicht eintritt, wenn an Stelle des Amboceptors nur beladene und gut gewaschene Blutkörperchen verwendet werden; die antikomplementäre Wirkung bleibt auch dann aus, wenn zur Beladung der Blutkörperchen Präzipitinogenserum benutzt wird, sofern nicht anderweitiges hämolytisches Serum der Mischung zugesetzt wurde. Wie weit der Schluß, den Moreschi zieht, daß nämlich der von den Blutkörperchen dem Immunserum entzogene Amboceptor kein Eiweißkörper sein kann, berechtigt ist, muß vorläufig dahin gestellt bleiben.

Hier wäre ferner noch an die Möglichkeit zu erinnern, daß auch Antitoxine im Tierkörper durch Prozesse, welche der spezifischen Absorption wohl nahe stehen, an andersartige Antigene gebunden werden können, wie dies die interessanten Versuche von Dehne und Hamburger zeigen, welche durch Bindung des Pferdeserum-Präzipitinogens auch eine gleichzeitige Fixierung des Antitoxins von Tetanuspferdeserum erzielen konnten. (Siehe auch Kraus und Pribram, G. Sacharoff).

Handelte es sich in den eben angeführten Fällen hauptsächlich um spezifische Absorption, so wären nunmehr eine große Zahl **nicht spezifischer Adsorbentien** anzuführen, mit deren Hilfe sowohl bakteriolytische als auch hämolytische Komplemente, sowie Agglutinogene aus ihren Lösungen entfernt werden können. Bereits Ehrlich und Sachs begründeten die ersten Trennungsversuche der verschiedenen Komplemente darauf, daß dieselben „durch Flächenanziehung an körnige Substanzen verschiedener Art anhaften“. Knochenkohle, Hautpulver, Lykopodium und Kieselgur erwiesen sich zur Absorption der Komplemente mehr oder weniger ungeeignet. Dagegen zeigten in Bestätigung früherer Angaben v. Dungerns organisierte Materialien, wie Staphylokokkenaufschwemmungen ein sehr gutes Absorptionsvermögen für Komplemente, ebenso wie auch Hefepulver schon in kleinen Mengen ein ausgezeichnetes Mittel darstellt, um ein Serum seiner komplettierenden Eigenschaften zu berauben; eine Trennung der verschiedenen Komplemente läßt sich jedoch auf diesem Wege der physikalischen Absorption nach Ehrlich und Sachs nicht durchführen und sie gelingt erst dann, wenn zur Absorption rote Blutkörperchen verwendet werden, welche nach diesen Autoren das Komplement chemisch zu binden vermögen. Immerhin konnte Neisser eine Trennung der Komplemente des Kaninchenserums dadurch erzielen, daß er durch Milzbrandbakterien die Absorption des für Milzbrandbakterien bakterisiden Komplementes herbeiführte, während das für Hammel- und Ziegenblutkörperchen wirksame hämolytische Komplement sich der Absorption entzog. v. Dungern verwendete zur Entfernung der Komplemente aus Kaninchenserum mit Erfolg Flimmerepithelien der Rindertrachea, Hefezellen, Bakterienaufschwemmungen, sowie Körperzellen der verschiedensten Organe, darunter auch jene des gleichen Tieres; Leber, Milz, Niere, Hoden, Lungen und Gehirn verschiedener Säugetiere und Vögel waren imstande das Kaninchenserum komplementarm zu machen.

Eingehende Absorptionsversuche derselben Substanzen, nämlich der Alexine im Buchner-Bordetschen Sinne, haben zunächst O. Bail und dann M. Wilde angestellt; ersterer hat Untersuchungen über die Ein-

wirkung abgetöteter Bakterien auf die Serumalexine angestellt und konnte dabei feststellen, daß die Art der Abtötung, ob sie durch Hitze, Chloroform oder Äther erfolgte, für die alexinparalysierende Fähigkeit gleichgültig ist. WILDE hat gefunden, daß genügende Mengen durch Hitze abgetöteter, wie auch lebender Milzbrand-, Cholera- und Typhusbakterien, Hefezellen, roter Blutkörperchen, zertrümmerter Organzellen sowie unlösliche Eiweißstoffe, wie Aleuronat (HUNDHAUSEN), bei entsprechend langem Kontakt sowohl die bakterizide, wie auch die hämolytische Wirkung von Rinder-, Hunde- und Kaninchenserum beseitigen und auch den ersteren zwei Seren die Giftigkeit für den Meerschweinchenorganismus nehmen können. Diese Wirkung soll nach WILDE auch auf chemischer, nicht nur physikalischer Absorption beruhen und hängt nicht allein von der Menge der Absorbentien und der Kontaktzeit ab, sondern auch von der Temperatur, bei welcher die Mischungen gehalten werden, so daß bei sorgfältiger Einhaltung einer Temperatur von 0° keine oder nur ganz unzureichende Absorption eintritt, während sie bei Bruttemperatur (bei 37°) eine vollständige ist. Eine Trennung des gebundenen Alexins durch Kochsalzdigestion bei verschiedenen Temperaturen von dem Absorptionsmittel war nicht möglich. Die in vitro wirksamen Absorbentien vermögen nach WILDE auch in vivo Alexine zu adsorbieren. Die Absorption gelingt nicht durch Ultramarinpulver (BAIL), Tierkohle, Bolus und Karmin, welche in ca. 10%igen Aufschwemmungen angewandt worden waren. Indes hebt bereits v. LINGELSHEIM hervor, daß die bakteriziden und globuliziden Stoffe gegenüber Adsorbentien ein sehr verschiedenes Verhalten zeigen; so wurde das Milzbrandalexin sowohl aus Pferde-, wie Kaninchenserum durch Kohle sehr leicht entfernt, selbst Seidenfäden entziehen bei längerem Kontakte dieses Alexin, nicht aber das Typhusalexin und die globuliziden Stoffe. Dagegen verschwand das Typhusalexin aus dem Kaninchenserum bei Behandlung desselben mit manchen Pflanzenfasern, Baumwolle, Hanf, namentlich aber Flachs. Die Flachsfaser konnte nach mehrstündigem Kontakt auch die Hämolysine des Rinderserums, Schafserums, Schweineserums größtenteils beseitigen, wobei sowohl Amboceptoren, wie auch die Komplemente in Verlust gingen. Die allerbesten Erfolge hatte v. LINGELSHEIM mit dem bereits erwähnten Karragen; setzt man von einem solchen nach den früher beschriebenen Angaben bereiteten Karragenpräparat einige Tropfen zu einem frischen Blutserum hinzu, so tritt bei leichtem Schütteln sofort eine feine Trübung ein, die sich bald als gallertiger Niederschlag zu Boden setzt. Ein solches Serum zeigt dann weder bakterizide noch globulizide Wirkung; sowohl Amboceptor, als auch Komplement, letzteres jedoch nicht vollständig, sind ausgefällt worden. Eine Trennung beider ist durch Karragenschleim nicht möglich. Ein Serum, das durch längeres Stehen oder Erhitzen auf 55° inaktiv geworden ist, gibt mit dem Schleim keine Fällung mehr; man kann auf diese Weise nach v. LINGELSHEIM ein noch aktives und ein inaktiv gewordenes Serum ohne weiteres unterscheiden. Bei herabgesetzter Alkaleszenz gelingt die Ausfällung mit Karragen leichter. Außer den bakteriziden und globuliziden Substanzen entfernt der Karragenschleim noch vollständig die für Meerschweinchen bei intraperitonealer Applikation tödlichen und bei subkutaner Injektion nekrotisierend wirkenden Serumgifte. Die normalen Agglutinine und Lysine gegen Cholera bleiben dagegen unbeeinflußt.

Von der Absorption des Normal- und Immunhämolysins und der bakteriziden Substanz durch Aleuronataufschwemmungen und Pep-

tonlösungen hat Ernst Löwenstein festgestellt, daß die hämolytische und bakterizide Kraft des Hundeserums durch einen dreistündigen Kontakt mit diesen Substanzen aufgehoben wird. Dabei wird nur das Alexin gebunden, während der thermostabile Faktor, sowie der agglutinierende erhalten bleiben; ähnlich verhält sich auch Kaninchenimmunhämolysin, das durch Vorbehandlung mit Hundeblut erhalten wurde. Auch in vivo vermag die intravenöse Injektion von 10 ccm einer 40%igen Peptonlösung bei einem 2 kg schweren Hunde das hämolytische Alexin völlig zum Verschwinden zu bringen; analog setzt auch die intraperitoneale Peptoninjektion (1 ccm einer 50%igen Peptonlösung) bei Meerschweinchen die bakteriziden Fähigkeiten des Organismus herab.

Landsteiner und Stankovic haben eine größere Zahl von Substanzen in bezug auf ihr Absorptionsvermögen gegenüber Meerschweinchenserumkomplement (bei Zusatz von inaktiviertem, für Rinderblut hämolytischem Kaninchenserum) untersucht und darunter insbesondere die Lipoide, Cholesterin und Protagon, als gut für das Komplement aufnahmefähig gefunden, ähnlich wie auch Landsteiner und v. Eisler die Bindung des hitzebeständigen Teiles normaler Hämolysine durch Lecithin feststellen konnten. Aber auch Kaolin, Kasein, Kieselsäureeiweißfällung (1 ccm $^1/_{10}$ Rinderserum mit 3 ccm 1%iger Kieselsäurelösung versetzt), Abrineiweißfällung (gewaschener Niederschlag von 0,5 bis 1 ccm Rinderserum mit 1 ccm starker Abrinlösung) erwiesen sich als mehr oder minder gut absorptionswirkend, während Amylum, Serumeiweiß, Glykogen, Wittepepton entweder schwach oder gar nicht absorbierten. Nach Wendelstadt wird dagegen die Hämolyse durch Zusatz kleiner Mengen Glykogens beeinträchtigt. Ein Grund einer Trennung der Komplementabsorption durch nicht spezifische Eiweißniederschläge von der durch spezifische Präzipitate verursachten, besteht nach Landsteiner vorläufig nicht, zumal es ihm gelang, auch durch kolloidale Kieselsäure eine Komplementübertragung auf rote Blutkörperchen zu erzielen. Dabei wird die kolloidale Kieselsäure (nach Grimaux aus dem Kieselsäureäthylester dargestellt) in 0,1%iger Lösung in 1%iger Kochsalzlösung angewendet; das die Kieselsäure aktivierende Komplement kann aus frischem Kaninchenserum in der gleichen Weise durch Hefepulver, Staphylokokkenkulturen oder Einwirkung von Papayotin entfernt werden, wie die oben angeführten Komplemente, doch gelingt es dagegen nicht, durch Adsorption an rote Blutkörperchen die lösende Wirkung für gekieseltes Kaninchenblut aufzuheben. Von großem Interesse ist die von Landsteiner und Jagič gefundene Tatsache, daß Lecithin die Kieselsäure zur Hämolyse befähigt, da dadurch eine weitgehende Analogie zu den von Kyes und Sachs festgestellten Wirkungen des Lecithins als Aktivators bei der Schlangengifthämolyse gegeben ist.

Biltz, Much und Siebert haben in der bereits oben erwähnten Arbeit auch die gegenüber Milzbrandbazillen wirksamen bakteriziden Substanzen des normalen Pferdeserums, als auch das Hämolysin der Tetanusgiftlösungen, welches sie nach von Behrings Vorschlag als „hämolytische Tetanase“ bezeichnen, in bezug auf die Adsorption durch kolloidales Eisenhydroxyd, Circon, Thoriumhydroxyd und kolloidale Kieselsäure (aus käuflichem Wasserglas durch Salzsäurezusatz und Dialyse dargestellt) geprüft; es ergab sich, daß sowohl die bakterizide Substanz, wie auch das Hämolysin durch Schütteln mit den genannten anorganischen Kolloiden bedeutend abgeschwächt werden; von

Interesse ist dabei, daß Schütteln an und für sich ohne Zusatz eines fremden Absorbens eine Abnahme der bakteriziden und hämolytischen Wirkung herbeiführt. Die hämolytische Kraft wird durch Behandlung mit Eisenhydroxyd, Circon und Thoriumhydroxyd außerordentlich stark, durch Kieselsäure nur wenig beeinflußt, wobei zu bemerken ist, daß für wechselnde Konzentration der Tetanase bei gleicher Menge Hydrogel die Wirkung in verdünnten Lösungen relativ stärker ist als in konzentrierten.

Wassermann und Citron fanden, daß auch Glykogen und Pepton eine Komplementaufnahme zeigen, ebenso wie eine große Zahl anderer Stoffe, welche Uhlenhuth bei dem Studium des Phänomens der Komplementablenkung daraufhin untersuchte; inwiefern diese Tatsachen dem Komplement für die Verarbeitung der Nährstoffe eine Bedeutung verleihen (Wassermann und Citron), werden weitere Untersuchungen zu erbringen haben.

Zu den Adsorptionsphänomenen sind ferner zu zählen die in neuerer Zeit zahlreich beobachteten **Ausfällungen und Ausflockungserscheinungen von Bakterien und roten Blutkörperchen durch anorganische und organische Kolloide**, welche zu dem Zwecke, das Agglutinationsphänomen mit den bei den Kolloiden beobachteten Fällungserscheinungen in Einklang zu bringen, zuerst von Landsteiner, dann von Biltz, Neisser, Friedemann, Bechhold, Porges u. a. studiert wurden. In der Tat zeigen sowohl Bakterienaufschwemmungen, als auch jene der roten Blutkörperchen mit anorganischen und organischen Suspensionen zahlreiche zuerst bereits von Bordet beobachtete Analogien und sind zum Teil ganz ähnlichen Fällungsgesetzen unterworfen, so daß man bis zu einem gewissen Grade die spezifischen biologischen Agglutinine durch entsprechende Fällungskolloide ersetzen kann. Im allgemeinen scheint dabei die Bredigsche Anschauung Geltung zu haben, daß elektrisch entgegengesetzt geladene Kolloide sich ausfällen, während gleichsinnig geladene beim Mischen überhaupt keine Beeinflussung erfahren oder eine Schutzwirkung aufeinander ausüben; so müssen darnach elektronegative Kolloide durch Säuren (H (+) Ionen), elektropositive durch Basen (OH (—) Ionen) ausgefällt werden, und es hängen demnach bei elektronegativen Kolloiden die fällenden Eigenschaften der Salze wesentlich von dem Kation (+), bei den elektropositiven hauptsächlich von dem Anion (—) ab. Doch scheinen bei der Agglutination wohl auch noch andere Prozesse mitbeteiligt zu sein. Hier können nur diejenigen Fällungsmittel kurz angeführt werden, welche ein methodisches Interesse für eine eventuelle Darstellung der bezüglichen Antigene besitzen, indem wir bezüglich näherer Details der Kolloidfällung auf das spezielle Kapitel dieses Handbuches verweisen.

Das erste anorganische Kolloid, bei dem eine intensive Agglutination der roten Blutkörperchen, ähnlich, wie beim Ricin beobachtet worden war, war die kolloidale Kieselsäure, welche unter Koberts Leitung A. Siegfried in Form des angesäuerten kieselsauren Natriums anwandte und auch genauer pharmakologisch studierte. Landsteiner und Jagič haben die kolloidale Kieselsäure besonders in ihrem Verhalten zu Antigenen untersucht und gefunden, daß minimale Mengen dieses Kolloids zu einer Ausfällung roter Blutkörperchen genügen; für eine 2,5%ige Kaninchenblutaufschwemmung lag die untere Wirkungsgrenze bei einem Gehalte von 0,0005 – 0,0001 pro Mille der Lösuug an kolloidaler Kieselsäure, während A. Siegfried für das kieselsaure Natrium dieselbe bei 0,1 pro Mille fand. Die Kieselsäurelösung wirkt nach Land-

steiner und Jagič auch auf Spermatozoen in sehr geringen Konzentrationen agglutinierend und lähmend, während es diesen Forschern nicht gelang, Typhusbazillen damit zu agglutinieren. Die Größe der Absorption ist auch da von der Konzentration der angewandten Kieselsäurelösung abhängig; andererseits wird auch die fällende Wirkung der Kieselsäure auf Blutserum durch einen Überschuß des letzteren aufgehoben; auch durch Erwärmen, sowie durch längeres Stehenlassen einer 1%igen, Kochsalz enthaltenden Kieselsäurelösung kann die letztere unwirksam gemacht werden. Von anderen anorganischen Kolloiden, welche von den genannten Autoren auf ihr Agglutinationsvermögen gegenüber Kaninchenblutaufschwemmungen und auf das Ausflockungsvermögen von verdünntem Pferdeserum mit positivem Ergebnis geprüft worden waren, seien erwähnt: Wolframsäure, Molybdänsäure, Eisenhydroxyd, Aluminiumhydroxyd, Zinnsäure, ferner kolloidale Lösungen von Metallen, Schwefel, Farbstofflösungen; auch Tierkohle übt eine agglutinierende Wirkung auf Blutkörperchen aus. Dabei ist es charakteristisch, daß kolloidale Lösungen der Hydroxyde schon in sehr geringen Konzentrationen agglutinierend wirken, während die Hämagglutination durch Kristalloide, Elektrolyte oder auch Nichtelektrolyte (Alkohol, Pikrinsäure, Salze, Säuren etc.) nur eine geringfügige war und auch da erst bei höheren Konzentrationen dieser Substanzen auftrat. Auf das unterschiedliche Verhalten der Bakteriensuspensionen gegenüber Nichtelektrolyten wird weiter unten hingewiesen. Eine kräftige Agglutination tritt auch dann ein, wenn Blutkörperchensuspensionen nicht allein mit gelösten Kolloiden, also Hydrosolen, zusammengebracht werden, sondern wenn man ausgefällte Kolloide, Hydrogele, verwendet oder andere schwer lösliche Niederschläge anorganischer Salze. So agglutinieren sehr kräftig rote Blutkörperchen mit Eisenhydroxyd, welches mit Kochsalz ausgefällt worden war, mit flockig suspendiertem Berlinerblau, mit Aufschwemmungen von Baryumsulfat, Fluorcalcium u. a. (Gengou, Landsteiner und Jagič.)

Neisser, Friedemann und Bechhold, welche systematisch die Ausflockungserscheinungen an verschiedenen Kolloiden, ferner an mit Formol abgetöteten und an mit hochagglutinierendem Immunserum behandelten Typhusbakterien studiert haben, konnten zeigen, daß durch Säuren (Normallösungen von Schwefelsäure, Salzsäure, Essigsäure, Amidobenzoesäure), sowie durch Salze der Schwermetalle (Normallösungen von Silbernitrat, Quecksilbernitrat, Quecksilberchlorid, Bleiacetat, Kupferchlorid, Kupfersulfat, Kadmiumnitrat, Nickelacetat, Kobaltnitrat, Zinksulfat, Aluminiumsulfat, Eisensulfat) die Bakterien, insbesondere aber die agglutinierten Bakterien bereits in sehr geringen Konzentrationen (die geringste Salzkonzentration, bei der nach 24 Stunden noch Ausflockung eintrat, der sogenannte „Schwellenwert“, schwankte zwischen 0,0001 bis 0,0025—0,01 ccm) ausgefällt werden; dagegen sind zur Ausflockung durch die Salze der Alkalien, alkalischen Erden und Erdmetalle (Kochsalz, Natriumnitrat, Natriumsulfat, Rubidiumjodid, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid, Baryumchlorid) sehr hohe Konzentrationen nötig, oder die Ausfällung der Bakterien gelingt mit ihnen überhaupt nicht. Die Untersuchungen der genannten Autoren zeigen bezüglich der Fällbarkeit der Formol- und der Agglutininbakterien, daß Säuren für beide das gleiche Ausflockungsvermögen besitzen, daß jedoch die Schwellenwerte der Salze bei den Agglutininbakterien durchwegs viel tiefer gelegen sind als bei den Formolbakterien; insbesondere Salze der Metalle mit sogenannter

hoher Entladungsspannung, wie Natrium, Rubidium, Magnesium, Baryum und Calcium, welche auf gewöhnliche Bakterienaufschwemmungen gar nicht einwirken, zeigen für Agglutininbakterien ein relativ hohes Ausflockungsvermögen (Schwellenwerte von 0,0025—0,25 ccm), eine Tatsache, welche für das Verständnis der durch das Agglutinin gesetzten Zustandsänderung der Bakterien von Wichtigkeit ist. Nach Neisser und Friedemann liegt der Unterschied zwischen den zwei Bakterienarten darin, daß durch das Agglutinin die Wirkung eines in den Bakterien vorhandenen „Hemmungskörpers" aufgehoben werden soll, eines Stoffes, der sich aus Typhusbakterien mit destilliertem Wasser extrahieren läßt und welcher Mastixlösung gegen die Ausflockung durch Leichtmetalle zu schützen vermag.

Biltz, Much und Siebert haben auf Aufschwemmungen eintägiger Agarkulturen von Typhus und Kolibazillen in Wasser die Hydrosole der Hydroxyde von Eisen, Chrom, Circon, Thorium, Aluminium, Platin, Antimon, Vanadin, Zinn und Berlinerblau in verschiedenen Mengen einwirken lassen und innerhalb zweier Stunden die aus der folgenden Tabelle ersichtlichen Resultate erhalten:

Tabelle 8.

	Fe	Cr	Zr	Th	Al	Pt	Sb_2S_3	Vd_2O_5	Berlinerblau	Sn
Typhusbazillen	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0
Kolibazillen	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0
	+ Kolloide					— Kolloide				

Daß auch durch Nichtelektrolyte Bakterien gefällt werden, ist bereits seit Malvoz bekannt, der mit Formaldehyd, Wasserstoffsuperoxyd, Alkohol Typhusbakterien zu agglutinieren vermochte; hierher gehören auch die zahlreichen Farbstoffe wie Chrysoidin, Vesuvin, Safranin und andere (Blachstein, Engels, Malvoz, Neisser und Friedemann), welche verschiedene Bakterien in verschiedenem Maße zu agglutinieren vermögen. Auch in den Bakterien selbst erzeugte Niederschläge vermögen Bakterien leicht zur Ausfällung zu bringen, so z. B. werden Bakterien, welche mit Bleinitrat gefällt, gut ausgewaschen und zu einer homogenen Suspension in destilliertem Wasser wieder gebracht worden sind, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff, der an und für sich nicht Bakterien fällt, rasch ausgeflockt (Neisser und Friedemann).

Darstellung durch Lecithidbildung*).

Bereits früher wurde hervorgehoben, daß lipoide Substanzen bei der Adsorption von Antigenen eine große Rolle spielen und Ehrlich und dessen Schüler, denen wir vor allem die Erkenntnis der großen Bedeutung dieser bezüglich der Giftwirkung ja durch Hans Mayer und Overton schon lange gewürdigten Körper für die Antigenwirkung verdanken, haben mit Hilfe der Lipoide, im speziellen mit Hilfe des Lecithins, eine Reihe von tierischen Antigenen einer Reindarstellung unterzogen (vergl. auch pag. 437 nnd 438). Wir wissen, daß bei bestimmten Antigenen, vor

*) Siehe Sachs pag. 252.

allem bei verschiedenen hämolytisch wirkenden tierischen Giften, wie bei dem Schlangengift, Skorpionengift, Bienengift, den hämolytisch wirkenden Extrakten aus tierischen, wie auch menschlichen Organen und Organsäften durch Lecithinzusatz die hämolytische Wirkung um ein Vielfaches erhöht wird, so daß das Lecithin als ein diese Gifte aktivierendes Agens, als Aktivator, anzusehen ist. Die mit derartigen Lecithinemulsionen*) — benützt wurden neben der häufig verwendeten Marke Agfa der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation, Lecithinpräparate der Fabriken Merck (aus Eigelb dargestellt), Grübler-Leipzig, Riedel-Berlin u. a. — behandelten Antigene nehmen durchaus neue sowohl physikalische als auch chemische und wohl auch biologische Eigenschaften an und verhalten sich durchaus, wie völlig neue Körper; welcher Art diese Antigenlecithinverbindungen sind, darüber kann vorläufig kein abschließendes Urteil gefällt werden. Ehrlich und Kyes nehmen an, daß bei dieser Verbindung, welcher von ihnen der Name Lecithid beigelegt wurde, eine Synthese des hämolytischen Amboceptors (Kobraamboceptors) mit bestimmten Anteilen des Lecithins eintritt, Arrhenius und Noguchi glauben, daß es sich um einen mehr physikalischen, und zwar reversiblen Prozeß dabei handelt, und Bredig faßt die Beziehungen zwischen Kobragift und Lecithin als Adsorptionsverbindungen auf. Es muß zugestanden werden, daß durch die neuesten Untersuchungen von Michaelis und Rona, welche auch aus Albumosenlösungen durch Zufügen von Lecithin alkohol- und chloroformlösliche Niederschläge erhielten, die Annahme, daß es sich um Adsorptionsverbindungen handelt, wie sie zwischen kolloidalen Substanzen beobachtet werden, an Wahrscheinlichkeit gewinnt, zumal die Abspaltung von Fettsäureresten, welche für die chemische Synthese des Lecithids zu sprechen schien, durch Lüdecke und Neuberg und Rosenberg befriedigend durch einen von den Antigenen ausgehenden selbstständigen, durch Mangansulfat zu beschleunigenden Verseifungsprozeß des Lecithins erklärt werden konnte. Wir glauben daher mit einiger Berechtigung die Reindarstellung der Antigene durch Lecithide den oben behandelten Methoden anreihen zu können und halten bis auf weiteres an der Eiweißnatur der Kobrahämolysine fest.

Kyes, dessen Vorschrift für die Lecithiddarstellung beim Kobragift bereits früher (siehe pag. 437) gegeben wurde, hat für die Reindarstellung und für die Erzielung besserer Ausbeuten seine ursprüngliche Methode neuerdings modifiziert; vor allem ist nach Kyes für die Lecithidgewinnung die Gegenwart des Alkalis von ausschlaggebendem Einfluß, da die sauere Reaktion die Ausbeute an Lecithid bedeutend stört. Da die sauere Reaktion im Verlaufe des Ausschüttelungsprozesses bedeutend zunimmt, verfährt man derart, daß das geschüttelte Gemisch des Giftes und der Lecithinchloroformlösung sofort zur Hälfte neutralisiert und nach zweistündigem Schütteln die wiederum entstandene sauere Reaktion zur Hälfte abgestumpft wird; dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis eine Zunahme der Acidität nicht mehr zu beobachten ist. In der Regel wird das Verhältnis von Kobragift zu Lecithin so gewählt, daß 1 g Kobragift 2 g Lecithin entsprechen. Die schwierig zu trennende Chloroformschicht wird dadurch geschieden, daß man zu der Schüttelemulsion Äther und Alkohol zusetzt. Das Verfahren gestaltet sich demnach folgendermaßen:

400 ccm 0,5%iger Kobragiftlösung werden mit 400 ccm 20%iger Lecithin-Chloroformlösung durchgeschüttelt; von der Emulsion werden

*) Cerebrin und Protagon besitzen nach Kyes für das Kobrahämolysin keine Aktivierungsfähigkeit.

5 ccm entnommen und die Acidität dieser Probe durch Titrieren mit $^1/_{10}$ N Natronlauge festgestellt. (Zur Titration diente das Gemisch: 5 ccm Emulsion + 5 ccm Amylalkohol + 10 ccm Äthylalkohol + 3 Tropfen gesättigter Phenolphthaleinlösung; es wurden 3,5 ccm $^1/_{10}$ N NaOH benötigt). Zu der gesamten Emulsion werden daher 28 ccm N NaOH entsprechend der Hälfte der zur vollständigen Neutralisation notwendigen Menge zugefügt. Nach weiterem 2 Stunden langem Schütteln entspricht die Acidität von 5 ccm der Emulsion 2,6 ccm $^1/_{10}$ N NaOH; es werden daher abermals 21 ccm $^1/_{10}$ N NaOH zugefügt; nach abermaligem zweistündigen Schütteln erfordert die zur Hälfte durchgeführte Neutralisation nunmehr 15 ccm $^1/_{10}$ N NaOH (5 ccm besitzen eine Acidität von 1,8 ccm N NaOH); dann 10 ccm (Acidität von 5 ccm = 1,2 ccm $^1/_{10}$ N NaOH) und nochmals 10 ccm $^1/_{10}$ N NaOH. Nachdem jetzt zwei Stunden lang geschüttelt worden war, zeigt sich keine Zunahme der Acidität mehr (Acidität von 5 ccm = 0,6 ccm $^1/_{10}$ N NaOH): es wird nunmehr die Flüssigkeit mit der der Gesamtmenge der eingeführten Natronlauge äquivalenten Menge Salzsäure = 84 ccm $^1/_{10}$ NHCl versetzt, nochmals zwei Stunden lang geschüttelt und über Nacht dann stehen gelassen. Hierauf wird die Emulsion zentrifugiert und die hämolytische Wirksamkeit der wässerigen und der Chloroformschicht bestimmt, wobei sich dann annähernd 100 % des Hämloysins als komplettes, durch Lecithin nicht verstärkbares Kobralecithid im Chloroform finden, während der wässerige Teil seine hämolytische Wirkung bis auf Spuren eingebüßt hat. Der Chloroformteil (380 ccm) wird nun, damit nicht durch die Ätherfällung neben dem Lecithid im Chloroform befindliche lecithinartige, ätherunlösliche Beimengungen mitgerissen werden, durch wiederholte (sechsmalige) Behandlung mit Natriumsulfat getrocknet und sodann das Lecithid durch das zehnfache Volumen Äther aus dem Chloroform ausgefällt; um eine vollständige Fällung zu erzielen, bleibt das Gemisch drei Tage lang bei — 12° stehen. Der weiße Niederschlag wird noch sechsmal mit Äther gewaschen und im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid, Schwefelsäure und Paraffin drei Tage lang getrocknet; es resultieren 12,4 g einer noch wachsartigen Masse, welche behufs weiterer Reinigung von anhaftendem Lecithin in 124 ccm Äthylalkohol (= 10 %) gelöst und bei — 12° mit 10 Volumen Äther gefällt werden; der erhaltene Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ein derart erhaltenes reines Präparat, dessen Gewicht 10,6 g betrug, ist schneeweiß und zeigt keine wachsartige Konsistenz des Lecithins mehr; es ist ein komplete s, durch Lecithin nicht mehr verstärkbares Lecithid, dessen Analyse

für N 2,73 %—2,84 %,
„ P 5,56 %—6,03 %,
„ H 10,92 %,
„ C 59,07 %

ergibt. Die Zahlen für N und P zeigen eine große Übereinstimmung mit Lecithin, von dem ein Fettsäurerest abgespalten ist (Monostearinlecithin ergibt nach Lüdecke (cit. nach Kyes) für N = 2,59 %; für P = 5,73 %). Nach Kyes ist dadurch der Beweis erbracht, daß bei der Lecithidbildung ein Fettsäurerest aus dem Lecithin abgespalten wird, was sich auch durch die eintretende Säuerung beim Ausschütteln manifestiert. (Siehe Lüdecke, Neuberg und Rosenberg.) Der Gehalt des fertigen Kobralecithids an Bestandteilen des Kobragiftes ist gegenüber der Lecithinkomponente nach Lüdecke und Kyes so gering, daß

er bei der Analyse nicht in Frage kommt. Kyes faßt die Lecithidbildung auf als eine Synthese zwischen dem Kobraamboceptor und einer großen Menge von Monostearylresten des Lecithins; dafür scheint ihm die hohe Giftigkeit des Präparates und hauptsächlich der Umstand zu sprechen, daß durch Immunisierung mit dem Kobralecithid ein Antikörper gewonnen werden kann, der nicht nur auf das Lecithid, sondern auch auf das native Kobragift antihämolytisch wirkt. Die Molekulargewichtsbestimmungen von Biltz ergaben für das Kobralecithid in Chloroform eine Molekulargröße von 2000—3000, während dem Monostearyllecithin nach Willstätter ein Molekulargewicht von 541 entspricht, so daß man annehmen muß, daß in dem Lecithidmolekül mehrere Monostearyllecithine vereinigt sind; dies entspricht nach Kyes der Vorstellung, daß der Kobraamboceptor eine Reihe lecithinophiler Gruppen besitzt, die alle mit dem Monostearyllecithin reagieren können.

Eine zweite von Kyes ausgearbeitete Darstellungsweise der reinen Substanz beruht auf einem Aussalzungsverfahren und besteht darin, daß Kobragiftlösung und Lecithinchloroform, wie oben angegeben, zunächst bis zur Aciditätskonstanz miteinander geschüttelt werden; hierauf wird ein Teil der wässerigen Schicht, welche bisher das gesamte Hämolysin enthält, durch Zentrifugieren abgetrennt. Durch Lösen von reichlichen Mengen von Ammonsulfat in derselben und Schütteln derselben mit Chloroform gelang es, das Hämolysin quantitativ in das Chloroform überzuführen; aus dem Chloroform wird das Hämolysin durch Alkohol gefällt.

Das Lecithid wird durch Phenol sehr leicht gespalten; es schäumt in Lösungen und bildet in bestimmten Lösungsmitteln (Wasser, Benzol) typische kolloidale Lösungen. Was die hämolytische Wirkung anlangt, so zeigte Kyes, daß verschiedene „inkomplete“ Lecithidpräparate, welche einen verschiedenen Gehalt an Lecithin (als Monostearyllecithin berechnet) aufwiesen, verschieden wirksam waren; jene mit dem höchsten Monostearyllecithingehalt hatten die weitaus geringste hämolytische Wirkung, so daß Kyes annimmt, daß im Kobragift neben dem eigentlichen Hämolysin noch eine Reihe anderer lecithidbildender Stoffe sich vorfindet, denen eine größere Verwandtschaft zum Lecithin zukommt als dem hämolytischen Amboceptor. Das „komplete“ Lecithid würde ein Gemisch von Lecithiden darstellen, unter denen das wirksame Prinzip wahrscheinlich an Menge nur sehr wenig betragen würde, wodurch sich das hohe Molekulargewicht des erhaltenen kompleten Lecithidpräparates erklären würde. Es würde darnach der Kobraamboceptor im kompleten Lecithid an zahlreiche Monostearyllecithine gebunden sein. Wichtig ist die bereits an anderer Stelle hervorgehobene Tatsache, daß das komplete Lecithid nicht mit dem Calmetteschen Antivenin reagiert, so daß eine Neutralisation des Giftes durch das Antivenin nicht eintritt. Kyes unterscheidet folgende hämolytische Präparate des Kobragiftes:

1. Die kompleten Lecithide, welche alkohollöslich und durch Lecithin in ihrer Wirksamkeit nicht mehr verstärkbar sind und mit dem Calmetteschen Antivenin nicht reagieren; sie stellen ein Gemisch von Lecithiden dar, von denen das eine das hämolytische Prinzip ist.

2. Inkomplete Lecithide, alkoholunlöslich, durch Antivenin nicht neutralisierbar, aber durch Lecithinzusatz verstärkbar.

3. Inkomplete Lecithide, welche eine mehr oder minder starke oder auch gar keine hämolytische Wirkung bei Lecithinzusatz besitzen.

4. Das gereinigte hämolytische Prinzip, das vielleicht dem nativen Kobraamboceptor oder einem extremen inkompleten Lecithid entspricht,

welches durch Lecithin verstärkbar, alkoholunlöslich und durch Antivenin neutralisierbar ist. Dasselbe kann durch Fällung der wässerigen Schicht mit dem $1/_2$ Volumen einer 5 %igen Phenollösung am besten erhalten werden; dadurch entsteht ein dickflüssiges bräunlichgelbes öliges Sediment, welches sich bei der Temperatur des schmelzenden Eises gut absetzt. Aus diesem Sediment wird dann die wirksame Substanz durch Alkohol gefällt; das gewonnene Produkt wirkt an und für sich nicht hämolytisch, doch ist es nach Lecithinzusatz etwa 10mal so wirksam als das native Kobragift.

Zu bemerken bleibt, daß gegen diese von Kyes vorgenommene Reindarstellung des hämolytischen Prinzips von Morgenroth und Carpi geltend gemacht wird, daß das nach Kyes isolierte Toxolecithid keineswegs als ein reines Produkt des Kobrahämolysins angesehen werden kann, da in ihm auch ein neurotoxisches Prinzip enthalten ist, welches sowohl für Kaninchen wie für Mäuse giftig ist. Diese allgemeine Giftwirkung ist im Gegensatz zu der hämolytischen Giftwirkung der Präparate ziemlich thermolabil und scheint auch schon bei Aufbewahrung der Lösungen im Eisschrank eine Abnahme zu erleiden. Ein weiterer Gegensatz zu der hämolytischen Wirkung des Toxolecithids wird dadurch gebildet, daß die neurotoxische Wirkung durch Antivenin in demselben Maße aufgehoben wird, wie die neurotoxische Wirkung des genuinen Kobragiftes. Nach Morgenroth und Carpi ist die Bildung des Toxolecithids des ursprünglichen Neurotoxins, wenn auch in geringer Ausbeute, wahrscheinlich.

Von großem Interesse für die Natur des Schlangenhämolysins, wie auch der dargestellten Lecithide sind Untersuchungen über die Einwirkung von Fermenten auf diese Substanzen, welche gleichzeitig von Yutaka Teruuchi einerseits und Morgenroth und Carpi andererseits ausgeführt worden sind. Teruuchi fand u. a., daß reiner, mit Darmsaft aktivierte Hundepankreassaft das Kobrahämolysin, nicht aber das Kobrolecithid zerstört; frischer Hundedarmsaft an sich übt überhaupt keine Wirkung aus. Nach Morgenroth und Carpi eignet sich jedoch das Trypsin in alkalischer Lösung nicht zur Prüfung der Verdauungswirkung, da Alkali allein das Prolecithid rasch zerstört und in neutraler Lösung angewandt, viel schwächer wirkt wie das Pepsin, mit welchem die beiden Forscher sehr bemerkenswerte Befunde erhielten. Während nämlich das hämolytische Prolecithid des Kobragiftes nach kurz dauernder Einwirkung von Pepsin in salzsaurer Lösung bei 37—40° seine Wirksamkeit verliert, ist das isolierte hämolytische Toxolecithid des Kobragiftes dem Pepsin gegenüber in hohem Grade resistent. Diese Widerstandsfähigkeit zeigt auch das nicht isolierte Lecithid, welches bei der Vereinigung einer wässerigen Kobragiftlösung und einer wässerigen Lecithinsuspension entsteht; in frischen Gemischen von Kobragift und Lecithin, in denen die Lecithidbildung noch nicht eingetreten ist, wird dagegen das Gift von Pepsinsalzsäure zerstört. Neutrale Pepsinlösungen haben keinerlei Wirkungen. Papayotin greift, wenigstens bei kurz dauernder Einwirkung, weder das Prolecithid noch das Toxolecithid an. Diese interessanten Beobachtungen zeigen, daß durch die Lösung des Giftes in Lecithin nicht allein die Lösungsverhältnisse des neu entstandenen Gemenges ganz andere geworden sind als der ursprünglichen Komponenten, sondern daß auch sehr einschneidende biologisch-chemische Änderungen das neue System auszeichnen. Insbesondere die letztere Tatsache scheint uns von allgemeiner biologischer Bedeutung zu sein.

6. Trennung und Reindarstellung der Antigene durch Fermentwirkung.

Die Verwendung von Fermenten behufs Trennung der Antigene von verschiedenen, insbesondere eiweißhaltigen Beimengungen ist naturgemäß eine relativ sehr begrenzte, da die meisten Antigene durch Fermente, welche Eiweißkörper angreifen, sehr rasch zerstört werden. Bereits Nencki hat im Verein mit N. Sieber und E. Schoumoff-Simanowski gezeigt, daß die proteolytischen Fermente, insbesondere aber der Pankreassaft die vieltausendfachen letalen Dosen des Diphtherie- und Tetanustoxins zu zerstören imstande ist; ähnliche Beobachtungen dieser und anderer Forscher (Gamaleia, Charrin und Lefèvre, Charrin und Levaditi, G. Carrière, Fermi und Vincenzi, Cano und Brusso, Baldwin und Levene) liegen auch bezüglich des Pepsins in salzsaurer Lösung vor, wenn auch letzteres eine etwas schwächere Wirkung diesen Toxinen gegenüber enthalten soll, als das Pankreasferment; ob auch die von Doerr beobachtete, eminente giftneutralisierende Wirkung des Kaninchendünndarms gegenüber Dysenterietoxin auf Kosten von Fermentwirkungen zu setzen ist, muß offen bleiben. Selbst das sonst relativ resistente Virus der Tollwut wird nach Wyrschikowsky durch künstliche Verdauung zerstört, oder stark abgeschwächt, welchen Umstand Tizzoni und Centanni bei ihrer Schutzimpfungsmethode ja praktisch verwerteten. Qualitativ ähnlich wie Pepsin und Trypsin verhält sich auch das Papayotin; doch ist zu bemerken, daß sich verschiedene Toxine quantitativ recht verschieden gegenüber den einzelnen proteolytischen Fermenten verhalten. So fanden Sieber und Schoumoff-Simonowski, daß das Erepsin, das auf Abrin keinerlei Wirkung ausübt, auch das Tetanustoxin nur wenig angreift, während das Diphtherietoxin rasch zerstört wird. Aber nicht allein proteolytische Fermente, sondern auch Oxydasen üben zuweilen eine recht deletäre Wirkung auf die toxischen Antigene aus, wie dies die Untersuchungen von N. Sieber zeigen. Darnach vermögen Oxydasen aus Milz von Kälbern und Schweinen, aus dem Blute normaler Kälber, sowie gegen Diphtherietoxin immunisierter Pferde, aus der Parotis von Hund und Stier die viel hundertfachen letalen Dosen von Diphtherietoxin zu vernichten, während die Einwirkung auf Tetanustoxin etwas schwächer ist; auch hier haben auf Abrin diese Fermente keinerlei Einfluß; ähnlich verhalten sich auch pflanzliche Oxydasen, sowie anorganische Peroxyde, wie Wasserstoffsuperoxyd und Calciumperoxyd. (Siehe auch E. Löwenstein und A. und L. Lumiere und Chevrottier). Anderer Wirkungsart scheinen wohl jene, durch die aseptische oder antiseptische Autolyse verschiedener Organe, von Conradi erzeugten Körper zu sein, welche hitzebeständig, alkohollöslich und diffusibel, eine starke bakterizide Wirkung ausübten. Von rein diastatisch oder glykosidspaltend wirkenden Fermenten, wie dem Invertin, Emulsin, wurde eine schädliche Wirkung auf Toxine von Gamaleia nicht beobachtet.

Von den vielfach wiederholten und in der Regel fehlgeschlagenen Versuchen durch die elektive Wirkung der Fermente auch eine Trennung der Antigene zu erzielen, haben nur sehr wenige ein befriedigendes Resultat ergeben. Hier sind vor allem die Versuche an Phytotoxinen zu nennen, welche auffallenderweise eine recht große Widerstandskraft manchen proteolytischen Fermenten gegenüber aufweisen. Diese Tatsache ist bereits lange bekannt. Repin zeigte bereits, daß die spezi-

fische Giftwirkung des Abrins auf die Konjunktiva durch die Verdauungssäfte nicht abgeschwächt werde und CUSHNY und FR. MÜLLER konnten durch quantitative Versuche die große Widerstandsfähigkeit des Ricins gegen Trypsin nachweisen. Während nach MÜLLER weder die toxische noch die agglutinierende Wirkung des Ricins durch selbst lang andauernde Trypsinverdauung geschädigt wird, büßt das mit Pepsinsalzsäure behandelte Ricin seine Wirkung auf Blut in vitro völlig ein; da dabei jedoch die Giftwirkung des Ricins intakt bleibt, so wäre nach MÜLLER in der Pepsinverdauung ein Mittel zur Trennung der allgemeinen Giftwirkung von der Blutkörperchenwirkung gegeben. Doch wirkt nach JACOBY auch das durch Pepsin - Salzsäure - Behandlung erhaltene agglutininfreie Ricinantigen sowohl gegen das Toxin, wie auch gegen das Agglutinin. Das Agglutinin des Abrins ist in derselben Weise gegen eine kurze Pepsinsalzsäureverdauung relativ resistent, wie das Toxin, so daß eine Trennung auf diesem Wege beim Abrin nicht gelingt. Auch KOBERT fand, daß das Ricin sowohl von Trypsin, wie von Papayotin nicht wesentlich geschwächt wird. Indes scheint es, daß die Resistenz dieser Phytotoxine gegen Trypsin keine durchaus unbegrenzte ist, wie ich aus eigenen Versuchen berichten kann; auch OSBORNE, MENDEL und HARRIS, welche das Ricin als Albumin ansehen, sahen die Giftwirkung durch Trypsinverdauung schwere Schädigung erleiden.

Reinigung des Ricins und Abrins nach JACOBY*) und HAUSMANN.

Die angeführte Resistenz des Ricins und Abrins gegen Trypsin haben JACOBY und HAUSMANN zu einer weiteren Reinigung dieser Gifte benützt und verfuhren dabei in der Weise, daß sie die in der früher beschriebenen Weise durch fraktionierte Ammonsulfatfällung bei $^6/_{10}$ Sättigung gewonnene wirksame Albumosenfraktion nunmehr einer längeren Trypsinverdauung aussetzten. Da das Gift bei einer $^6/_{10}$ Salzsättigung schon ausfällt, das Trypsin aber erst bei vollkommener Ammonsulfatsättigung so war es möglich, Trypsin zu benützen, welches durch entsprechende Vorbehandlung von allen Substanzen, die bis zur $^6/_{10}$ Sättigung ausgefällt werden können, befreit war; auf diese Weise konnte nach Beendigung der Verdauung das Trypsin dann von Ricin getrennt werden. Für den besonderen Zweck wurde das Trypsinpräparat folgendermaßen hergestellt: Rinder-Bauchspeicheldrüsen werden vom Schlachthaus frisch bezogen, über Nacht kühl gehalten, zerhackt und mit Toluolwasser bei Brutschranktemperatur der Autolyse überlassen. Nach mehrwöchentlicher Selbstverdauung wird der ungelöste Rückstand abfiltriert, das Filtrat weiter im Brutschrank belassen und nach einigen Monaten mit gesättigter Ammonsulfatlösung so versetzt, daß eine Salzkonzentration von 65 % erreicht wird. Nach mehrstündigem Stehen wird der gebildete Niederschlag abfiltriert und das Filtrat mit festem Ammonsulfat gesättigt. Der bei Salzsättigung erhaltene Niederschlag wird mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, dann dialysiert und in 1 % iger Kochsalzlösung gelöst; auf diese Weise wird eine stark eiweißverdauende Flüssigkeit erhalten. Das käufliche Ricin und in gleicher Weise das Abrin werden nun durch mehrmaliges Aussalzen mit gesättigter Ammonsulfatlösung bei $^6/_{10}$ Sättigung und erneutes Lösen von den anhaftenden bei höherer Salz-

*) Siehe JACOBY pag. 310.

konzentration erst ausfallenden Eiweißkörpern und Spaltungsprodukten befreit und mit dem gereinigten Trypsin unter Zusatz von Toluol fünf Wochen bei neutraler Reaktion im Brutschrank verdaut. Nach Beendigung der Digestion wird abermals die Flüssigkeit mit gesättigter Ammonsulfatlösung bei einer Sättigungsgrenze von 60 % gefällt, der sehr geringfügige Niederschlag nach mehrstündigem Stehen abfiltriert, mit der entsprechenden Salzlösung gewaschen, mehrfach umgefällt und schließlich in 10 %iger Kochsalzlösung gelöst. Nach Jacoby wandert das Ricin begleitende Eiweiß in Form seiner Spaltungsprodukte aus den Fällungsgrenzen des Giftes hinaus und dieses kann auf die geschilderte Weise eiweißfrei dargestellt werden. Die Eigenschaften des nach Jacoby dargestellten reinen Ricins sind folgende: Das reine Gift wird im Gegensatze zu dem eiweißhaltigen durch Trypsin sowie durch Wasserstoffsuperoxyd rasch zerstört; setzt man dagegen zu einem ungereinigten Ricintrypsingemisch nach einiger Zeit der Einwirkung neues Trypsin, so bleibt Gift unzerstört. Das Gift dialysiert nicht innerhalb 24 Stunden; die Biuretreaktion, die Reaktion nach Millon, Adamkiewicz, Molisch, sowie die Xanthoproteinprobe sind negativ; mit Sublimat, Platinchlorid und Pikrinsäure entsteht keine sichtbare Trübung, dagegen mit Gerbsäure und Jodquecksilberkalium; die Phosphorwolframsäure und Phosphormolybränsäurefällung ergaben wegen Ammonsulfatgehaltes des Präparates kein sicheres Resultat.

Isolierungsversuche des Ricins nach Brieger.

Ähnlich wie Jacoby und Hausmann das Trypsin, hat Brieger das Papayotin zur Darstellung eines eiweißfreien Ricins, doch ohne Erfolg verwendet; ebenso scheiterten die zu demselben Zwecke unternommenen Versuche, Ricin durch proteolytisch wirkende Bakterien, wie Typhus, Cholerabakterien u. a. abbauen zu lassen. Alle diese Methoden, das Eiweiß zu zerstören, führten zu keinem Resultate, indem selbst nach wochenlanger Einwirkung derartiger Bakterien die Ricinwirkung zwar nicht beeinträchtigt war, die Eiweißreaktionen aber ebenfalls deutlich auftraten.

Anwendung der Papayotinverdauung zur Trennung der Komplemente nach Ehrlich und Sachs.

Wie schon früher angeführt wurde, haben sich Ehrlich und Sachs zur Trennung der Komplemente des Ziegenserums und zum Nachweise der Pluralität desselben neben der Einwirkung von Alkali, Erhitzen auf 50 °, vor allem des Absorptionsverfahrens durch rote Blutkörperchen bedient; daneben konnten sie sich überzeugen, daß auch die verschiedene Resistenz der Komplemente gegenüber der Papayotinverdauung einen Unterschied der Komplemente deutlich hervortreten läßt. Von den fünf Systemen und zwar 1. Meerschweinchenblut — inaktives normales Ziegenserum, 2. Kaninchenblut — inaktives normales Ziegenserum, 3. Kaninchenblut — inaktives Serum von mit Kaninchenblut vorbehandelter Ziege, 4. Ochsenblut — inaktives Serum von mit Ochsenblut vorbehandelter Ziege, 5. Hundeblut — inaktives Serum von mit Hundeblut vorbehandelter Ziege, welche einer Kompletierungsfähigkeit durch Ziegenserum zugänglich waren, wurden vier durch die Papayotinverdauung — 20 ccm Ziegenserum wurden mit 3 ccm einer 10 %igen Papayotinlösung im Brutschrank verdaut — zerstört; nur ein einziges

Komplement blieb resistent, nämlich jenes, welches den durch Vorbehandlung mit Kaninchenblut im Ziegenserum entstandenen Amboceptor (Fall 3) zu aktivieren vermochte.

Die verschiedene Widerstandsfähigkeit der einzelnen Komponenten des Schlangengiftes gegenüber proteolytischen Fermenten kann nach FLEXNER und NOGUCHI ebenfalls zur Trennung benützt werden, indem Pepsin und Papayotin das Hämorrhagin zerstören, aber nahezu gar nicht auf das Neurotoxin einwirken. Anhangsweise sei hier auch die jüngste Beobachtung TERUUCHIS angeführt, der zeigte, daß aus einem neutralen Gemisch von Kobragift und Antivenin der Pankreassaft einen Teil des Toxins zu restituieren vermag; nach Vereinigung des Toxin-Antitoxingemisches mit dem Lecithin scheint jedoch eine derartige Wiederherstellung der Giftwirkung nicht mehr durch den Pankreassaft möglich zu sein.

Auch DANYSZ benützte die Widerstandsfähigkeit des Ricins gegen proteolytische Fermente, um Ricin aus einem neutralen Toxin-Antitoxingemisch wieder zu gewinnen. Er verfuhr derart, daß ein neutrales oder äußerst schwach giftiges Gemisch von 1 ccm Ricin mit 0,5 ccm Antiricin in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung mit $^1/_{10}$ N-Salzsäure angesäuert und 16 Stunden bei 45° mit Magensaft verdaut wurde; dadurch wird das Antiricin zerstört und das verdaute Gemisch erweist sich nach der Neutralisierung durch Soda ebenso, ja sogar stärker wirksam, als die mit Ricin allein angestellte Kontrollverdauung; in ähnlicher, wenn auch nicht in so eleganter Weise gelingt auch die Trennung mit Hilfe der Trypsinverdauung.

7. Darstellung der Antigene aus biologisch unwirksamen Gemischen.

Die Darstellung der Antigene, im speziellen der Toxine aus neutralen Toxin-Antitoxingemengen hat seit jeher die Aufmerksamkeit der Forscher wegen der großen theoretischen Bedeutung dieser Frage erregt; die Details dieser vielfach mit großer Experimentalkunst durchgeführten Untersuchungen werden in speziellen Kapiteln dieses Handbuches besprochen und es mag genügen, hier kurz einige physikalische und chemische Prinzipien aufzuzählen, nach welchen die Trennung der Antigene von den sie neutralisierenden Immunkörpern durchgeführt wurde. Die einfachste und älteste Methode beruht darauf, daß das neutrale Toxin-Antitoxingemenge durch **Erhitzen** zu trennen versucht wurde, eine Methode, welche sich dort als anwendbar erwies, wo die Toxine einigermaßen wärmebeständig sind, wie bei dem Schlangengift; hier vermochte CALMETTE durch 10 Minuten langes Erhitzen der neutralen Toxin-Antitoxinmischung auf 68°, bei welcher Temperatur das Antivenin zugrunde geht, während das Toxin erhalten bleibt, das Gift wieder zu gewinnen; doch gelingt dieser Versuch nach MARTIN und CHERRY nur dann, wenn Toxin und Antitoxin nicht länger als $^1/_2$ Stunde aufeinander einwirken. Ebenso gelingt nach WASSERMANN die Trennung zwischen Pyocyaneustoxin und dessen Antitoxin durch Erhitzen, wobei ebenfalls das Toxin als das beständigere Prinzip erhalten bleibt.

Auch das Staphylolysin wurde von seinem Antilysin in ähnlicher Weise von MADSEN, FAMULENER und WALBUM getrennt; wenn nämlich dieses Hämolysin auf 70° erhitzt wird, verliert es größtenteils seine Hämolysinwirkung, welche jedoch eigentümlicherweise wieder zurückkehrt, sobald es 5 Minuten lang auf 100° erhitzt wird, während das Antitoxin

bei dieser Temperatur zerstört wird. Durch Erhitzen eines indifferenten Gemenges von Staphylolysin und Antistaphylolysin auf 100° durch 5 Minuten gelingt es der Mischung wieder hämolytische Eigenschaften zu verleihen. Schließlich sei auch daran erinnert, daß K. Prausnitz in gleicher Weise eine Trennung des Heufiebergiftes von seinem Antitoxin erfolgreich durchführte. Das Toxin wird durch halbstündiges Erhitzen auf 75° nur geschwächt, das Antitoxin dagegen völlig zerstört. Es werden daher neutrale Gemische beider durch die Behandlung bei 75° wieder toxisch und zwar deshalb, weil ein Teil des Giftes, keineswegs das ganze Gift, frei wird. Umgekehrt scheinen sich die von Grassberger und Schattenfroh untersuchten Toxin-Antitoxinverbindungen des Rauschbrandes zu verhalten, indem hier bereits abgesättigte und abgelagerte Gemenge, welche kein neues Gift zu binden vermochten, durch einstündiges Erhitzen auf 60° so verändert wurden, daß sie neuerdings große Giftdosen neutralisierten. Auch Marenghi unternahm bei Mischungen von Diphtherietoxin und Antitoxin ähnliche Versuche, da das Toxin bei einer Temperatur zwischen 60° und 70°, welcher es durch 12 Minuten ausgesetzt war, zerstört wurde, während das Antitoxin seine Wirksamkeit beibehielt. Marenghis Versuche ergaben, daß aus derartigen Gemischen in der Tat wirksames Diphtherieantitoxin auf diese Weise zu gewinnen sei. Indes konnte Dzierzgowski auf diesem Wege zu keiner Trennung der Komponenten des Diphtherietoxin-Antitoxingemenges gelangen.

Eine andere ebenfalls mit rein physikalischen Mitteln durchgeführte Trennungsmethode ist jene nach Martin und Cherry, welche als die ersten die **Diffusion** zur Trennung neutralisierter Antigengemische verwendeten. Sie bereiteten 60 ccm einer ungiftigen Mischung, welche aus 500 letalen Dosen eines Diphtherietoxins und dem entsprechenden Antitoxin bestand, digerierten diese Lösung zwei Stunden bei 30° und filtrierten sie hierauf unter einem Druck von 50 Atmosphären durch Pasteur-Chamberland-Kerzen, welche mit Gelatine imprägniert waren und welche das Diphtherietoxin allein gut durchlassen, das Antitoxin dagegen zurückhalten. Das erhaltene Filtrat wurde geprüft und gefunden, daß ohne Schaden davon Meerschweinchen eine Menge injiziert werden kann, welche der 32fachen letalen Dosis entsprach, wenn das Gift frei gewesen wäre, oder daß in 1 ccm weniger als 3—5 % des in 1 ccm der ursprünglichen Lösung als völlig ungebunden angenommenen Giftes vorhanden war. Daraus schlossen Martin und Cherry auf eine direkte chemische Wirkung des Antitoxins auf das Toxin. Dieser Versuch kann jedoch nach Arrhenius deshalb nicht als völlig beweisend angesehen werden, weil die Möglichkeit vorliegt, daß das Toxin ungemein langsam die Gelatine passiert, etwa 67 mal langsamer als Kochsalz und noch viel langsamer als Wasser, so daß, selbst wenn gar nichts von dem Gifte an das Gegengift gebunden worden wäre, das erste Filtrat in 1 ccm nur 15 % der Giftmenge der ursprünglichen Mischung enthalten könnte. Erst später könnte ein etwas höherer Prozentsatz in dem Filtrat erwartet werden.

Auch Craw unternahm einen analogen Versuch zur Trennung des durch den Bacillus megatherium erzeugten Lysins und seines Gegenkörpers; er fand, daß aus ungiftigen Gemischen sich das Toxin in der Gelatinehaut ansammelt und der zurückgebliebene Rest der Flüssigkeit antitoxische Eigenschaften zeigt, so daß die Bindung zwischen Toxin und Antitoxin einen „teilweise reversiblen" Vorgang darstelle.

Auch ARRHENIUS und MADSEN uud MADSEN und WALBUM bedienten sich der Diffusion, um eine Trennung von Toxinen und Antitoxinen aus Mischungen zu erzielen. ARRHENIUS und MADSEN verfuhren dabei derart, daß sie eine 5%ige Gelatinelösung zu 10 ccm in gewöhnliche Reagensgläser verfüllten und dieselben im Eisschrank erstarren ließen. Darauf wurde eine Lösung von Toxin oder Antitoxin 1,3 ccm hoch auf die Gelatine aufgeschichtet und das Ganze in den Eisschrank wieder eingestellt, wo es bei einer Temperatur von etwa +6° durch einen Zeitraum, der für die Diffusion benötigt worden war und zwischen einer Woche und mehr als einem Monat je nach dem Diffusionsvermögen der Flüssigkeit schwankte, gehalten worden war. Aus den hierauf angestellten Untersuchungen der Flüssigkeit und der verschiedenen Schichten der Gelatine konnten die Diffusionskonstanten berechnet werden. Dieselben ergaben für 12° C, ausgedrückt in Tagen und Kubikzentimetern folgende Zahlen:

Natriumchlorid	0,94
Diphtherietoxin	0,014
Diphtherieantitoxin	0,0015
Tetanolysin	0,037
Antitetanolysin	0,0021

Auf Grund dieser Versuchsanordnung fanden MADSEN und WALBUM, daß auch aus neutralen Gemengen von Diphtherietoxin und Antitoxin das Toxin getrennt werden kann, da dasselbe infolge seiner rascheren Diffusion rascher in die Gelatineschicht eindringt und namentlich dann in den unteren Gelatineschichten zu finden ist. (Siehe dagegen die widersprechenden Resultate v. CALCARS).

Mit Hilfe einer sehr einfachen Methode gelang es MADSEN, eine Zerlegung des neutralen Gemenges von Gift und Gegengift beim Botulismustoxin zu erzielen, indem er durch eine **Verdünnung des Gemenges** eine Dissoziation der neutralen Verbindung und dadurch eine Giftwirkung erzielen konnte. Eine Mischung von 0,1 ccm Gift mit 0,0013 ccm Antitoxin stellte die neutrale Ausgangsmischung dar. Die Injektion 10 derartiger Dosen blieb beim Meerschweinchen wirkungslos; zwei Dosen gaben bereits eine leichte Vergiftung, welche bei Injektion einer Dose bedeutend gesteigert war. Injektionen von 0,013 und 0,5 Dosen hatten letale Wirkung und die maximale Toxizität trat bei 0,1 der Dose ein; das Tier ging schon nach zwei Tagen zugrunde. 0,01 Dose war nicht mehr tödlich und 0,003 nur sehr schwach giftig. OTTO und SACHS, welche die Versuche MADSENS bestätigten, erhielten ganz analoge Resultate mit neutralisierten Arachnolysinlösungen. Auch hier zeigte sich, daß infolge der bei der Verdünnung eingetretenen Dissoziation der neutralen Toxin-Antitoxinverbindung Hämolysinwirkung zu beobachten war. Die Dissoziationsfähigkeit schwindet jedoch bei längerem Stehen der Gemische; ebenso geben alte, lange aufbewahrte Antisera das Phänomen nicht.

Von anderen auf physikalisch-chemischen Methoden beruhenden Trennungsverfahren des Antigens von seinem Antikörper scheinen mir die auf **Adsorptionserscheinungen** beruhenden Trennungsversuche noch erwähnenswert. So haben MADSEN und WALBUM den Versuch gemacht ein neutrales Gemenge von Ricin und Antiricin durch Adsorption des Giftes an die roten Blutkörperchen in die beiden Komponenten zu zerlegen. Eine Mischung von Ricin und Antiricin, welche nach zweistündiger Erwärmung auf 37° keinen toxischen Effekt auf Meerschweinchen zeigte, wurde bei 37° mit einer 10%igen Emulsion von Kaninchenblutkörperchen

eine Zeitlang in physiologischer Kochsalzlösung geschüttelt und hierauf zentrifugiert. Nach dieser Prozedur beobachteten die Autoren in der überstehenden Flüssigkeit freies Antiricin, welches sich durch die Hemmungswirkung auf das Ricinagglutinin kundgab. Die geschüttelten roten Blutkörperchen dagegen erhielten einen Überschuß an Ricin, welcher dadurch nachgewiesen werden konnte, daß die in Wasser gelösten Blutkörperchen nunmehr Meerschweinchen töteten und das typische Vergiftungsbild des Ricins zeigten. Morgenroth, welcher die gleiche Methode behufs Trennung von Kobrahämolysin-Antitoxin-Lecithid anwandte, kam insofern zu einem negativen Resultate, als er mit Hilfe seines Salzsäureverfahrens kein freies Toxin nachweisen konnte.

Als weiteres Beispiel einer Trennungsmethode der einzelnen Giftkomponenten ist der **Kälteversuch Ehrlichs**, welcher einen Grundversuch zur Erkenntnis der komplexen Natur der Hämolysine darstellt, anzusehen; die Methode besteht darin, daß der Amboceptor bestimmter Hämolysine in der Kälte von den roten Blutkörperchen gebunden wird, während das Komplement bei dieser Temperatur in Lösung bleibt; bei manchen Hämolysinen, wie z. B. beim hämolytisch wirkenden Aalserum gelingt die Trennung auf diese Weise jedoch nicht, da auch bei 0° die Hämolyse auftritt und auch durch Salzzusatz (Kochsalzzusatz bis zu 5 %), welcher, wie später unten besprochen werden soll, unter bestimmten Verhältnissen die Trennung zwischen Komplement und Amboceptor erleichtert, nicht aufgehalten werden kann. Die Methode der Kältetrennung wird nach Morgenroth in der Weise ausgeführt, daß nach vorheriger Abkühlung der mit Blut gefüllten Reagenzröhrchen und des Serums auf 0° durch Einlegen der Gefäße in Eiswasser oder Verpacken derselben in Eisstückchen das Serum dem Blute zugesetzt wird. Nach zweistündigem Aufenthalt der Mischungen bei 0° wird möglichst rasch zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen und die zurückbleibenden Blutkörperchen werden gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und aufgeschwemmt. Die abgegossene Flüssigkeit wird nochmals mit Blutkörperchen beschickt, und zwar am zweckmäßigsten, um das Gesamtvolumen nicht zu vermehren, mit bereits abzentrifugiertem Blutkörperchensedimente, dessen Menge einer entsprechenden 5 %igen Blutkörperchensuspension entspricht. Bei einer vollständigen Trennung zwischen Amboceptor und Komplement werden weder die sedimentierten Blutkörperchen gelöst, noch ist die nach dem Zentrifugieren abgehobene Flüssigkeit imstande die neu hinzugefügten roten Blutkörperchen aufzulösen. Die roten Blutkörperchen enthalten den in der Kälte verankerten Amboceptor, die abgegossene Flüssigkeit das Komplement. Das letztere läßt sich leicht durch Hinzufügung eines inaktivierten, amboceptorhaltigen Serums zu der mit roten Blutkörperchen beschickten Flüssigkeit nachweisen, während der verankerte Amboceptor nach Zusatz des im Abguß befindlichen Komplements sich durch seine Wirkung manifestiert.

Durch ein anderes Adsorptionsphänomen versuchte Vincent in jüngster Zeit aus neutralen Tetanustoxin-Antitoxingemengen Toxin zu gewinnen. Eine halbe Stunde nach der Mischung fällt er die phosphathaltige Flüssigkeit mit Chlorcalcium, so daß der Calciumphosphatniederschlag das freie Tetanustoxin adsorbiert; es gelingt noch zwei Stunden nach der Mischung etwas freies Toxin auf diese Weise aus der Mischung zu gewinnen, dagegen keines mehr nach 24 Stunden.

Die Trennung beider aufeinander reagierenden Komponenten durch rein **chemische Mittel** wurde in verschiedener Weise durchgeführt. Die Versuche von Hahn und Trommsdorff aus agglutinierten Bakterien durch Extraktion mit schwacher Lauge ($^1/_{100}$ NNaOH) oder Säure ($^1/_{100}$ NHCl) bei 37° das spezifische Agglutinin zu isolieren, sowie jene von Landsteiner und Reich, die Normal- sowie Ricinhämagglutininverbindungen durch Extraktion mit 1%iger Kochsalzlösung bei 50° zu spalten, sind bereits oben erwähnt worden. Zu bemerken wäre hier noch, daß die Spaltbarkeit der Agglutininverbindung recht verschieden ist, wenn man einerseits von unverbundenen Komponenten ausgeht und dieselben reagieren läßt, anderseits die schon gebildeten Verbindungen der Spaltung überläßt; man erhält auf diese Weise keineswegs einen und denselben Endzustand, sondern verschiedene Endzustände und damit auch eine Absorptions- und eine Spaltungskurve, die sich nicht decken. Auch die von Landsteiner und Jagič durchgeführten Versuche, das Abrin durch Säure respektive Alkalispaltung aus seinen Verbindungen zu gewinnen, wurden bereits früher erwähnt.

Ein anderes auf der Giftzerstörung durch Wasserstoffsuperoxyd beruhendes Trennungsprinzip verwendete Löwenstein bei der Trennung neutraler Tetanustoxin-Antitoxingemenge. Ein derartiges Gemisch wurde nach 30 Minuten dauerndem Kontakt mit 1 ccm 5%iger Wasserstoffsuperoxydlösung versetzt, nach 48 Stunden der Rest des unzersetzten Wasserstoffsuperoxyds durch 0,2 ccm defibrinierten Vollblutes in 24 Stunden entfernt, dann wieder mit steigenden Dosen von frischem Tetanustoxin beschickt und nach einstündigem Stehen an Mäusen austitriert. Es zeigte sich, daß die Flüssigkeit für Tetanustoxin wieder bindungsfähig geworden war, so daß Antitoxin durch die deletäre Einwirkung des Wasserstoffsuperoxyds auf das Tetanustoxin in Freiheit gesetzt worden sein mußte.

Ein anderer chemischer Weg, die Trennung herbeizuführen, ist durch Morgenroth angebahnt worden und besteht in der Benützung der bereits früher beschriebenen Säuremodifikationen einzelner Antigene. Wenn man ein neutrales Gemisch von Kobratoxin und Antitoxin mit Salzsäure versetzt, so wird das Toxin abgespalten und reagiert mit dem zugesetzten Lecithin unter Lecithidbildung. Nach Abstumpfung der Säure durch Natronlauge kehrt die Modifikation des Giftes wieder in die ursprüngliche Form zurück und vermag nunmehr wieder mit dem Antitoxin zu reagieren. Ist bei der Spaltung mit Salzsäure gleichzeitig Lecithin vorhanden, so wird das Toxin als Lecithid frei und verliert dadurch dauernd die Fähigkeit mit dem Antitoxin zu reagieren, bleibt jedoch nach Neutralisation der Säure in wirksamer Form neben dem Antitoxin nachweisbar und dies auch dann noch, wenn die Säurewirkung längere Zeit gedauert hat. Bei der Trennung der Toxin-Antitoxinverbindung verfuhr Morgenroth in der Art, daß nach siebentägigem Stehen zu dem Gemisch soviel Normalsäure zugesetzt wurde, daß auf 5 ccm des Gemisches 0,3 ccm der Normalsäure entfielen; hierauf wird die saure Flüssigkeit 30 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt; da die Säuremodifikation des Toxins hitzebeständig ist, während das Antitoxin zerstört wird, kann das Kobrahämolysin quantitativ auf diesem Wege wieder gewonnen werden. Nach Morgenroth verläuft in Gegenwart des Lecithins der Vorgang derart, daß sich das Lecithid der neutralen Verbindung bildet, welche erst durch die Salzsäure gespalten wird. Wie schon früher erwähnt wurde, konnte Morgenroth eine ganz analoge

Salzsäuremodifikation, wie aus dem Kobrahämolysin durch Zusatz sehr geringer Salzsäuremengen $\left(\frac{n}{10000}HCl\right)$ auch aus dem Kobraneurotoxin darstellen, wodurch auch hier die Trennung des Toxins aus neutralen Gemischen gelingt; doch ist die Ausbeute des abgespaltenen Neurotoxins etwas schlechter, als die des Hämolysins. Die Wiedergewinnung kann noch aus drei Monate alten Gemischen durchgeführt werden. Die analogen Versuche Doerrs lassen auch für andere Gifte und Gegengiftgemenge mit Hilfe desselben Verfahrens eine Trennung in die einzelnen Komponenten durchführbar erscheinen (siehe pag. 501 u. 502).

Eine weitere auf chemischem Wege basierte Trennung hat P. I. Nikanorow durchgeführt. Wenn man eine Lösung von Diphtherietoxin mit einer entsprechenden Menge 1%iger Kupferacetatlösung versetzt, den Niederschlag abfiltriert, auswäscht, mit Natriumkarbonat löst und Kohlensäure zur teilweisen Ausfällung des Kupfers und Eiweißes durchleitet, so erhält man keine toxisch wirkende Flüssigkeit. Wenn man dagegen im Diphtherieheilserum durch Kupferacetat einen Niederschlag hervorruft und denselben in der angegebenen Weise weiter verarbeitet, so erhält man eine antitoxisch wirkende Flüssigkeit; im Filtrat des Niederschlags findet sich nur eine geringe Menge Antitoxin. Man ersieht, daß also durch Kupferacetat das Toxin nicht, aber das Antitoxin zum größten Teil gefällt wird. Wenn man nun ein neutrales Diphtherietoxin-Antitoxingemenge in obiger Weise mit Kupferacetat fällt und weiter verarbeitet, so erhält man aus dem Niederschlag eine Flüssigkeit, welche antitoxisch wirkt, zumal dann, wenn sie durch Aluminium von Kupfer befreit wird. Das Filtrat des Niederschlages wirkt nur schwach toxisch, da ein Teil des Toxins durch das ins Filtrat teilweise übergehende Antitoxin abgesättigt wird.

Die Verwendung von Verdauungsfermenten, wie Trypsin und Pepsin, zur Gewinnung der resistenten Toxine (Schlangenhämolysin und Ricin) aus neutralen Toxin-Antitoxingemengen durch Teruuchi und Danysz wurde bereits oben erwähnt. Es ist überflüssig zu betonen, daß diese hier angeführten Methoden keiner allgemeinen Anwendung fähig sind, sondern von Fall zu Fall der speziellen Natur des betreffenden Gemenges angepaßt sein müssen. Daß neben der Natur des Antigens und des Antitoxins auch die Dauer der gegenseitigen Einwirkung, die Temperatur, bei welcher sie stattgefunden hat, Acidität und Alkaligehalt des Milieus, die Lösungsverhältnisse u. a. zu berücksichtigen sind, bedarf hier keiner weiteren Auseinandersetzung. Die biologischen Methoden zur Trennung des Toxins und Antitoxins, sowie jene Verfahren, auf Grund deren eine Trennung der beiden Komponenten im Tierkörper vorgenommen werden kann, müssen speziellen Kapiteln dieses Handbuches vorbehalten bleiben.

B. Die Reinigung und Isolierung der Antigene durch Dialyse.

(Der Einfluß der Salze auf die Antigenwirkung.)

Die Anwendung der Dialyse bei der Darstellung und Reinigung der Antigene ist, wie wir in den verschiedensten Kapiteln bereits gesehen haben, eine mannigfache. Die allerhäufigste Verwendung findet die Dialyse, um die Antigene von den bei den Darstellungsprozeduren benutzten und den Präparaten anhaftenden anorganischen oder organischen Salzen zu befreien, zum Teile um dieselben von dialysablen, nicht kolloidalen

Eiweißspaltungsprodukten zu trennen, wie von den leicht dialysablen Aminosäuren und basischen Produkten und eventuell von den teilweise, wenn auch langsam, die Dialysiermembran passierenden Albumosen und Peptonen. In anderen Fällen wird aber gerade die Dialyse wieder zur Trennung von Bakterienleibern und den von ihnen sezernierten, die betreffende Membran passierenden Giften benützt, wie bei den früher angeführten Versuchen von METSCHNIKOFF, ROUX und SALIMBENI u. a. und wie bei der Darstellung des FAUSTschen Sepsins. Daß die Diffusion als solche zur Trennung von Antigengemischen infolge der verschiedenen Diffusionsgeschwindigkeit einzelner Antigene und ihrer Gegengifte dienen kann, wurde an Beispielen im vorhergehenden erörtert und es erübrigt noch hier darauf hinzuweisen, daß die modifizierte Dialyse durch tierische Membranen auch zur Trennung der Modifikationen eines und desselben Giftes auf Grund der verschiedenen Molekulargröße der einzelnen Komponenten des Giftgemenges herangezogen wurde (v. CALCAR).

Da wir es nahezu ausnahmslos mit kolloidalen Stoffen zu tun haben, so bleiben die Antigene zumeist innerhalb der Dialysiermembran, während die meist kristalloiden organischen und anorganischen Beimengungen in das Außenwasser übergehen. Doch spielt auch hier das Milieu, in dem sich das Antigen befindet, eine wichtige Rolle. Da ja, wie dies der häufigste Fall ist, nicht ein einziges Kolloid, sondern ein Gemenge von Kolloiden vorliegt, so wird in der Regel eine gegenseitige Beeinflussung derselben bei der Diffusion statthaben und es können ähnliche Verhältnisse obwalten, wie wir sie beim Passieren der Tonfilter kennen gelernt haben, wo nach den Untersuchungen ZSIGMONDYS die Schutzkolloide den Durchgang durch das poröse Material sehr maßgebend beeinflussen können. Daß kolloidale Medien in ihrer Durchlässigkeit sowohl durch die diffundierenden Stoffe als auch durch die Anwesenheit anderer Körper beeinflußbar sind, haben zahlreiche Untersuchungen, u. a. jene von BECHHOLD und ZIEGLER und im speziellen den Einfluß der Kolloide auf die Diffusion der Hämolysine FLEXNER und NOGUCHI dargetan. Die ersteren ließen Elektrolyte (Na_2SO_4, NaJ, NaCl) und Nichtelektrolyte (Alkohol, Glyzerin, Traubenzucker, Harnstoff, sowie einige Farbstoffe) in Gelatine und Agar, teilweise auch unter Zusatz von Eieralbumin, diffundieren und fanden, daß sowohl Gelatine, wie auch Agargallerte den Diffusionsweg von Elektrolyten wie Nichtelektrolyten vermindern. Durch die Gegenwart von Natriumsulfat, Traubenzucker, Glyzerin und Alkohol wird die Durchlässigkeit von Gelatine- und Agargallerten für die Diffusion von Elektrolyten und Farbstoffen vermindert, durch Harnstoff vermehrt. Die Diffusion in Eiweiß wird durch Traubenzucker, Glyzerin und Harnstoff verzögert. Auch durch Niederschlagmembranen wird der Diffusionsweg nach BECHHOLD und ZIEGLER mehr oder weniger verstopft.

FLEXNER und NOGUCHI fanden, daß die Kolloide hindernd auf die Diffusion wirken und zwar desto stärker, je höher ihre Konzentration ist. So beeinflußt Gelatine den Grad der Diffusion etwa im umgekehrten Verhältnis zu der Quadratwurzel der Konzentration. Agar-Agar in 2%igen Lösungen hemmt die Diffusion weit weniger wie 10% ige Gelatinelösungen. Hämolytische Substanzen diffundieren z. B. weit langsamer von Gelatine in Agar-Agar, wie von Kochsalz in Agar-Agar, wobei jedoch die Diffusionsgeschwindigkeit von Agar-Agar in Gelatine größer ist. Die Schnelligkeit der Diffusion aus den und in die Kolloide ist gleich der Quadratwurzel der Zeit. Säuren, Alkalien, Salze und Glykoside wirken nach FLEXNER und NOGUCHI gemäß dieser Regel, Kobralysin und Tetanuslysin dagegen

nicht. Kobralysin scheint langsamer in Kolloide überzugehen wie Kobraneurotoxin, und Tetanospasmin langsamer wie Tetanolysin. (Siehe auch die von Arrhenius und Madsen gefundenen Diffusionskonstanten des Diphtherietoxins und Tetanolysins im vorhergehenden Kapitel pag. 531.)

Die Art der Dialyse ist ferner abhängig von dem Medium, welches als Dialysiermembran funktioniert und man wird demnach je nach der Qualität der Dialysiermembran bei der Dialyse kolloider Stoffe die mannigfachsten Resultate zu erwarten haben. Die älteste von Graham verwendete Dialysiermembran, welche aus tierischer Blase hergestellt war und eine straff gespannte plane Scheidewand zwischen den zwei Flüssigkeitsschichten bildete, wird jetzt infolge der relativ langsamen Diffusion weniger verwendet. Immerhin war es von großem Interesse den Einfluß der verschiedenen Organe in bezug auf die Dialyse von Giften kennen zu lernen und Chassin und Moussu untersuchten in bezug auf ihre Durchlässigkeit als Dialysiermembran verschiedene Organe vom Pferd, Hund, Schaf, Ziege und Kuh gegenüber Tetanus- oder Diphtherietoxin. Sie schlossen diese Gifte in die betreffenden organischen Membranen ein, welche einige Stunden in 1 $^0/_0$ige Kochsalzlösung eingelegt wurden und es zeigte sich, daß das Toxin nicht durch die Wand des Ösophagus, Dickdarms, der Vena jugularis, das Perikard, die Gallenblase diffundiert, dagegen wohl durch die Wand des Dünndarms.

Wiechowski hat in jüngster Zeit als sehr zweckmäßiges Dialysiermaterial sogenannte Fischblasenkondome, die aus dem Blinddarm der Schafe hergestellt sein sollen, empfohlen; die Dialyse geht wegen der Dünnheit und der unten geschlossenen Form dieser Dialysatoren sehr rasch vor sich. Diese Dialysatoren dürfen wegen ihrer Zartheit keinem sehr hohen Drucke ausgesetzt werden und die Prüfung auf ihre Dichtigkeit findet nach einem Kunstgriffe Wiechowskis am besten in der Weise statt, daß die in Wasser eintauchenden Schläuche mit Lackmuslösung gefüllt und längere Zeit sich selbst überlassen bleiben; an den undichten Stellen tritt dieser kolloidale Farbstoff heraus und die Färbung der Außenflüssigkeit zeigt die Unbrauchbarkeit des Stückes an. Auf diese Weise geprüft, zeigen sich die meisten Stücke zum Dialysieren gut verwendbar. Um mit möglichst wenig Flüssigkeit auszukommen, den Fortgang der Dialyse besser beurteilen zu können und auch die Verarbeitung der Dialysationsflüssigkeit zu erleichtern, werden die Glaszylinder, in welchen die Schläuche bis an den Boden eintauchen, so eng gewählt, daß diese ohne Berührung der Wände eben Platz haben. Auf diese Weise gelingt es die Menge der Außenflüssigkeit auf etwa $^1/_5$ des Volumens des Schlauchinhaltes zu reduzieren und den Wechsel der Flüssigkeit auch bei langsamem Zufluß relativ rasch durchzuführen. Die Vorrichtung wird durch die Fig. 18 veranschaulicht. Der Abschluß wird

Fig. 18. Dialyse durch Fischblasenkondome nach Wiechowski.

durch eine dreimal U-förmig gebogene Röhre, die bis auf den Boden des Zylinders reicht, so geregelt, daß immer der Abfluß dem Zufluß gleich ist; dabei läßt sich das Flüssigkeitsniveau im Zylinder durch Ansetzen von Schlauchstücken an das freie Ende der Abflußröhre beliebig regulieren. Auch der Zufluß kann durch eine Klemme reguliert werden. Bei dieser Anordnung wird halbgesättigte Ammonsulfatlösung in 24 Stunden vollständig sulfatfrei und Menschenharn chlorfrei. Als bestes Antiseptikum hat sich WIECHOWSKI Toluol bewährt, welches reichlich auf die Flüssigkeit innerhalb und außerhalb das Schlauches aufgeschüttet wird. Alle anderen Zusätze wie Chloroform, Thymol, Fluornatrium sind nach ihm weniger zweckmäßig. Bei der von ihm durchgeführten Dialyse von Organemulsionen verwendete WIECHOWSKI als Außenflüssigkeit 0,05 %ige Sodalösung, welche die spontane Plasmakoagulation verhindert und sich auch für das von WIECHOWSKI und WIENER studierte harnsäurelösende Organ-Ferment als gut konservierend erwiesen hat.

KÜHNE hatte gelegentlich seiner Studien über die Blutalkalescenz das Pergamentpapier als Dialysator empfohlen und dieses Material ist auch jetzt noch das am häufigsten zur Dialyse verwendete. KÜHNE benützte dasselbe in Form von Schläuchen, doch ist es zweckmäßiger die Beutelformen, die man aus entsprechend zusammengefaltetem Pergamentpapier bequem und lückenlos herstellen kann, zu benützen, da die Schläuche häufig an den Nahtstellen Lücken aufweisen. Einen derartigen Beuteldialysator aus Pergamentpapier hat zu Zwecken steriler Dialyse PROSKAUER hergestellt. Wie aus der beigegebenen Fig. 19 ersichtlich ist, besteht derselbe aus zwei ineinander geschobenen Gefäßen, von denen das obere den Pergamentbeutel trägt und mit Watte gut verschlossen werden kann; der Pergamentbeutel hängt in das zweite Gefäß, durch welches die Dialysierflüssigkeit unter langsamem Strome durchfließt. Da alle Teile der Dialysiervorrichtung gut sterilisierbar sind, kann die Dialyse steril vor sich gehen. Nur muß, falls eine nicht sterile Flüssigkeit, wie z. B. Wasserleitungswasser zur Dialyse benützt wird, darauf geachtet werden, daß die Dialyse nicht zu lange protrahiert wird, da sonst die Gefahr vorhanden ist, daß die Keime des Außenwassers den Pergamentbeutel durchwachsen und die zu dialysierende Flüssigkeit infizieren. Man kann auch hier leicht die aseptische Dialyse in die antiseptische dadurch umwandeln, daß man entweder gegen Toluolwasser dialysiert, oder der Innenflüssigkeit Chloroform Toluol, Thymol oder ähnliches zusetzt oder endlich, falls man aus irgend einem Grunde den direkten Zusatz eines Antiseptikums nicht wünscht, die Innenflüssigkeit unter die Wirkung von Chloroform-, Toluol- oder Formalindämpfen setzt, ein Verfahren, das im pathologisch-chemischen Laboratorium der Rudolfstiftung in Wien auf Anregung E. FREUNDS seit Jahren geübt wird und sich recht gut be-

Fig. 19. Beuteldialysator für sterile Dialyse nach PROSKAUER.

währt hat. Zu diesem Zwecke braucht nur der Wattepfropf in der obigen Figur durch einen einfach durchbohrten, gut schließenden Korkpfropfen vertauscht zu werden, durch dessen Bohrung ein rechtwinklig abgebogenes Glasrohr geführt ist, welches in eine kleine mit dem entsprechenden Antiseptikum gefüllte Eprouvette mündet, ähnlich wie es die Fig. 28 demonstriert. Die Innenflüssigkeit ist auf diese Weise stets unter der antiseptischen Wirkung der bezüglichen Dämpfe gehalten, welche, zumal bei der tiefen Temperatur des strömenden Wasserleitungswassers, die Keimentwicklung hintanhalten.

Von großer Bedeutung für die Schnelligkeit der Diffusion ist indessen die Temperatur, bei welcher dieselbe stattfindet und man kann daher, falls die Dialyse beschleunigt werden soll, dieselbe bei höherer Temperatur, etwa bei Brutschranktemperatur, vornehmen. Man kann dies auch dadurch erreichen, daß man die Dialyse in einem geheizten und bezüglich der Temperatur gut regulierbaren Wasserbade vornimmt. Eine weitere bedeutende Beschleunigung der Dialyse durch Pergamentbeutel kann man dadurch erzielen, daß man den Beutel in der Flüssigkeit schütteln läßt (Schütteldialyse). Dies kann leicht in der Weise bewerkstelligt werden, daß der Schlauch an ein kleines, mit einem Motor betriebenes Schwungrad angehängt wird, wodurch ein regelmäßiges Heben und Senken des Schlauches in dem mit Wasser gefüllten Dialysierzylinder erfolgt. Für kleine Flüssigkeitsmengen empfiehlt sich die Benützung Freundscher Pergamenthülsen, welche im Dampf sterilisierbar sind und durch die Firma Schleicher & Schüll verfertigt werden.

Ein anderes Material, welches in den Phagocytenstudien Metschnikoffs und seiner Schüler zahlreiche Anwendung gefunden hat und auch zur Darstellung, respektive Trennung der Gifte von den Bakterien häufig benützt wurde, hat zuerst Metschnikoff auf Anregung des Petersburger Botanikers Kroutizine in die Technik der Dialyse eingeführt. Es sind zylindrische Säckchen, welche aus dem Marke des Schilfrohres (Phragmites communis) dargestellt werden. Die Präparierung dieser Schilfschläuche ist eine sehr einfache und findet nach Podbelsky und Conradi in der Weise statt, daß möglichst dicke Schilfrohre in ihre Segmente geteilt und auf eine Stunde in kochendes Wasser eingelegt werden. An einem Segmentende wird hierauf durch sorgfältiges Abschneiden eine Strecke der innersten Membran freigelegt, der kleine Membranzylinder mit einem Seidenfaden zugebunden und nun dieses zugebundene Ende mit einem kleinen Stäbchen oder mit einem abgerundeten Glasstab durch das ganze Segment hindurchgeschoben, so daß die von der Schilfwand abgelöste Membran sich schließlich, wenn das zweite Segmentende erreicht ist, in ganzer Ausdehnung in Form eines Fingerlings auf dem Glasstabe befindet. Man kann auf diese Weise Schläuche von 15 cm Länge und 8—10 cm Fassungsraum erhalten. Nach P. Philippson besteht die Membran der Schläuche aus mehreren Schichten ohne Intercellularräume aneinandergefügter gestreckter Parenchymzellen, welche kein Protoplasma und keine Stärke enthalten. Die Dicke der Wand beträgt nach annähernder Messung etwa 0,08 mm. Die Schläuche bestehen beinahe aus reiner Zellulose, wie aus den Untersuchungen von P. Philippson folgt.

Die Prüfung auf die Dichtigkeit der auf die beschriebene Weise gewonnenen Schläuche erfolgt derart, daß die Schläuche über das mit einer Rille versehene Ende eines Glasröhrchens gezogen und fest an dasselbe gebunden, in Wasser eingetaucht und mittels eines Röhrchens

aufgeblasen werden. Entweichen keine Luftblasen, so ist der betreffende Schlauch brauchbar. Man kann den Schlauch auch in einfacher Weise durch Füllen mit Wasser und Stehenlassen auf seine Intaktheit prüfen. Hat man nur kurze, einige Kubikzentimeter fassende Schläuche, so empfiehlt es sich, wenn man eine größere Flüssigkeitsmenge zu dialysieren hat, zwei oder drei Schläuche durch kurze mit Nuten versehene Glasröhrchen miteinander zu verbinden. Die Schläuche können auch bei 150° im Autoclaven sterilisiert werden. Zu Zwecken der Dialyse verfährt man am bequemsten nach Philippson und Kumaji Sasaki so, daß man über die den Schilfschlauch tragende Glasröhre einen Kork schiebt und den mit der zu untersuchenden Lösung gefüllten Schlauch in ein die betreffende Außenflüssigkeit enthaltendes Reagensglas so tief versenkt, bis Außen- und Innenflüssigkeit gleich hoch stehen. Man kann, wie es Sasaki vorschlägt, die Säckchen in einen mit passenden Öffnungen versehenen Holzrahmen hängen und ihn in einen mit destilliertem Wasser gefüllten Zylinder, dessen Inhalt selbsttätig sich erneuert, eintauchen. Die Dialyse kann auch hier durch Anwendung der sogenannten Schütteldialyse sehr beschleunigt werden; die letztere kann hier sehr einfach in der Weise eingerichtet werden, daß der Holzrahmen die ganze Zeit über durch einen kleinen Motor in kurzen Stößen erschüttert wird. Nach Beendigung der Dialyse wird der Schlauch durch Aufschneiden mit einer Schere entleert und die Reste des Inhaltes durch Ausspülen gewonnen.

Nach Metschnikoff läßt der Schilfschlauch Salze, Albumosen, Peptone und Alkaloide durchtreten, während er Bakterien zurückhält; Podbelsky fand, daß bei der Dialyse des Blutserums durch diese Membran das Außenwasser Xanthoproteinreaktion zeigt, was er auf den Durchtritt von Eiweiß bezieht. Conradi fand die Schilfschläuche für sonst diffusible Stoffe durchgängig, für Bakterien impermeabel. Nach Philippson sind die Schilfschläuche geeignet in vielen Fällen das Pergamentpapier zu ersetzen. Sie gestatten eine viel raschere und doch nicht minder sichere Trennung von Kristalloiden und Kolloiden; insbesondere dort, wo es sich um kleine Mengen Substanz handelt, so bei forensischen Untersuchungen oder wo es gilt, Material zu schonen, sind sie den Pergamentschläuchen weitaus überlegen. Philippson fand die Schilfschläuche undurchlässig für Glykogen, koagulable Eiweißkörper, Heteroalbumose, Trypsin und die gerinnungshemmenden Teile des Blutegelextraktes; Pepsin scheint durchzutreten. Auch A. J. J. van de Velde und H. de Waele benützten zu ihren Untersuchungen Schilfschlauchdialysatoren und neben diesen Cellulosesäckchen, welche von der Firma Leune in Paris bezogen waren. Beide sollen sich in bezug auf die Diffusion gleich verhalten. Van de Velde, welcher das Verhalten der Enzyme bei der Diffusion durch die Cellulosemembran untersuchte, fand, daß Invertin, Maltase, Labferment, Zymase, dann Katalase aus lackfarbenem, defibriniertem Rinderblut nicht durch Cellulosemembranen diffundieren und sich, wie die neuerdings durchgeführten Untersuchungen von de Waele lehren, in dieser Hinsicht von den Toxinen unterscheiden. Nach van df Velde diffundieren die Enzyme im Gegensatze zu der Cellulosemembran durch tierische Membranen (Darm). de Waele, welcher systematisch den Durchgang giftiger Substanzen durch derartige Schilfrohr- und Cellulosesäckchen im Tierkörper wie in der Eprouvette studierte, konnte feststellen, daß Tiere (Meerschweinchen, Kaninchen), welche derartige mit Cholera-, Diphtherie-, Milzbrand-, Typhus-, Pyocyaneus- und Tuberkelbazillenkulturen gefüllte Säckchen subkutan trugen, eine steigende, jedoch

schwache und unregelmäßige Immunität erlangten; doch geht ein großer Teil der Tiere auch an der durch die eingeführten Kulturen bedingten Intoxikation und zwar kachektisch zugrunde; insbesondere ist dies der Fall beim Tuberkel- und Pyocyaneusbazillus. Dabei bleibt bemerkenswert, daß diese toxische Wirkung, wie sie sich im Tierkörper offenbart, sich keineswegs in den Dialysaten in der Eprouvette findet, was, wie de Waele mit Recht anführt, einen Vergleich mit der Aggressinwirkung nahelegt. Tiere, welche mit Diphtheriebazillen beschickte Säckchen tragen, sind nicht immun gegen Diphtherietoxin. Auf die von de Waele und Sugg in gleicher Weise durchgeführte Vaccination mit Kuhpockenlymphe wurde bereits an anderer Stelle verwiesen. Die in vitro durchgeführten Versuche de Waeles zeigten, daß weder Diphtherietoxin, noch das Agglutinogen oder Präzipitinogen des Typhusbazillus durch die Cellulosemembran diffundiert, während das Hämolysin des Bacillus pyocyaneus und die Pyocyanase die Membran passieren. Die Dialysate der Kulturen scheinen eine kurze Zeit nach ihrer Injektion bei den betreffenden Tieren eine gewisse präventive, doch keine kurative Wirkung zu vermitteln: nach wiederholter Injektion solcher Dialysate bemerkt man bei derartigen Tieren und auch bei solchen, denen Säckchen eingeführt worden waren, eine gesteigerte Reaktionsfähigkeit in Form des Phänomens der Anaphylaxie.

Ein anderes Dialysiermaterial, das den eben besprochenen Schilf- und Cellulosesäckchen sehr nahe steht, ist Kollodium; man kann leicht aus Kollodium Dialysiermembranen herstellen, wenn man einen abgerundeten Glasstab oder eine Eprouvette zuerst in verflüssigtes Paraffin und nach dessen Erstarren in eine Kollodiumlösung eintaucht; man kann dann, sobald das Kollodium über dem Paraffin fest geworden ist, die gebildete Kollodiumhülle dadurch leicht abstreifen, daß man den Glasstab in warmes Wasser eintaucht und so das Paraffin zum Schmelzen bringt. Derartige Kollodiumsäckchen wurden ähnlich, wie die Schilf- und Cellulosesäckchen von verschiedenen Autoren benützt. Rodet und Guechoff zeigten, daß durch solche Kollodiumdialysatoren Zucker reichlich diffundiert, Eiweiß dagegen nur in kleinen Mengen. Diphtherietoxin konnte in einer die tödliche Dosis weit übersteigenden Menge in einem Kollodiumsäckchen einem Meerschweinchen ohne Schaden in die Bauchhöhle gebracht werden; auch die toxischen Produkte des Typhus und Kolibazillus scheinen zurückgehalten zu werden, ebenso machte Strychninnitrat, in der gleichen Weise eingeführt, keinerlei Erscheinungen. Dagegen zeigte das Serum von Tieren, welche mit Bakterien gefüllte Säckchen trugen, Agglutinationsvermögen als Zeichen, daß immerhin für manche Bakterienprodukte die Membran durchlässig ist. Crendiropoulo und Ruffer sahen die löslichen Produkte des Bacillus pyocyaneus durch Kollodiumsäckchen mittlerer Stärke langsam durchdiffundieren; doch wird ein größerer Teil der Produkte zurückgehalten. Gegen destilliertes Wasser dialysiert nach ihnen mehr Toxin als gegen Bouillon und Pepton, wobei die immunisierenden Substanzen verhältnismäßig leichter durchzugehen scheinen.

Endlich sei auch daran erinnert, daß O. Pascucci, wie bereits an anderer Stelle ausgeführt wurde, künstliche Cholesterinlecithinmembranen, welche durch Verschließen dünner Glasröhrchen mit Seidenstoff, welcher mit Cholesterin oder Lecithin oder dem Gemisch beider imprägniert worden war, als eine Art Dialysiermembran für verschiedene Blutgifte, insbesondere solche, welche zu den Lipoiden Beziehungen haben, verwendete.

Einer besonderen Besprechung bedarf schließlich die von v. CALCAR zu Zwecken der Trennung einzelner Komponenten des Diphtheriegiftes modifizierte Dialyse: Ebenso wie die Diffusionsgeschwindigkeit eine Funktion des Molekulargewichtes ist, so ist auch die Dialyse eine Funktion des Molekularvolumens also gewissermaßen ein Filtrationsprozeß. Die Möglichkeit, daß eine bestimmte Membran dialysiert, ist von dem Verhältnis des Molekularvolumens, zur Porenweite der Membran abhängig und die Tatsache, daß Kolloide nicht dialysieren, findet darin ihre Erklärung, daß ihr Molekularvolumen im Verhältnis zur Porenweite der Membran ein zu großes ist. Da es nun möglich ist, durch Erhöhung der Spannung einer Membran die Porenweite willkürlich, in einem bestimmten Ausmaße zu vergrößern, so kann es unter Umständen gelingen, auch Körper von einem größeren Molekularvolumen, welche sonst nicht durch eine ungespannte Membran durchtreten, durch die gespannte Membran hindurch diffundieren zu lassen. Eine Membran, welche mäßig ausgespannt nur Salze, aber keine Kolloide diffundieren läßt, kann man nach v. CALCAR dadurch, daß man ihr eine immer größere Spannung gibt, auch für gewisse Kolloide von verhältnismäßig kleinem Molekularvolumen durchgängig machen, während Kolloide vom größeren Molekularvolumen noch zurückgehalten werden und erst bei einer weiteren Erhöhung der Spannung durchtreten. Auf diese Weise versuchte v. CALCAR die verschiedenen Bestandteile der Diphtherietoxinbouillon, nämlich die Toxine und die von EHRLICH supponierten Toxone, durch Trennung darzustellen, wobei er voraussetzte, daß sich diese beiden Giftkomponenten voneinander durch das Molekularvolumen unterscheiden. Als Dialysiermembran verwendete v. CALCAR eine zu diesen Zwecken besonders präparierte menschliche Amnioshaut. Die Herstellung einer brauchbaren Membran geschieht nach v. CALCARS Angaben folgendermaßen: Frische Amnioshäute werden eine Minute lang mit einer verdünnten Sublimatlösung (1 : 5000) abgewaschen und 12 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung bei Bruttemperatur digeriert, woraufhin die oberste Epithelschicht aufquillt und sich von der Unterschicht abzulösen beginnt. Nunmehr wird die Haut einige Stunden im Brutofen mit einer verdünnten Pankreaslösung behandelt und hierauf ebensolange in eine erwärmte Salzlösung gebracht. Übergießt man dann die Haut einige Augenblicke mit einer abgekühlten Salzlösung, so läßt sich die stark gequollene obere Epithelschicht leicht ablösen und man erhält eine glashelle, äußerst durchsichtige Membran, die für die Dialyse von Stoffen mit größerem Molekularvolumen geeignet ist. Die Membranen müssen vor dem Versuche im TÖPLERschen Apparate auf ihre Dichtigkeit geprüft werden.

Der v. CALCAR zur Dialyse benützte Apparat, dessen Abbildung v. CALCARS Arbeit wiedergibt, ist an dem nebenstehenden Schema JACOBYS (Fig. 20) ersichtlich. v. CALCARS Apparat ist im Wesentlichen aus einem Glasballon A, welcher einen unteren Hahn zum Ablassen der dialysierten Flüssigkeit und einen seitlichen Hahn zum Lufteinlaß besitzt, und aus einem in diesen Glasballon durch einen langen Schliff eingesetzten oben durch einen gut eingeschliffenen Glasstöpsel geschlossenen Zylinder C zusammengesetzt; dieser letztere trägt unten eine Rille zur bequemen

Fig. 20. Schema des Dialysierapparates nach VAN CALCAR.

Befestigung der Dialysiermembran und an der Seite einen Ansatz (an der schematischen Zeichnung nicht ersichtlich) zur Aufnahme des Schlauches eines Gummigebläses, mit dessen Hilfe der Membran die gewünschte Spannung erteilt werden kann. Die Benützung des Apparates für die Dialyse der Diphtheriebouillon gestaltet sich folgendermaßen: Man bringt in das Gefäß *C* eine Diphtheriebouillon, welche durch gewöhnliche Dialyse von Salzen und den übrigen leicht dialysablen Stoffen befreit worden war; diese Bouillon enthält dann nur Stoffe, welche die Membran nicht passieren. Nun wird mittels des Gebläses die Membran bis zu einem gewissen Maße gespannt und der Dialyse bei niedriger Temperatur und im Dunkel gegen das im Ballon *A* befindliche Wasser angesetzt. Wenn nun nach 3—4 Tagen die durchgetretene Flüssigkeit kein Toxin enthält, so wird noch weiter gespannt, bis man den Grad erreicht, bei welchem das Toxin durchtritt. Der Versuch wird solange fortgesetzt, so lange Toxin noch übergeht; auf diese Weise kann man einen Punkt bestimmen, wo alles Toxin durchgetreten ist und aus der ursprünglichen Giftbouillon entfernt wurde. Untersucht man dann den in *C* zurückgebliebenen Bouillonteil durch Injektion an Meerschweinchen, so findet man, daß man nur eine Flüssigkeit vor sich hat, welche frei von jeder Toxinwirkung ist, jedoch typische Toxonwirkungen entfaltet. Auf Grund dieses Versuches glaubt v. Calcar, daß eine Trennung der Toxine und Toxone vollzogen worden sei und daß das Molekularvolumen des Toxins ein kleineres sei als das des Toxonmoleküls, und dieses wieder zwischen Toxin und Eiweißkörper stehe. Die Dialyse des Diphtherietoxins nimmt nach v. Calcar nicht allein bei erhöhter Spannung der Membran zu, sondern auch wenn man das Toxin gegen Diphtherieserum dialysieren läßt; letztere Erscheinung soll auf „intramolekularer Altraktion" beruhen. Römer, welcher v. Calcars Versuch bei v. Behring, allerdings mit unzulänglichen Mitteln und vor allem mit einer ungeeigneten Membran, wiederholte, sowie Walbum, welcher noch in Madsens Laboratorium den v. Calcarschen Versuch einer gründlichen Nachprüfung unterzog (cit. nach Arrhenius Immunochemie S. 131), kamen bezüglich der Trennung des Toxins vom Toxon zu negativen Resultaten. Indes scheint mir die Methode v. Calcars immerhin für die gelegentliche Untersuchung von Giftgemischen kolloidalen Charakters und ähnlicher Substanzen verwendbar und empfehlenswert, weshalb auch diese originellen Trennungsversuche hier ausführlich beschrieben wurden. Die v. Calcarsche ungespannte Amniosmembran läßt nach Jacoby sowohl Labferment, wie Pepsin durchtreten.

Daß jedoch nicht allein zur Trennung der erwähnten Giftgemische die Dialyse verwendbar ist, sondern für die Zerlegung komplex wirkender Antigene in weiterem Ausmaße dienen kann, soll in folgendem kurz berührt werden.

Der Einfluß der Salze bei der Antigenwirkung.

Die große Rolle, welche die Salze bei der Entfaltung physiologischer Wirkungen der Kolloide im allgemeinen spielen, hat der Dialyse bei der experimentellen Forschungsmethodik der Immunkörper eine große Wichtigkeit verliehen. Wir wissen aus den grundlegenden Arbeiten Buchners, daß für zahlreiche Wirkungen der Antigene die Anwesenheit von Salzen ausschlaggebend ist. So fand zuerst Buchner, daß die bakterizide Alexinwirkung des Normalserums durch Dialyse vollständig

aufgehoben und durch nachträglichen Salzzusatz wieder reaktiviert werden kann, sobald der Salzzusatz erfolgt, bevor die Einwirkung des Wassers bleibende Veränderungen gesetzt hat; dabei kann die Rolle des Salzes, im speziellen des Kochsalzes keine direkte sein, d. h. das Kochsalz wirkt in der angewandten geringen Konzentration (0,75%) nicht direkt antiseptisch, sondern indirekt, indem durch dessen Anwesenheit die normale Funktion der Alexine erst möglich wird. Außer Kochsalz können dabei auch andere Salze, so Kalium-, Lithium-, Ammoniumchlorid, Natrium-, Kalium-, Ammonium- und Magnesiumsulfat die gleiche Funktion im Serum ausüben. Die Untersuchung der globuliziden Wirkung scheiterte zunächst bei Buchner an der technischen Schwierigkeit, da die roten Blutkörperchen in einem salzfreien oder salzarmen Medium nicht existenzfähig sind.

Shibayama ist es später gelungen, zu zeigen, daß normales Hundeserum, welches zwei Tage lang gegen fließendes Wasser dialysiert worden war, die Wirkung einbüßt, Erythrocyten des Kaninchens und Meerschweinchens aufzulösen und nicht durch Zusatz irgend eines komplementhaltigen Normalserums reaktiviert werden kann. Diese Inaktivierung durch Dialyse verhält sich also völlig verschieden von der Inaktivierung durch Erwärmen; es gelingt jedoch das durch Dialyse inaktivierte Serum nach Shibayama durch Zusatz von Blutsalzen, vor allem von Natriumkarbonat wieder zu reaktivieren. Zum Unterschiede von Normalserum ist es Shibayama weder bei einem Hundeimmunserum, noch bei Ziegenimmunserum möglich gewesen, die hämolytische Wirkung durch Dialyse aufzuheben; es blieb vielmehr der hämolytische Effekt der Immunsera vor und nach der Dialyse derselbe. Während aus den Angaben Shibayamas über die befolgte Methodik nur spärliches zu ersehen ist, verdanken wir neueren Arbeiten von Ferrata aus Morgenroths Abteilung und von Sachs und Teruuchi wichtige Aufschlüsse über die einschlägigen Verhältnisse. Ferrata, welcher die Einwirkung der Dialyse auf komplexe Hämolysine untersuchte, umging die deletäre Wirkung salzfreier Medien auf rote Blutkörperchen dadurch, daß er die Aufschwemmungen der Ziegen- oder Hammel-Erythrocyten in isotonischer salzfreier Zuckerlösung, entweder in 4,15%iger Traubenzuckerlösung oder in 8,5%iger Rohrzuckerlösung, vornahm. Es zeigte sich nun, falls komplementhaltiges Meerschweinchenserum — als Amboceptor diente Serum von mit Hammelblut vorbehandelten Kaninchen — 24 Stunden gegen fliessendes Wasser dialysiert worden war, daß die Hämolyse durch Verlust der Wirksamkeit des Komplementes ausblieb; die Ursache der Unwirksamkeit liegt nach Ferrata darin, daß durch die Dialyse das Komplement in zwei an sich unwirksame Komponenten zerlegt wurde, von denen die eine in den bei der Dialyse ausfallenden Serumglobulinniederschlag übergeht, während die andere in Lösung bleibt. Die Vereinigung beider Komponenten in salzhaltiger Lösung reaktiviert wieder die Komplementwirkung. Die im Globulin befindliche Komponente bleibt $^1/_2$ Stunde auf 55° erwärmt wirksam, während die in der überstehenden Flüssigkeit befindliche unter den gleichen Bedingungen zerstört wird. Sachs und Teruuchi, welche bei Verwendung von isotonischen Rohrzuckerlösungen die salzfreie Hämolyse durch komplexe Hämolysine (Meerschweinchenserum als Komplement und Immunserum für Rinderblutkörperchen als Amboceptor) in gleicher Weise studierten, kamen zu ähnlichen Resultaten, wie Ferrata; doch erklären sie die Unwirksamkeit des Komplements durch die Annahme eines fermentartig wirkenden Serumbestand-

teils, der das Komplement in salzarmer Lösung zerstört, nur in einer gewissen Konzentration wirkt und dessen Quantität individuell sehr variiert.

Ähnliche Beobachtungen wie bei den Hämolysinen sind auch bei der Agglutination und wohl auch bei anderen Immunkörperreaktionen angestellt worden. Bereits Bordet hat festgestellt, daß die Anwesenheit des Salzes für das Zustandekommen der Agglutination nötig sei, da salzfrei gewaschene Bakterien sich erst nach Zusatz von Kochsalz agglutinieren lassen. Joos, der dieses Bordetsche Phänomen näher untersuchte, verfuhr derart, daß er sowohl Bakterien wie auch Immunserum salzfrei dialysierte; er fand dabei, wie Bordet, daß ohne Salz die Agglutination nicht zustande kommt, daß jedoch bereits in salzfreiem Gemenge die Bakterien das Agglutinin aufzunehmen vermögen und stellte auf diese Weise die beiden Phasen der Agglutination, die Phase der Bindung und jene der sinnfälligen Agglutination fest. Auch Friedberger u. a. kamen zu dem gleichen Resultate; das Salz, welches bei dem Zustandekommen der Agglutination mitwirkt, kann natürlich recht verschiedenartig sein; nach Friedberger kann das Kochsalz sowohl durch anorganische Salze (Kaliumbromid, Kaliumbiphosphat) als auch durch organische Körper (Asparagin, Traubenzucker) vertreten sein und Joos verwendete neben Kochsalz die Chloride, Jodide und Bromide der verschiedenen Alkalien und Erdalkalien. O. Porges stellte fest, daß mit steigender Menge eines zugesetzten Agglutinins die zur Agglutination nötige Salzmenge abnimmt. Im allgemeinen spielen jedoch dabei die Salze, respektive ihre Ionen, dieselbe Rolle, wie bei den Fällungen der Kolloide überhaupt, eine Tatsache, welche sich aus den wiederholt bereits angeführten Studien von Landsteiner, Neisser und Friedemann, Bechhold, W. Biltz, Buxton, Porges und anderen mit voller Sicherheit ergibt und worauf auch Zanggers und Paulis bedeutsame Untersuchungen schon früher hingewiesen haben. Man kann wohl in Anlehnung an des letzteren Autors Studien vermuten, daß das salzfreie, unelektrische Eiweiß jeder biologischen Bedeutung entbehrt und erst durch die Salze seine Aktivität erhält. Es ist selbstverständlich, daß durch diese kurzen Angaben die Tatsachen über den Einfluß der Salze auf die Antigene nicht erschöpft sind; insbesondere bedarf die Einwirkung hyperisotonischer und konzentrierter Salzlösungen auf die Antigene einer besonderen Besprechung.

Die ersten und wichtigsten Tatsachen verdanken wir auch hier den Studien Buchners. Derselbe prüfte den Einfluß höher konzentrierter Salzlösungen auf die Alexine, Enzyme und Toxalbumine und stellte zunächst die gesetzmäßige Schutzwirkung der verschiedenen Salze je nach dem Grade der ausgeübten Wasseranziehung fest. Er fand zuerst, daß die Wirksamkeit der Alexine, welche er als eiweißartige Bestandteile des Blutserums, wie mir scheint mit Recht, auffaßte, durch Zusatz gewisser Salze zum Blutserum eine Steigerung erfährt. So erhöht die Anwesenheit von Sulfaten der Alkalien die Aktivität der Serumalexine (Hundeserum) und gleichzeitig deren Resistenz gegen Erhitzung um etwa 10 Temperaturgrade. Dabei hatte die günstigste konservierende Wirkung ein Zusatz von gleichen Teilen einer 8 % igen Ammonsulfat- oder einer 28,4 % igen Natriumsulfatlösung; Harnstoff und Piperazin hatten keinerlei Wirkung; ebenso vermehrten auch nicht Ammoniumformiat und Succinat die Aktivität des Alexins; Natriumchlorid wirkt als Zusatz ebenfalls konservierend gegen Erhitzen, aber in äquivalenten Mengen wesentlich

schwächer als die Sulfate. Noch geringere Wirkung zeigen die Nitrate. Für die Resistenzerhöhung ist jedoch nicht allein die in der Raumeinheit vorhandene Menge von Salzmolekülen entscheidend, sondern auch das Verhältnis zur Menge der gleichzeitig anwesenden Serumteilchen. Es beruht nach BUCHNER die konservierende Wirkung des Salzzusatzes auf der von verschiedenen Salzen ausgeübten Wasseranziehung, die nach HOFMEISTER bei den Sulfaten am stärksten, bei den Nitraten am geringsten, bei den Kolloiden eine mittlere ist. Ein anschauliches Bild der Erhöhung der bakteriziden Wirkung des Hundeserums auf Bacterium coli durch Ammoniumsulfatlösungen verschiedener Konzentration gibt nachfolgende, der Arbeit BUCHNERS entnommene Tabelle; die Proben, welche 1 ccm Hundeserum und ebensoviel der betreffenden Salzlösung enthalten, werden $^1/_4$ Stunde auf 50° erhitzt, hierauf auf den gleichen Salzgehalt gebracht und vor der Aussaat des Bacterium coli auf das 10fache der ursprünglichen Serummenge verdünnt; die Kontrollproben für die Ernährungstauglichkeit sind ganz gleichartig hergestellt, aber vor Aussaat der Bakterien durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 65° inaktiviert.

Tabelle 9.

Serumproben	Kolonienzahlen auf den Platten	
	sofort nach der Aussaat (Mittelzahl)	nach 4 Stunden
Mit 4% Ammonsulfat	25 490	19 600
Kontrolle inaktiv	—	580 000
mit 8% Ammonsulfat	—	10 340
Kontrolle inaktiv	—	630 000
mit 12% Ammonsulfat	—	15 000
Kontrolle inaktiv	—	682 000
mit 16% Ammonsulfat	—	237 500
Kontrolle inaktiv	—	595 000
mit 20% Ammonsulfat	—	270 000
Kontrolle inaktiv	—	605 000
mit 24% Ammonsulfat	—	260 000
Kontrolle inaktiv	—	667 500

Aus dieser Tabelle ersieht man, daß die günstigste konservierende Wirkung für die bakterizide Substanz des Hundeserums durch Zusatz der gleichen Menge einer 8%igen Ammonsulfatlösung erzielt und erst bei einem Zusatz von 16%iger Lösung das Alexin ungünstig beeinflußt wird. In ganz analoger Weise, wie die Einwirkung der Salze auf die bakterizide Substanz des Normalserums äußert sich auch der Einfluß des Salzzusatzes auf Lösungen von Tetanustoxin und Diphtherietoxin. Auch hier wird die Resistenz gegen Erhitzen in gleicher Weise erhöht, wobei abermals die Sulfate (Natriumsulfat) eine stärkere Wirkung ausüben, als die Chloride (Kochsalz), welche nur eine geringe Erhöhung der Resistenz bedingen, während die Nitrate (Natriumnitrat) gar keinen Einfluß mehr ausüben. Auch bezüglich des Invertins hat BUCHNER ähnliche Verhältnisse, wie sie übrigens BIERNACKI schon bei anderen Fermenten beschrieben hatte, vorgefunden. Auch Blutkörperchen vom Kaninchen und Hund zeigen sich in äquivalenten Lösungen der Sulfate wesentlich resistenter gegen Erhitzung als in solchen der Nitrate, während Natriumchlorid eine mittlere Stufe annimmt; ebenso sind Milzbrandsporen in stärker salzhaltigen Lösungen gegen Erhitzen widerstandsfähiger als im bloßem Wasser.

Gürber hat für normale Hämolysine systematisch den Einfluß der Salze untersucht und vor einiger Zeit hat in größeren Untersuchungsreihen Otto Porges verschiedene Bakteriensuspensionen zum Zwecke der Untersuchung ihrer Ausflockungsfähigkeit dem Einfluß verschiedener Salzlösungen ausgesetzt. Es ergab sich, daß alle untersuchten Bakterien von Ammonsulfat, die Typhus- und Cholerabakterien auch von Magnesiumsulfat, die Cholerabakterien sogar von Kochsalz ausgefällt werden, wobei sich nach Hofmeisters Vorgang bei den Eiweißfällungen konstante Fällungsgrenzen für diese Suspensionen auffinden lassen. Die Salzfällungsgrenzen steigen in der Reihe: Cholera, Typhus, Koli, Bac. Friedländer. Die Ausflockung ist völlig reversibel, analog den bei den Salzeiweißfällungen festgestellten Tatsachen.

An die grundlegenden Untersuchungen Buchners, die sich mit dem tatsächlichen Material sehr gut in unsere modernen Auffassungen von der kolloidalen Natur der hier in Frage kommenden Körper einfügen, schlossen sich andere, wenn auch bisher wenig systematisch durchgeführte Untersuchungen über die Einwirkung der Salze auf die Verbindung der Antigene und ihrer Gegenkörper. So hat Levaditi gefunden, daß Kalksalze (Calciumdiphosphat, Calciumchlorid) in gewissen Mengen die Agglutination verstärken. Auch Milton, Crendiropoulo und Arnos haben gezeigt, daß für gewisse Bakterien und ihr zugehöriges Agglutinin ein bestimmtes Salz wesentlich fördernd auf die Agglutination einwirkt, während freilich andere dieselbe hemmen; so werden Choleravibrionen vom homologen Serum bei Anwesenheit geringer Mengen von Calciumchlorid in hoher Verdünnung agglutiniert, für andere Vibrionen, die von demselben Serum auch agglutiniert werden, besteht dagegen diese fördernde Wirkung nicht. Die agglutinierende Wirkung des Ricins findet nach Ehrlich auch bei Anwesenheit von Kochsalz, salpetersaurem und chlorsaurem Kalium selbst in gesättigter Lösung statt. Nach Arrhenius verstärkt die Gegenwart von Salzen in größerer Menge die hämolytische Wirkung des Tetanolysins. Man suspendiert die Erythrocyten in einer isotonischen Rohrzuckerlösung, und wenn dann Salz bis zu 0,04 normaler Konzentration zugesetzt wird, so wächst die Hämolyse (in einer Stunde bei 37°) auf etwa den doppelten Wert; eine 0,01 normale Lösung ist ohne erkennbare Wirkung. Verschiedene Salze scheinen in gleicher Konzentration denselben Effekt zu haben, welcher nach Arrhenius auf einer Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit wahrscheinlich beruht. „Aus diesem Grunde scheinen Lysine in physiologischer Salzlösung giftiger zu sein als in ebensolcher Rohrzuckerlösung.“ Auch hier hängt jedoch die Wirkung der Salze von ihrer Beschaffenheit resp. der ihrer Ionen ab.

E. P. Pick hat den Einfluß des Salzzusatzes auf die Agglutination und Präzipitation studiert und gezeigt, daß bei gleichen Mengen des Immunserums die Reaktion ungemein vom Salzgehalt abhängt, damit bei der Ausfällung spezifischer Typhuskoaguline mit Immunserum bereits der Gehalt der Lösung von 0,8 % an Ammonsulfat eine bedeutende Verzögerung des Phänomens herbeiführt und daß der wachsende Salzgehalt die Ausfällung beinahe völlig aufzuheben imstande ist. Doch zeigte sich auch, daß bei konstantem Salzgehalt auch die Konzentration der Eiweißlösung bei der Koagulinbildung von maßgebendem Einfluß ist, indem erhöhte Eiweißkonzentration auf die Koagulinbildung beschleunigend, verminderte Eiweißkonzentration hemmend einwirkt. Porges fand, daß die gleiche Reihe, welche früher bei der Feststellung der Salz-

fällungsgrenzen der einzelnen Bakteriensuspensionen sich ergeben hat, auch hinsichtlich des Widerstandes gegenüber den ausflockenden Kräften eines Immunserums besteht. Es scheint auch nach PORGES, daß die Agglutinabilität der Bakterien von der Menge der von ihnen produzierten Proteine abhängig ist. Bemerkenswert ist dabei, daß mit steigender Menge eines zugesetzten Agglutinins die zur Agglutination erforderliche Salzmenge abnimmt.

Bei den Hämolysinen haben zuerst MARKL und nach ihm EHRLICH und SACHS die Wirkung höherer Salzkonzentrationen auf die Immunhämolyse studiert und fanden, daß die Salze die Hämolyse hemmen resp. aufheben; dabei wird der Amboceptor von den roten Blutkörperchen gebunden, das Komplement jedoch vermag infolge der hemmenden Wirkung des Salzes nicht anzugreifen. Dieses Phänomen kann nach EHRLICH und SACHS zur Trennung des Amboceptors und Komplements bequem verwendet werden, insbesondere dann, wenn durch die geringe Avidität der normalen Amboceptoren zu den roten Blutkörperchen (Receptoren) die früher beschriebene Kältetrennung des Komplements vom Amboceptor nicht gelingt. Man kann die Bindung der Amboceptoren an den betreffenden Receptor dann dadurch erzwingen, daß man das aktive Serum bei 37 ^{0} unter einer erhöhten Salzkonzentration des Mediums auf die roten Blutkörperchen einwirken läßt, wodurch einerseits die Bindung des Amboceptors an die roten Blutkörperchen eintritt, andererseits die Verankerung des Komplements an den Amboceptor durch das Salz gehindert wird. In der überstehenden Flüssigkeit ist dann nach vorhergegangener Verdünnung auf physiologische Salzkonzentration das Komplement durch Zusatz von entsprechenden amboceptorbeladenen Blutkörperchen leicht nachzuweisen. Nach EHRLICH und SACHS genügt bereits eine Konzentration von 1,3 % der Lösung an Ammonsulfat, um die hämolytische Wirkung selbst großer Mengen (1 ccm) aktiven Hundeserums vollständig aufzuheben. Auch BULLOCK, RUFFER und CRENDIROPOULO haben die Einwirkung der Salze auf die Hämolyse studiert; die letzteren fanden, daß sowohl die Salze der Alkalien, wie auch jene der Erdalkalien eine hemmende Wirkung auf die hämolytischen Sera ausüben; nach diesen Autoren zeigt das Kochsalz diese Hemmungswirkung noch in größeren Verdünnungen als das Chlorcalcium; auch diese Autoren bestätigen, daß sowohl Alexin, wie auch Sensibilisator intakt bleiben und nur durch das Salz an ihrer Verbindung gehindert werden.

Bezüglich der Toxin-Antitoxinverbindungen hat KNORR beim Tetanus den Einfluß des Salzes in einigen Versuchen beobachtet und gefunden, daß ein Zusatz von 10 % Kochsalz das Tetanusantitoxin mit dem Toxin hindert. Ausgedehnte Versuchsreihen, welche E. P. PICK und OSWALD SCHWARZ über die Wirkung von Salzen auf die Bindung von Diphtherietoxin und Antitoxin, sowie von anderen Giften vor längerer Zeit angestellt haben und welche demnächst ausführlich mitgeteilt werden, haben indes gezeigt, daß die Verhältnisse hier durchaus nicht so einfach liegen und vor allem von der Beschaffenheit des Immunserums abhängen.

C. Konzentrierungsmethoden der Antigene.

Bereits in den früheren Kapiteln wurden bei den verschiedenen Darstellungsmethoden gleichzeitig auch die Arten der Konzentrierung besprochen und es sollen demnach hier nur diejenigen Methoden und Apparate beschrieben werden, welche zur Ergänzung des früher Gesagten dienen sollen.

Die Konzentrierung der Antigene kann auf mehrfache Art durchgeführt werden. Die eine Konzentrierungsart geht mit der Isolierung der betreffenden Antigene Hand in Hand und setzt voraus, daß das betreffende Antigen durch ein Fällungsmittel aus der Lösung in Form eines festen Niederschlags gewonnen werden kann; dadurch, daß der letztere in einem geringeren Flüssigkeitsvolumen als der Ausgangslösung entspricht, gelöst wird, kann eine erhebliche Konzentration des Antigens erreicht werden. Diese Konzentrierungsart, welche gleichzeitig mit einer Reinigung des betreffenden Antigens einhergeht, wird häufig bei manchen Toxinen, so insbesondere beim Tetanustoxin durchgeführt, indem die Gifte mit Neutralsalzen oder mit Alkohol oder anderen früher angeführten Fällungsmitteln niedergeschlagen und hierauf in konzentrierte Lösung gebracht werden. Es ist natürlich, daß auf diese Weise nicht allein die Antigene, sondern auch alle sie begleitenden Beimengungen ebenfalls in konzentriertem Zustande in Erscheinung treten; man findet daher auch häufig, daß bei den verschiedenen Reinigungsversuchen, welche naturgemäß mit einer Verdünnung der Stammlösung einhergehen, gewisse chemische Reaktionen, so z. B. die Eiweißreaktionen verschwinden, ohne daß das betreffende Präparat seine Wirksamkeit eingebüßt hätte; es wäre jedoch verfehlt aus diesem Verhalten auf die chemische Natur irgendwelche Schlüsse zu ziehen, da nur die konzentrierten Lösungen, in welchen, wie zahlreiche Erfahrungen zeigen, die Proteinreaktionen wieder auftreten, verwendbare Resultate ergeben.

Eine andere und zwar am häufigsten angewendete Konzentrierungsmethode ist jene durch Einengen oder Eindampfen. Da man es bei den Antigenen vielfach mit Körpern zu tun hat, welche gegen höhere Temperaturen empfindlich sind, können in der Regel derartige Prozeduren nicht, wie sonst, auf dem freien Wasserbade bei 100° durchgeführt werden, sondern man benützt evakuierte Gefäße, um im luftverdünnten Raume bei einer niedrigeren Temperatur, zumeist bei Temperaturen zwischen 25° und 40°, die betreffenden Lösungen einzuengen. Bei diesem Verfahren werden natürlich alle Körper, welche die verdünnte Lösung aufweist, wie z. B. Salze, freie Säuren, Alkalien, ebenfalls mit konzentriert und man hat daher vor allem darauf zu achten, daß derartige Substanzen, welche in verdünntem Zustande zwar die Antigene nicht schädigen, im konzentrierten jedoch auf dieselben zerstörend einwirken, entweder durch sorgfältige Neutralisation unschädlich gemacht oder durch vorhergehende Dialyse entfernt werden. Es wird daher in der Regel ein Konzentrierungsverfahren durch Einengen zumeist bei Antigenen vorgenommen, die vorher einem der früher beschriebenen Reinigungsverfahren unterzogen worden waren.

Es ist dabei weiter zu berücksichtigen, daß viele Antigene, welche in einem bestimmten kolloidalen Milieu sehr wohl ihre Wirkung ausüben können, diese Aktivität ganz oder zum Teil einbüßen, sobald diese kolloidale Lösung konzentriert zur Anwendung kommt. Manche Phänomene, wie jenes von Neisser und Wechsberg bei den Alexinen, von Madsen, Otto und Sachs beim Botulismusgift und Gegengift, beim Arachnolysin und Antilysin, sowie die Hemmungszone bei der Präzipitin- und Agglutininreaktion und andere scheinen dafür zu sprechen, indem sie zeigen, daß durchaus nicht eine Zerstörung der Antigene vorliegt, da die in konzentrierter Lösung inaktiven Körper beim Verdünnen wieder wirksam werden.

Ein weiteres wichtiges Moment beim Eindampfen im Vakuum ist die sorgfältige Überwachung der Temperatur, da es sehr leicht vorkommen kann, daß bei einem zeitweisen Nachlassen des Vakuums die niedrige Temperatur plötzlich emporschnellt und auf diese Weise die völlige Zerstörung des scheinbar unter Vakuum eingeengten Antigens herbeiführen kann. Daß es sich in vielen Fällen empfiehlt die Konzentrierung bei Lichtabschluß und steril vorzunehmen, braucht nicht weiter hervorgehoben zu werden. Es ist darauf zu achten, daß die Prozedur des Einengens nicht allzulange dauert, da viele Antigene schon bei Bruttemperatur einen Teil ihrer Wirksamkeit einbüßen und andererseits die Gefahr bakterieller Verunreinigung mancher aseptisch gewonnener Flüssigkeit bei langem Aufenthalt in dem geheizten Vakuumapparat schwer vermieden werden kann.

Bei manchen Substanzen, welche längere Einwirkung von Bruttemperatur vertragen, läßt sich verhältnismäßig schnell in bequemer Weise ohne Anwendung von Vakuum ein Einengen selbst bis zur Trockenheit dadurch erzielen, daß man die Flüssigkeit in flache Glasschalen in kleinen Portionen verteilt und in den Brutschrank einstellt; man kann auf diese Weise leicht relativ große Flüssigkeitsmengen konzentrieren. Diese Prozedur kann vollkommen steril vorgenommen werden: Die flachen, viereckigen Glasschalen werden mit Filtrierpapier bedeckt, dasselbe mit einem quer über die Schale gespannten Bindfaden befestigt und die so montierte Schale wird sterilisiert. Eine Ecke der Papierdecke kann gelüftet und die Flüssigkeit mittels einer Pipette eingefüllt werden.

Die Einrichtungen zum Einengen von Flüssigkeiten im Vakuum laufen nahezu alle auf das gleiche Prinzip hinaus, wenn sie auch der Form nach recht mannigfach sind. Das einfachste und wohl am allerwenigsten eingreifende Verfahren besteht darin, daß man in einem mittels einer Wasserstrahlpumpe leicht evakuierbaren Exsikkator die betreffende Flüssigkeit über einer hygroskopischen Substanz, sei es über konzentrierter Schwefelsäure, Phosphorsäureanhydrid, Chlorcalcium, Kaliumhydroxid oder anderen bei Zimmertemperatur eintrocknen läßt. Dieses Verfahren kann naturgemäß nur bei kleineren Flüssigkeitsmengen angewendet werden und erfordert längere Zeit. Rascher wird die Einengung im Vakuumexsikkator bei Zusatz wasserentziehender Mittel dann erzielt, wenn man dieselbe noch durch die Anwendung höherer Temperaturen unterstützt. Diesem Zwecke dient ein von Proskauer konstruierter heizbarer Trockenapparat, wie ihn Fig. 21 (p. 550) darstellt. Derselbe besteht aus einem mit konzentrierter Schwefelsäure beschickten Vakuumsexsikkator, der mit einer innerhalb der Glocke *A* befindlichen doppelwandigen Erwärmungskammer umgeben ist und aus einem Expansionsgefäß *B*, das durch eine Flamme erwärmt wird; dieses Gefäß wird durch das Rohr *C* mit Wasser gefüllt und das im Gefäß *B* erwärmte Wasser steigt durch das Rohr *D* zur Erwärmungskammer und fließt durch das Rohr *E* wieder zurück. Nach Evakuierung des Exsikkators mittels Wasserstrahlpumpe bei dem unterhalb des Exsikkators angebrachten Hahn wird die Flamme auf die gewünschte, durch das in das Expansionsgefäß eingeführte Thermometer leicht kontrollierbare Temperatur eingestellt, und der Apparat kann dann der selbsttätigen Funktionierung überlassen bleiben.

Zum Eindampfen größerer Flüssigkeitsmengen im Vakuum sind eine große Reihe verschiedener Modelle konstruiert worden, die sich zum Teile im Laboratorium auch mit Hilfe von Glasgefäßen leicht improvisieren lassen. Ein vielfach benütztes Modell der Vakuumdestillation für Flüssigkeits-

mengen von einigen Litern ist der Vakuumdestillierapparat, dessen sich Brieger beim Einengen der ptomainhaltigen Lösungen bediente (Fig. 22). Derselbe besteht aus einem mit einer unterstellten Gasflamme heizbaren doppelwandigen Kupferkessel, dessen äußerer Mantel nach Art der Wasser-

Fig. 21. Proskauers heizbarer Vakuumtrockenapparat.

Fig. 22. Vakuumdestillierapparat nach Brieger.

bäder mit konstantem Zu- und Abfluß mit Wasser gefüllt wird; die einzuengende Flüssigkeit kommt entweder direkt oder in einer Schale in das Innere des Kessels, welcher mit einem luftdicht schließenden, mit Flügelschrauben zu befestigenden Helm verschlossen wird. Derselbe trägt eine oder zwei Glasscheiben, durch welche man den Gang der Destillation im Innern des Apparates verfolgen kann, ferner drei mit Gummistopfen verschließbare Tubusöffnungen. In die eine ist ein Thermometer zur Kontrolle der Temperatur im Innern des Apparates eingefügt, durch die zweite kann ein Tropftrichter, der zum Einfüllen frischer Flüssigkeitsmengen in den Apparat dient, eingeführt werden, und die dritte trägt eine Vorrichtung zum Einlassen frischer getrockneter Luft in den Apparat, um das besonders bei quantitativen Versuchen häufig unangenehme Schäumen und Stoßen, zumal eiweißhaltiger Flüssigkeiten zu vermeiden. Diese Vorrichtung besteht aus einer mit konzentrierter Schwefelsäure beschickten Vorlage, welche mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen ist, durch den einerseits ein mit einem Hahn verschließbares, in eine Kapillare ausgezogenes, bis an den Boden der Vorlage reichendes Glasrohr*) geführt ist, andererseits eine U-förmig gebogene, kurz

*) In der beigegebenen Figur Nr. 22 irrtümlich gezeichnet, während das andere mit dem Apparat verbundene Glasrohr, das kurz sein soll, bis an den Boden der Vorlage reichend dargestellt ist.

unter den Stopfen reichende Röhre, durch welche die bei der Kapillare eingelassene Luft, nach Durchstreichen der konzentrierten Schwefelsäure dem Destillierapparat zeitweise zugeführt werden kann. Die Wasserdämpfe streichen durch das Abzugrohr, an welches sich zweckmäßig ein Kühler anschließt, in die mit einem Manometer versehene Vorlage, welche mit der Wasserstrahlpumpe verbunden ist. Es empfiehlt sich, um eine gleichmäßige Erwärmung des Destillierapparates auch am Helm zu erreichen und dadurch die Kondensation der Dämpfe zu verhüten, den Helm während des Funktionierens des Apparates mit einem Asbestdeckel zu überdecken. Nach diesem Modelle sind zahlreiche Modifikationen ausgeführt worden. Eine große Vakuumanlage, die aus mehreren derartigen Apparaten zusammengesetzt ist und an Stelle des heißen Wassers mit Dampf geheizt wird, welcher aus einem Dampfkessel eingeleitet durch Dampfschlangen zirkuliert, funktioniert seit Jahren klaglos in dem chemischen Laboratorium der Rudolfstiftung in Wien.

Neben dem Briegerschen Vakuumapparat wurde von Dzierzgowski und Rekowski ein anderer Abdampfapparat konstruiert, bei welchem das Abdampfgefäß in einem die Form eines Metalltrichters zeigenden Wasserbade eingestellt ist; da jedoch auch dieser Apparat, ähnlich wie der Briegersche, nicht bequem genug sterilisierbar resp. keimfrei verschließbar ist und die Temperatur und das Wasserniveau innerhalb des Trichters nicht gleichmäßig erhalten wird, hat Kašparek durch Anwendung des Ehmannschen Wasserwärmers und Niveauhälters (Chemikerzeitung 1891, Nr. 13 und 14) einen neuen Abdampfapparat angegeben, welcher den Vorzug besitzt, daß er sehr leicht vollständig zerlegbar ist, gut gereinigt und sterilisiert werden kann und eine exakte Temperaturregulierung gestattet. Der Apparat besteht aus einem Abdampfgefäß, welches ein graduiertes, birnenförmiges, etwa 2 Liter fassendes Glasgefäß ist, einem als Wasserbad dienenden Glastrichter, in welchem die Abdampfbirne bis an den Gefäßhals eingetaucht ist, und dem Ehmannschen Wasserwärmer, welcher aus einer Metallkugel besteht, in welcher das Wasser durch eine untergestellte Gasflamme erwärmt wird; das Wasser steigt dann aus dieser unterhalb des Trichters angebrachten Metallkugel durch eine in die Spitze des Trichters eingefügte Röhre in das Wasserbad und erwärmt dasselbe gleichmäßig; die Temperaturregulierung erfolgt durch einen in das Wasserbad eingesetzten, in die Gaszuleitung eingeschalteten Thermoregulator. Das Niveau im Wasserbad wird durch einen Ehmannschen Niveauhälter reguliert; das völlig eingetauchte Abdampfgefäß wird mittels einer Wasserstrahlpumpe evakuiert. Da das Gefäß von allen Seiten gleichmäßig erwärmt ist, tritt keine Dampfkondensation an den Wänden ein. Um die abzudampfende Flüssigkeit vor der chemischen Einwirkung des Lichtes zu schützen, kann man nach Kašparek das Wasser des Wasserbades mit rotem oder braunem Anilinfarbstoff anfärben. Bei gutem Vakuum können mit diesem Apparat bei 27° Wärme in 36—40 Stunden 2 Liter Flüssigkeit bis auf 200 ccm vollkommen keimfrei eingeengt werden.

Vakuumanlagen für den Großbetrieb, wie sie in Seruminstituten zur Darstellung von Trockenpräparaten benützt werden, stellen Fig. 23 und 24, Fig. 23 speziell die Vakuumanlage im staatlichen serotherapeutischen Institute in Wien dar. Das Prinzip derselben ist ein dem früher beschriebenen analoges, nur wird der große Kessel dieser Apparate durch eine mittels eines Motors getriebene Luftpumpe evakuiert.

Der Vakuumapparat des Wiener Seruminstitutes stellt sich folgendermaßen dar: Der doppelwandige, ca. 1,5 m tiefe und 1 m in Breite und Höhe messende eiserne Kessel ist in seinem Innern durch hohle Metallplatten, in welchen die die Heizung vermittelnden Heißwasserrohre laufen, in zahlreiche Fächer geteilt, die zur Aufnahme der auf flachen Glasschalen ausgegossenen Flüssigkeit dienen; das Wasser wird in einem großen, in einem Nachbarraume aufgestellten Reservoir durch Heizung mittels Dampfschlangen, in denen gespannter Wasserdampf streicht, auf die gewünschte Temperatur gebracht und zirkuliert dann kontinuierlich

Fig. 23. Große Vakuumanlage im k. k. sero-therapeutischen Institute in Wien.

in dem ganzen Röhrensystem; es kann auch auf diesem Wege dadurch, daß man einige Zeit heißes Wasser durchleitet, der ganze Apparat bequem sterilisiert werden. An seiner vorderen, in Schienen laufenden Verschlußwand, ähnlich wie in Fig. 24, sowie an der Rückwand sind Fenster angebracht, welche bei entsprechender künstlicher Beleuchtung die Einsicht in das Innere des in Betrieb stehenden Apparates gestatten. Ein in der Decke angebrachtes Manometer und ein Thermometer geben über den Stand des Vakuums, sowie der Temperatur Aufschluß. In die Vorderwand ist ein mit einem Hahn verschließbares Messingrohr eingefügt, das in eine große, eine Öffnung tragende Metallkapsel, welche mit steriler Watte gefüllt wird, mündet und dazu dient, Luft in den evakuierten Apparat nach Beendigung der Trocknung einströmen zu lassen; durch die vorgelegte Watte wird die langsam eindringende Luft keimfrei filtriert. Zum Schutze gegen Rost und der leichten Reinigung wegen ist der ganze Apparat mit einem Ölfarbenanstrich versehen, so daß leicht eine Desinfektion auch durch Abwaschen der Wände mit Lysol möglich ist. Außerdem ist der ganze Raum, in dem die Vakuumanlage

untergebracht ist, leicht desinfizierbar. Die Handhabung geschieht derart, daß der vorgeheizte und vorher sterilisierte Apparat, in welchen auf Glasschalen die einzuengende oder zu trocknende Flüssigkeit eingestellt worden war, durch Festschrauben der vorderen Wand geschlossen wird; durch die in Betrieb gesetzte Luftpumpe wird der Apparat in wenigen Minuten evakuiert, wodurch die luftdicht schliessende Vorderwand fest angepreßt wird; ein in das Heizrohrsystem eingeschaltetes Thermometer zeigt die Temperatur des zugeführten Wassers an und der Vergleich mit dem die Innentemperatur des Apparates anzeigenden Thermometer erlaubt ein Urteil darüber, ob die Innentemperatur bereits die gewünschte Temperaturkonstanz bei dem gegebenen Vakuum erreicht hat. Der Apparat erlaubt ca. 10 l Serum bei einer Temperatur von 35° und einem Vakuum von ca. 70—75 mm in ca. 10 bis 12 Stunden völlig zur Trockne einzudampfen. Zum Abdampfen von flüchtigen Substanzen kann derselbe mit einem Kondensationsapparat in Verbindung gebracht werden.

Ein weiteres Konzentrierungsprinzip bei niederer Temperatur ist die Verdampfung der Flüssigkeit im Luftstrom; dieses Prinzip, welches wegen der Schnelligkeit, mit welcher selbst große Flüssigkeitsmengen leicht konzentriert werden können, ungemein empfehlenswert ist und bereits in großen Vakuumanlagen, wie sie manche Seruminstitute besitzen (z. B. Calmettes Institut in Lille), Anwendung fand, ist dasselbe, das Faust gelegentlich der Verarbeitung seiner Sepsinlösungen verwendet hat und welches in Fig. 25 nach Faust dargestellt ist. Der Faustsche Apparat besteht zunächst aus dem den Luftstrom erzeugenden Apparat, einem mit Motor betriebenen Drehstrom-Ventilator, welcher in der Minute etwa 1360 Umdrehungen macht und 25 ccm Luft in der Minute fördert; der durch diesen Apparat erzeugte Luftstrom wird durch

Fig. 24. Große Vakuumapparate. *a* offen, *b* geschlossen.

eine Heizvorrichtung und dann durch einen Glaskasten, welcher auf einem großen Wasserbade aus Weißblech sitzt, sodann durch ein weites Abzugsrohr durch ein Fenster ins Freie geleitet. Die Heizvorrichtung, welche zwischen Ventilator und Glaskasten eingeschaltet ist, besteht aus einem mit Asbestpappe überzogenen, doppelwandigen Kasten aus Eisenblech, dessen äußere Bodenfläche durchlocht ist, so daß die von den untergestellten Brennern erzeugten heißen Verbrennungsgase zwischen den Wänden des Heizkastens emporströmen und durch eine oben befindliche kleine Öffnung entweichen können. Die zu verdampfende Flüssigkeit wird in Schalen mit ebenem Boden in den Glaskasten auf das Wasserbad gebracht und das Wasser bis zum Sieden erhitzt. Die eine Hälfte der vorderen Fläche des Glaskastens bildet ein aufklappbares Fenster, welches das bequeme Einbringen und Herausnehmen der die Flüssigkeit enthaltenden Schalen ermöglicht. Die Temperatur innerhalb des Kastens wird durch ein eingeschaltetes Thermometer gemessen; dieselbe betrug bei dieser Faustschen Versuchsanordnung nicht über 23°, doch kann dieselbe durch vermehrte Wärmezufuhr leicht beliebig erhöht werden. Faust konnte auf diese Weise 5—6 Liter wässeriger Flüssigkeit bei 22—23° innerhalb 6 bis 8 Stunden zur Trockenheit eindampfen; die erforderliche Zeit schwankt je nach dem Sättigungsgrade der Luft mit Wasserdampf und der Temperatur desselben. Es ist selbstverständlich, daß diese Versuchsanordnung nur dort benutzt werden kann, wo es sich um die Gewinnung von zwar temperaturempfindlichen, aber nicht flüchtigen und luft- resp. sauerstoffempfindlichen Substanzen handelt. Der Betrieb ist billig, da auch der Stromverbrauch ein geringer ist; 6 Liter wässeriger Flüssigkeit können nach Faust mit einem Kostenaufwand von 50 Pfg. zur Trockenheit eingedampft werden.

Fig. 25. Apparat zur Verdampfung im Luftstrom nach Faust.

Ein weiteres Konzentrierungsprinzip besteht in dem Ausfrieren der zu konzentrierenden wässerigen Lösungen. Da zur Eisbildung nur das Wasser verwendet wird, so kann die Konzentrierung eiweißhaltiger wässeriger Lösungen sehr einfach in der Weise durchgeführt werden, daß sie in eine Kältemischung in entsprechenden Gefäßen eingetaucht werden und der ausgeschiedene Eisbrei durch Aufgießen auf abgekühlte Tücher oder durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit abgetrennt wird. Durch Wiederholung dieses schonenden Verfahrens gelingt es, eine erhebliche Konzentrierung herbeizuführen. Man kann zweckmäßig auch in der Weise verfahren, daß man das gebildete Eis nicht sofort abfiltriert,

sondern die gefrorene Masse langsam auftauen läßt. Wenn alles Eis bei ruhigem Stehen bei Zimmertemperatur geschmolzen ist, so läßt sich eine mehr oder minder deutliche Schichtung in eine meist fast farblose obere Zone, bestehend aus reinem Wasser, das aus den nach oben geschwommenen Eisstücken entstanden ist, und eine weitere eiweißhaltige Schicht unterscheiden; durch Abheben der wässerigen Schicht mittels Pipette oder Ablassen der unteren Schicht kann man die konzentrierte Lösung gewinnen. BUJWID, der sich dieses Verfahrens bei der Konzentrierung der Diphtherie- und Tetanusantitoxine bediente, gelang es, nach 2—3 maligem Einfrierenlassen ein Serum zu gewinnen, welches $2^1/_2$—3 mal konzentrierter war als das Ausgangsmaterial; auch AHRENS*), sowie MEISENHEIMER*) konnten auf diese Weise zymasehaltige Preßsäfte bedeutend an Zymase anreichern. Als Kältemischung kann man die übliche Mischung von Kochsalz (Viehsalz) und Eis verwenden und verfährt am zweckmäßigsten derart, daß man die Flüssigkeit entweder in hohen Zylindergefäßen einfrieren läßt, oder in schmalen hohen Scheidetrichtern, welche eine bequeme Trennung der beiden Flüssigkeitsschichten der aufgetauten Masse gestatten. Zum Ausfrieren größerer Flüssigkeitsmengen dienen Refrigeratoren. Fig. 26 stellt ein nach einem im Wiener Seruminstitut befindlichen

Fig. 26. Schema einer größeren Refrigeratoranlage.

Refrigerator entworfenes Schema dar. Dieser ca. 2 m Länge, 1 m Breite und Tiefe messende Refrigerator besteht aus einem betonierten Becken, welches durch eine doppelwandige, vorne eine Tür tragende Holzverkleidung mit Isolierfüllung nach außen isoliert ist; das Becken wird entweder mit einer Lösung von Kochsalz (Viehsalz) oder Chlormagnesium mittlerer Konzentration gefüllt. Die Kühlung des Refrigerators erfolgt durch eine Ammoniakmaschine mittels am Boden und an den Wänden des Refrigerators verlaufenden Kühlröhren. Dadurch wird die Sole des Beckens so tief gekühlt (bis —10° und —14°), daß eiweißhaltige Lösungen,

*) cit. nach E. und H. BUCHNER und M. HAHN: Die Zymasegärung, München und Berlin 1903, pag. 226—228.

welche in die Sole eintauchen, in einigen Stunden zum Gefrieren gebracht werden. Das Becken selbst ist von einer doppelwandigen Holzwand überdeckt, welche, wie in der Zeichnung ersichtlich, mit Deckel verschließbare Öffnungen trägt zur Aufnahme der in die Sole eingesetzten hohen Gefrierzylinder. Die gekühlte Sole kann, wie dies im Wiener Institut der Fall ist, in Kühlschlangen mittels eines Motors weiter geleitet werden und zur Kühlung von Konservierungsräumen dienen.

D. Konservierungsmethoden der Antigene.

Um Antigene zu konservieren, müssen eine Reihe von Faktoren ferngehalten werden, welche auf Grund der gemachten Erfahrungen dieselben schädigen; zu diesen Faktoren gehört vor allem nach Ehrlich die Einwirkung von Wasser, Luft resp. des Sauerstoffes der Luft, des Lichtes und der Wärme.

Über den schädigenden Einfluß des Wassers auf Antigene, speziell auf seine Alexine und Toxine, hat Buchner die bereits erwähnten Untersuchungen, in denen er die Resistenzerhöhung bei Anwesenheit von Salzen auf Wasserentziehung bezog, angestellt und auch Knorr machte die Beobachtung, daß sich das Tetanusgift in rein wässerigen Lösungen leicht verändert, während es sich in salzhaltigen gut konserviert. Als Konservierungsflüssigkeit, deren Wirksamkeit auf Wasserentziehung beruht, wurde bei den verschiedenartigsten Antigenen Glyzerin in den mannigfachsten Konzentrationen angewandt; als eine sehr gut konservierende Mischung hat sich Ehrlichs Kochsalzglyzerinmischung bewährt, welche 10 % Kochsalzlösung und 50—80 % Glyzerin enthält. Andere Wasser entziehende Mittel wurden bereits in dem vorhergehenden Kapitel angeführt. Buchner hatte ferner, von dem gleichen Gesichtspunkt der Resistenzerhöhung durch Wasserentziehung ausgehend, auch die Resistenz der Alexine, Enzyme und Toxalbumine im trockenen Zustand untersucht, nachdem bereits früher bekannt war, daß Invertin im trockenen Zustande $^1/_2$ Stunde auf 150° erhitzt werden kann, ohne seine Wirkung zu verlieren und daß alle Enzyme trocken weit höhere Temperaturen ertragen als im feuchten Zustande. Tizzoni und Cattani fanden das Tetanustoxin nach einstündiger Erhitzung auf 100° im trockenen Zustande noch wirksam, und auch Roux und Yersin, sowie Brieger, Fränkel und Buchner selbst bestätigten den großen Unterschied, der zwischen der Erhitzung der Toxalbumine im trockenen und nassen Zustande besteht. Auch die bei Natriumsulfatsättigung ausgefällten Serumalexine des Hundeserums, welche der Hauptmasse nach an das Serumglobulin gebunden sind, konnten, nachdem der Niederschlag vorher im Vakuum bei 40° getrocknet worden war, $^1/_2$ Stunde auf mindestens 70° C im Trockenschrank erhitzt werden, ohne ihre Aktivität zu verlieren, während im gelösten Zustande schon eine halbstündige Erhitzung auf 55° sicher jede Spur von Aktivität vernichtet. Ähnliche Erfahrungen wurden auch bezüglich der Resistenz verschiedener getrockneter Immunsera später gemacht, so von Camus bei den antitoxischen, von Eisenberg bei den agglutinierenden und präcipitierenden Seren. Die von letzterem durch Ammonsulfatfällung erhaltenen Globuline der betreffenden Immunsera erwiesen sich im getrockneten Zustande nach halbstündigem Erhitzen auf 100° C noch wirksam in der gleichen Weise wie die nicht erhitzten Körper und erst bei 130—135° trat eine Denaturierung ein; in Lösung erhitzt, werden die gleichen Immunsera schon bei 68—70° nach $^1/_2$ Stunde inaktiviert. Die

Toleranz der Komplemente und Opsonine verschiedener getrockneter Sera hat Noguchi untersucht und auch hier, wie bereits an anderer Stelle erwähnt wurde (s. pag. 345), eine bedeutende Resistenzerhöhung gegenüber denselben Körpern im flüssigen Zustande gefunden. Die Tatsache, daß die Antigene im trockenen Zustande gegenüber dem Erhitzen eine bedeutende Resistenzerhöhung zeigen, hat auch Löffler, wie bereits früher bemerkt wurde, für bakterielle Antigene in der Immunisierungstechnik mit Erfolg verwendet.

Ebenso wie die Trocknung der Antigene und Immunsera eine bedeutende Resistenz gegen Hitzeeinwirkung gewährt, erweist sie sich auch als ausgezeichnetes Konservierungsmittel bei längerem Lagern für viele, wenn auch durchaus nicht alle Antigene, da in manchen Fällen mit der längeren Aufbewahrung, vielleicht unter dem Einflusse der zur Fällung verwendeten Salze, eine teilweise Denaturierung der wirksamen Eiweißkörper eintritt, welche sich in der schlechten Löslichkeit und der Minderwertigkeit der betreffenden Präparate kundgiebt; insbesondere ist dies der Fall, neben den äußerst empfindlichen komplementhaltigen Seren, bei manchen toxischen Antigenen, wie z. B. bei dem trockenen Diphtherietoxin, welches relativ rasch, wie mich eigene Versuche lehrten, seinen toxischen Titer ändert; aber noch eine zweite Tatsache, auf welche Ehrlich hinweist, ist bei den durch Salzfällungen erzeugten Toxinpräparaten zu beachten, nämlich die, daß feste Gifte, wie z. B. das mit Ammonsulfatfällung gewonnene Tetanusgift, wenn sie fein gepulvert in größeren Quantitäten aufbewahrt werden, eine gewisse mechanische Entmischung zeigen, die durch das höhere spezifische Gewicht der Ammonsulfatkriställchen bedingt ist. Dadurch erhalten die obersten Schichten des Toxinpulvers eine höhere Toxizität. Die Haltbarkeit der getrockneten Antitoxine ist dagegen eine bessere, ein Umstand, der zusammen mit der leichten Darstellbarkeit des Trockenserums Ehrlich zunächst bewog, gerade das letztere als Einheitsmaßstab bei der Ausarbeitung seiner Wertbemessungsmethode des Diphtherieserums anzunehmen. Auch die nach v. Eisler und Ottolenghi durch Eintrocknen auf schwarzem stärkehaltigen Naturpapier, resp. auf Löschpapierstreifen bewirkte Konservierung präzipitierender Sera läßt selbst nach Jahren die Lösungen dieser Präparate ihre ungeschwächte Wirksamkeit beibehalten. Bemerkenswert ist, daß nach Rehns sowohl Antigene, und zwar Abrin, Ricin, Schlangengift, Diphtherie- und Tetanustoxin, Lab, Pankreatin u. a., wie auch Antikörper selbst im trockenen Zustande von Formoldämpfen zerstört werden.

Das Prinzip der Trockenkonservierung war zunächst der Ausgangspunkt bei Ehrlichs Serumkonservierungsmethode, welche sich jedoch auch für die Konservierung von Giften eignet. Das Verfahren besteht nach Ehrlich und Otto in folgendem: Die zu konservierenden Präparate, seien es trockene oder flüssige Substanzen, werden in kleinen Dosen ohne jedweden Zusatz in einen Apparat gebracht, welcher aus zwei durch ein Verbindungsstück kommunizierenden kleinen Glasgefäßen besteht, von denen das eine, ein Röhrchen, zur Aufnahme des zu trocknenden Präparates dient, während das zweite, ein Kölbchen, mit dem stärksten wasserentziehenden Mittel, dem Phosphorsäureanhydrid beschickt wird. Die zu trocknenden flüssigen Präparate werden zunächst im Exsikkator über Nacht vorgetrocknet; sobald die Präparate in dem Glasröhrchen (Serumröhrchen) eingefüllt sind, werden die letzteren, sowie die mit Phosphorsäureanhydrid beschickten Kölbchen an das Verbindungsstück,

wie aus der beigegebenen Fig. 27 ersichtlich ist, angeschmolzen; die Verbindungsstücke einer Reihe solcher Apparate sind dann durch ein gemeinsames Rohr mit einer Quecksilber-Luftpumpe in Verbindung, mit deren Hilfe alle Apparate nunmehr vollständig evakuiert werden. Binnen wenigen Tagen ist die in den Präparaten enthaltene Wassermenge, welche noch in den Trockenseren bis zu 10% beträgt, durch das versinternde Phosphorsäureanhydrid entfernt, so daß sich das Serum wasserfrei in einem nahezu sauerstoffreien Vakuum befindet. Hierauf wird der Apparat an dem Verbindungsstück abgeschmolzen, so daß das Präparat noch weiter unter der Einwirkung des Posphorsäureanhydrids bleibt, und zwar so lange, als bis dieses sichtbar keine Feuchtigkeit annimmt, was daran erkannt wird, daß das vorsichtig aufgeschüttelte Anhydrid beim Klopfen unverändert bleibt. Dann erst wird das das Präparat enthaltende Röhrchen an seiner Verbindungsstelle mit dem Verbindungsrohr abgeschmolzen und kann nun an einem dunklen und kühlen Orte aufbewahrt werden.

Fig. 27. Apparat zu Ehrlichs Serumkonservierungsmethode.

Nach Otto ist es nicht vorteilhaft, die Absorption des Wassers bei erhöhter Temperatur zu beschleunigen, sondern es empfiehlt sich, die Operation bei Zimmertemperatur vorzunehmen. Doch ist zu beachten, daß durch die einzelnen Phasen der Evakuierung unter Umständen Verluste an spezifischer Wirksamkeit der betreffenden Präparate eintreten können. Die bei der Einstellung von Diphtheriestandardserum zu beobachtenden Kautelen werden an anderer Stelle dieses Handbuches besprochen.

Ein andersartiges Verfahren der Trockenkonservierung besteht darin, daß man zu den an sich weniger widerstandsfähigen Substanzen Stoffe zusetzt, welche die betreffenden Antigene respektive Immunkörper gegen äußere Einflüsse, insbesondere die Oxydation widerstandsfähig machen, indem sie dieselben vollständig einhüllen. Ein derartiges Verfahren hat R. Emmerich (Deutsches Reichspatent Nr. 147 165; kl 30 h vom 14. 3. 99) zur Konservierung von Bakterienantigenen, respektive aus diesen dargestellten bakteriziden Substanzen empfohlen. Die bakterientötenden Stoffe werden dabei aus ihren Lösungen durch Eingießen der letzteren in das 10fache Volumen Alkohol oder Alkohol und Äther ausgefällt, worauf der entstandene feinflockige Niederschlag abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und über Schwefelsäure im Vakuum bei 30—36° getrocknet wird. Um nun diese Körper zu konservieren wird in ihren Lösungen vor dem Fällen mit Alkohol oder Alkoholäther Dextrin gelöst. Hierdurch erhält man nach Emmerich bei der weiteren Behandlung (Fällen, Auswaschen, Trocknen) einen trockenen, allseitig in Dextrin eingehüllten bakteriziden Stoff, der hierdurch gegen Oxydation geschützt ist und seine Wirkung jahrelang beibehält.

Auch die Trocknung und Konservierung zerkleinerter Organe wird vielfach mit Zuhilfenahme von indifferenten Zusätzen, wie Kakaopulver, Milchzucker und Dextrin, vorgenommen, um sowohl die Trocknung, die bei Zimmer- oder Bruttemperatur stattfinden kann, zu beschleunigen, als auch um eine bessere Haltbarkeit der erhaltenen Organpulver zu ermöglichen. Haltbare und in ihren biochemischen Wirkungen scheinbar unveränderte Organpulver erhält man nach der bereits früher beschriebenen Methode von WIECHOWSKI unter Zuhilfenahme der Toluolextraktion aus dem Organbrei. Inwiefern diese Methoden auch zur Konservierung der labileren Antigene, wie Komplemente sich eignen, darüber fehlt vorläufig eine ausgedehntere Erfahrung; doch scheint es nach MORGENROTH, daß hier die Konservierung durch Anwendung des Kälteverfahrens das zweckmäßigere Verfahren darstellt. Nach VANSTEENBERGHE gelingt es indessen sogar das Wutgift, das durch langsame Trocknung des Markes über Kalium kaustikum abgeschwächt eventuell zerstört wird, durch Trocknen zu konservieren, wenn die Trocknung möglichst rasch durch Ausbreiten dünner Schichten des Markes im Schwefelsäure-Vakuum unter Lichtausschluß vorgenommen wird.

Wie oben bereits hervorgehoben wurde, eignet sich das Trockenkonservierungsverfahren nur für bestimmte Substanzen, zu denen vor allem die Antitoxine, dann die übrigen immunisatorisch erzeugten Antikörper und manche Toxalbumine und Amboceptoren gehören. Ganz anders verhalten sich jedoch manche labilere Körper, wie z. B. die Komplemente, welche bereits unter dem Einflusse der Trocknung sekundäre Veränderungen leicht erleiden; man verwendet deshalb am zweckmäßigsten zu Komplementversuchen frisches Material oder bedient sich bei deren Konservierung eines zweiten Konservierungsprinzips, nämlich des Einfrierens. Nach MORGENROTH halten sich die meisten Komplemente eine Anzahl von Tagen unverändert, wenn man das Serum auf Eis lagert, doch kann auch hier eine Inaktivierung derselben nicht immer ausgeschlossen bleiben. Am unzuverlässigsten ist in dieser Hinsicht das Pferdeserum, dessen kompletierende Eigenschaften oft innerhalb 24 Stunden ganz oder teilweise zerstört sein können, während das Meerschweinchenserum- und Ziegenserumkomplement haltbarer ist (MORGENROTH). Das beste und in allen Fällen zuverlässigste Verfahren, Komplemente für lange Zeit zu konservieren, ist nach MORGENROTH das Einfrieren des Serums bei 10—15°, wie es im Frankfurter Institut für experimentelle Therapie geübt wird. Man füllt das Serum in kleine Fläschchen, die in einem Kühlapparat oder in einer gut isolierten Kältemischung aus Eis und Kochsalz aufbewahrt werden und deren Inhalt je nach Bedarf aufgetaut wird. Für die Konservierung von Organen behufs Gewinnung guter antigenhaltiger Extrakte, wie sie bei dem Verfahren der Komplementablenkung benützt werden, durch Einfrierenlassen hat MORGENROTH neuerdings einen zweckmäßigen Kälteapparat „Frigo" konstruiert (s. MORGENROTH und STERTZ). Daß die Abkühlung, selbst wenn sie bis zur Temperatur der flüssigen Luft — 180° vorgenommen wird, weder die Vitalität der Mikroben, noch die Antigene und die Antikörper schädigt, haben bereits CHARRIN und D'ARRSONVAL, GENGOU, CHANAZ, COURMONT und M. DOYON, sowie MACFADYEN u. a. gezeigt.

Neben dem Schutze gegen die Einwirkung von Wasser, Sauerstoff der Luft, Licht und Wärme ist es häufig nötig, antigenhaltige Lösungen vor der Zersetzung durch Bakterien zu bewahren. Am einfachsten ist die Aufbewahrung steriler Lösungen, die keinerlei antiseptischen Zusatzes

bedürfen; es gelingt auch, keimhaltige Lösungen mitunter ohne Schaden längere Zeit aufzubewahren, wenn man dieselben entweder einfrieren läßt oder in Kühlräumen aufbewahrt, falls es nicht angeht, dieselben, sei es durch Aufkochen, sei es durch fraktionierte Sterilisation keimfrei zu machen. Nach Morgenroth kann man in Flüssigkeiten, welche hämolytische Amboceptoren enthalten, die Bakterienentwicklung meist schon durch das ein- bis zweimalige Erwärmen auf 57 ^{0} während $^1/_2$ Stunde verhüten. Über den Zusatz von Antisepticis wurde bereits früher gelegentlich der Darstellung der Antigene aus abgetöteten Bakterien gesprochen (s. pag. 357 und 358) und dort erwähnt, daß bei manchen antiseptischen Zusätzen, wie bei dem Phenol oder Trikresol, ein Unterschied zu bestehen scheint, je nachdem das betreffende Desinfiziens als Abtötungsmittel oder Konservierungsmittel angewandt wurde; so schwächt der Zusatz von 0,5 $^0/_0$ Karbolsäure, als Abtötungsmittel benützt, die immunisierende Wirkung der Pestkulturen, während der konservierende Zusatz in der gleichen Stärke zu bereits anderweitig abgetöteten Pestkulturen auf die antigenen Eigenschaften keinerlei schädigenden Einfluß ausübt. Trikresol scheint sich, wie aus den Versuchen von Gay über die Ruhrbazillen hervorgeht, umgekehrt zu verhalten. Neben Phenol, von dem gewöhnlich ein Gehalt von 0,5 $^0/_0$, und Trikresol, von dem ein Gehalt von 0,4 $^0/_0$ konservierend wirkt, werden eine ganze Reihe von Substanzen verwendet, welche die Entwicklung der Keime hemmen, ohne dieselben auch immer abzutöten. Zu den am meisten benützten konservierenden Zusätzen gehören Chloroform und Toluol, welche mitunter gemeinsam als Konservierungsmittel angewandt werden können, da Chloroform hinabsinkt und die tiefen Flüssigkeitsschichten sättigt, während Toluol an der Oberfläche geschichtet bleibt und von hier seine Wirkung ausübt. Von Chloroform genügt der Zusatz von etwa 1 Volumprozent der gesamten Flüssigkeitsmenge, von Toluol etwa soviel, daß die Flüssigkeitsoberfläche mit einer $1^1/_2$—2 ccm hohen Toluolschicht bedeckt ist. Es ist jedoch immer nötig, sich nicht allein mit dem Zusatz dieser Mittel zu begnügen, sondern durch kräftiges Schütteln der Flüssigkeit dafür zu sorgen, daß dieselbe tatsächlich auch mit Chloroform oder Toluol gesättigt ist, da ja sonst trotz der oberflächlichen Toluolschicht in der Tiefe der Flüssigkeit die bakterielle Zersetzung ungehindert fortschreitet, ebenso wie bei einfachem Chloroformzusatz die oberen Flüssigkeitspartien des konservierenden Schutzes entbehren. Zu bemerken bleibt, daß eiweißhaltige Lösungen, welche längere Zeit unter Chloroform oder Toluolwirkung gestanden haben, ein opaleszentes, ja sogar milchiges Aussehen annehmen, mitunter sogar, infolge der Einwirkung des in Wasser aufgenommenen Toluols oder Chloroforms auf die Eiweißkörper, Fällungen zeigen können (vergl. Salkowski); die opaleszenten Lösungen lassen sich indessen rasch klären, wenn durch Luftdurchleitung oder gelindes Erwärmen das gelöste Toluol vertrieben wurde. Hervorzuheben bleibt jedoch, daß sowohl Toluol wie auch Chloroform bei lange dauernder Einwirkung ähnlich, wie sie auf Eiweißkörper denaturierend wirken können, auch sehr labile Körper, wie zum Beispiel Fermente mitunter zu schädigen vermögen. Neben Chloroform und Toluol wird auch öfters Thymol, das in fester Form zur Anwendung kommt, sowie Fluornatrium in 1—3 $^0/_0$iger Lösung als Konservierungsmittel angewandt; M. Arthus und P. Vansteenberghe haben das letztere als Konservierungsmittel für Serumpräzipitine vorgeschlagen. Auch Äther wurde des öfteren als Konservierungsmittel sowie Abtötungsmittel der Mikroorganismen verwen-

det. ORI hat vor kurzem die konservierende Wirkung des Äthyläthers systematisch auf das bakterizide Vermögen des Schafserums bei einem Ätherzusatz von 3 % festgestellt; die eingesäten Bakterien, Bacterium coli, typhi, Pyocyaneus-, Rotz-, Diphtheriebazillen, Hühnercholera, Proteus vulgaris und Milzbrand waren schon nach 24 stündigem Aufenthalt im Brutschrank abgestorben; nur der Staphylokokkus war erst nach 30 bis 40 Tagen abgestorben; durch einstündiges Erhitzen auf 45° wurde Keimfreiheit erzielt, während durch ein Serum ohne Ätherzusatz die Staphylokokken nicht abgetötet wurden.

Eine vielfache Verwendung als Konservierungsmittel hat auch Formaldehyd oder Formol gefunden, wiewohl es viele Antigene durchaus ungünstig beeinflußt, zum Teil wohl daher, weil es leicht Methylenverbindungen mit den Eiweißkörpern eingeht (F. BLUM, L. SCHWARZ) und dieselben verändert. Bei der Milch seit vielen Jahren als wenig zweckmäßiges Konservierungsmittel — nach LÖWENSTEIN und BANDINI verändert Formalin noch in Verdünnungen von 1 : 10 000 die Milch derart, daß sie nicht mehr mit dem Labferment reagiert — benützt, wurde es nicht allein zur Darstellung mancher bakterieller Antigene, sondern als konservierender Zusatz bei Gewinnung gewisser Antigene mit Erfolg verwendet, während es für Immunsera, wie bereits erwähnt worden ist, sowie für andere Antigene (vergl. die Angaben von REHNS weiter oben), selbst wenn die Einwirkung in Form von Dämpfen auf trockene Präparate stattfindet, einen deletären Einfluß ausübt. Von Interesse ist es auch, daß nach LÖWENSTEIN das Formaldehyd in Lösung die Kochsalzlösung des Labs nicht unwirksam macht, während Formaldehyddämpfe das Labpulver seiner Wirkung berauben. Auch UHLENHUTH hat gefunden, daß Formalinzusatz die Wertigkeit präzipitierender Immunsera bedeutend herabsetzt. Nach LOELE eignet sich Formalinzusatz insbesondere bei der Herstellung keimfreier Blut- und Fleischauszüge, wie sie als Antigene bei der Darstellung präzipitierender Immunsera verwendet werden. Blut wurde dabei in der Weise aufbewahrt, daß es zur Hälfte mit einer Formalinkochsalzlösung versetzt wurde, welche aus 2 % Formalin SCHERING und 0,6 %iger Kochsalzlösung zusammengesetzt war. Zur Haltbarmachung von Blut und Fleischauszügen, die zur Anstellung der Präzipitation dienen, hat sich LOELE am geeignetsten eine Formalinkalkmagnesialösung folgender Zusammensetzung erwiesen: Aqua dest. 75,00, 1 %ige Lösung von Calciumchlorid 15,00, 1 %ige Magnesiumchloridlösung 10,00, Formalin SCHERING 1,0; dabei soll das verwendete destillierte Wasser durch Zusatz von Kalk und Magnesiumsalzen auf einen Gehalt von etwa 270 deutschen Härtegraden gebracht werden, da sonst die Blutauszüge nicht lange präzipitabel bleiben.

Ein Konservierungsmittel, das wohl infolge seiner oxydierenden Wirkung manche Antigene, wie z. B. das Tetanus und Diphtherietoxin (N. SIEBER), zerstört, sich jedoch insbesondere bei der Milchkonservierung mancher Wertschätzung erfreut, ist das Wasserstoffsuperoxyd, welches in 1 %iger bis 3 %iger Lösung (3,3 ccm des Merckschen Perhydrols, das ist 30 %iges Wasserstoffsuperoxyd auf 1 Liter Milch) die Milch gut zu konservieren vermag (Perhydrasemilch von H. MUCH und P. H. RÖMER). Nach LÖWENSTEIN wird das Tetanusantitoxin von Wasserstoffsuperoxyd nicht angegriffen. EMMERICH empfiehlt zur Haltbarmachung des Fleisches, von der Erfahrung ausgehend, daß die Infektion im Wesentlichen von den größeren Blutgefäßen aus erfolgt, die Anfangsteile der größeren Blutgefäße (Arterien und Venen) der Schlachttiere vor ihrer Zerteilung

mit einer entwicklungshemmenden Flüssigkeit (Essigsäure u. dergl.) auszuspülen (Deutsches Reichspatent, Kl. 53c, No. 146968 vom 1. Aug. 1902).

Des öfteren genügt es, das Konservierungsmittel in Gas- oder Dampfform einwirken zu lassen, eine Methode, welche ja, wie vielfache Erfahrungen zeigen, zur Abtötung von Kulturen völlig ausreicht und den überschüssigen Zusatz des bei manchen biochemischen Prozeduren störenden Konservierungsmittels umgeht. Man kann dann, wenn es sich um Eprouvettenversuche handelt, welche durch kürzere Zeit keimfrei gehalten werden sollen, die mit Watte leicht verschlossenen Reagenzgläser in eine Art feuchte Kammer stellen, welche aus einem größeren oder kleineren Präparatenglase besteht, an dessen Boden sich eine mit Toluol, Chloroform oder mit Formalin getränkte Watte befindet, ein Verfahren, das sich mir bei nicht sterilem Versuchsmateriale sehr gut bewährt hat; man kann natürlich auch in ähnlicher Weise die Wattestopfen mit dem betreffenden Desinfiziens anfeuchten. Für größere Flüssigkeitsmengen ist nicht selten von Vorteil die durch die Fig. 28 veranschaulichte Versuchsanordnung, welche darin besteht, daß das mit einfach durchbohrtem Korkstopfen versehene, die zu konservierende Flüssigkeit enthaltende Gefäß mittels eines doppelt umgebogenen Glasrohrs mit einer kleinen Eprouvette, welche das flüchtige Konservierungsmittel enthält, in Verbindung steht, so daß die Flüssigkeit stets unter der Wirkung der Dämpfe des Konservierungsmittels (Chloroform, Toluol, weniger geeignet ist Formol) steht. Dieses Konservierungsverfahren wird auf Anregung von E. Freund seit Jahren im pathologisch-chemischen Laboratorium der Rudolfstiftung in Wien mit Erfolg verwendet.

Fig. 28. Konservierung durch Einwirkung der Dämpfe flüchtiger Konservierungsmittel.

Literatur.

Zusammenhängende Darstellungen über einzelne Kapitel finden sich in nachfolgenden Monographien:

Calmette, A., Vergiftungen durch tierische Gifte. Menses Handbuch der Tropenkrankheiten, Bd. I. Leipzig 1905.

Faust, E. G., Die tierischen Gifte. Braunschweig, F. Vieweg, 1906.

Jacoby, M., Immunität und Disposition und ihre experimentellen Grundlagen. Wiesbaden, Bergmann, 1906.

Kobert, R., Lehrbuch der Intoxikationen, Bd I, Allgem. Teil 1902, und Bd. II, Spez. Teil, 1907. Stuttgart, Enke.

Oppenheimer, C., Toxine und Antitoxine. Jena, G. Fischer, 1904.

Sachs, H., Tierische Toxine als hämolytische Gifte. Biochem. Centralbl. 1906, Bd. V.

Originalarbeiten:

Aaser, P., Über die makroskopische Agglutinationsprobe bei Typhoidfieber. Berl. klin. Wochenschr., Nr. 42, pag. 256.

Abbot, C. u. Gilderslewe, N., Untersuchungen der proteolytischen Enzyme und der sog. Hämolysine einiger gewöhnlicher saprophyter Bakterien. Journ. med. research, Nr. 10, pag. 42—62.

ABDERHALDEN, E. u. LE COUNT, E. R., Die Beziehungen zwischen Cholesterin, Lecithin und Kobragift, Tetanustoxin, Saponin und Solanin. Zeitschr. f. exper. Path. u. Ther. 1905, Bd. II, H. 2.

ABDERHALDEN, E. u. KOELKER, A. H., Die Verwendung optisch-aktiver Polypeptide zur Prüfung der Wirksamkeit proteolytischer Fermente. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. LI, pag. 294.

ABEL, J. J. u. FORD, W. W., On the poisons of amanita phalloides. The Journal biological chemistry 1907, Vol. II, Nr. 4, pag. 273.

ACHALME, P., Recherches sur les propriétés pathogénes de la trypsine et le pouvoir antitryptique du serum des cobayes neufs et immunises. Ann. de l'Institut Pasteur 1901, Tome XV, pag. 737.

ARLOING, CORNEVIN, THOMAS, Le charb. sympt. du boef. 2. éd., Paris, Asselin und Honqeau, 1887. Zit. nach KITT in Kolle-Wassermann, Bd. IV, pag. 1018.

ARMAND-DELILLE, P. F., Über die Wirkungsweise der lokalen Gifte des Tuberkelbazillus auf die Meningen. Compt. rend. Soc. biol., Tome LIII, pag. 885, 1127 und Tome LIV, pag. 1013 nach MALY, Bd. XXXIII, pag. 1100.

ARONSON, H., Experimentelle Untersuchungen über Diphtherie usw. Berliner klin. Wochenschr. 1893, Nr. 25.

Ders., Weitere Untersuchungen über Diphtherie und das Diphtherieantitoxin. Berl. klin. Wochenschr. 1894, Nr. 15, 18 u. 19.

Ders., Zur Biologie des Tuberkelbazillus. Berl. klin. Wochenschr. 1898, pag. 484.

Ders., Archiv f. Kinderheilk., Nr. 30; Verhandl. d. Ver. f. innere Medizin 1902, Sitz. v. 2. Juni (nach NEUBERG, Ergebn. Asher-Spiro 1904, Bd. III, pag. 404).

ARRHENIUS, SV., Immunochemie. Anwendungen der physikalischen Chemie auf die Lehre von den physiologischen Antikörpern. Leipzig, Akadem. Verlagsges. 1907.

ARTHUS, MAURICE u. VANSTEENBERGHE, P., Ein neues Verfahren zur Gewinnung und Konservierung eines Serums, welches menschliches Serum präzipitiert. Compt. rend. Soc. biol., Tome LIV, p. 251.

ASKOLI, G., Über hämolytisches Blutplasma. Dtsch. med. Wochenschr. 1902, pag. 736.

ASKOLI, M., Zur Kenntnis der Präzipitinwirkung und der Eiweißkörper des Blutserums. Münchener med. Wochenschr. 1902, pag. 1409.

ASKOLI, M. u. BONFANTI, A., Über spezifische Beeinflussung der diastatischen Fermente im Blutserum bei Zufuhr verschiedener Kohlenhydrate. Münch. med. Wochenschr. 1904, pag. 1466.

Dies., Über Blutserumdiastasen und Antidiastasen. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XLIII, pag. 156.

AUCLAIR, JULES, Untersuchungen über die Mikrobengifte; die Mikrobengifte mit vorherrschender lokaler Wirkung. Arch. de medec. exper. et d'anat. pathol. (1), Tome XV, pag. 725.

BABES, A., Notiz über eine aus Rotzkulturen isolierte Substanz. Arch. de med. exper. et d'anat. pathol., Tome IV, pag. 430.

BACH, A., Peroxydasen als spezifisch wirkende Enzyme. Berichte d. Dtsch. chem. Gesellsch. 1906, Bd. XXXIX, pag. 2126.

BAIL, O., Über das Freiwerden der bakteriziden Leukocytenstoffe. Berliner klin. Wochenschr. 1897, pag. 887 u. 1898.

Ders., Über leukocide Substanzen in den Stoffwechselprodukten des Staphylococcus pyogenes aureus. Arch. f. Hyg., Bd. XXX, pag. 348 u. Bd. XXXII.

Ders., Untersuchungen über die Beeinflussung der Serumalexine durch Bakterien. Arch. für Hygiene, Bd. XXXV, pag. 284.

Ders., Untersuchungen über Typhus und Choleraimmunität. Archiv für Hygiene, Bd. LII, pag. 272.

Ders., Untersuchung über die Aggressivität des Choleravibrio. Arch. für Hygiene, Bd. LIII, pag. 302; ferner Münchner med. Wochenschr. 1905, Nr. 39 und 40, sowie die weiteren Arbeiten über Aggressinimmunität in der Wiener klin. Wochenschr. 1905 und 1906; weitere Literatur über Aggressine siehe bei C. LEVADITI, pag. 242 in diesem Handbuche.

BALDWIN u. LEVENE, Einwirkung proteolytischer Fermente auf Bakterientoxine. Journ. of med. research, Vol. VI, pag. 120, nach MALY, 1901.

BANDI u. GAGNONI, Die Vaccination gegen Diphtherie. Vorläufige Mitteilung. Übersetzt von TAUTZ, Berlin. Centralbl. f. Bakt. 1906, Bd. XLI, H. 3 u. 4.

BANDINI, P., Die Wirksamkeit des Formalins und Wasserstoffsuperoxyds in der Milch. Centralbl. f. Bakt. I, Bd. XLI, pag. 271 u. ff.

BANG u. FORSSMANN, Untersuchung über die Hämolysinbildung. Vorläufige Mitteilung. Centralbl. f. Bakt. u. Par. I, Bd. XL, pag. 151.

Dies., Untersuchungen über Lysinbildung. Hofm. Beitr. 1906, Bd. VIII, pag. 238.

Barratt, J. O. W., Der Einfluß der Konzentration auf die Chemotaxis. Zeitschr. für allg. Physiol., Bd. V, pag. 16.
Bashford, E. F., Über Blutimmunität. Arch. int. d. pharm. et d. ther., Vol. VIII, pag. 101 u. Vol. IX, pag. 451.
Bassenge, R. u. Mayer, M., Zur Toxingewinnung aus gefrorenen Typhusbazillen. Centralbl. f. Bakt., Bd. XXXVI, pag. 332.
Dies., Zur Schutzimpfung gegen Typhus. Dtsch. med. Wochenschr., Nr. 31, pag. 697.
Baumann, E. u. Wolkow, M., Zeitschr. f. physiol. Chemie 1891, Bd. XV, pag. 228.
Bechhold, H. u. Ziegler, J., Niederschlagsmembranen in Gallerten und die Konstitution der Gelatinegallerte. Ann. der Physik, Bd. XX, pag. 900.
Dies., Die Beeinflußbarkeit der Diffussion in Gallerten. Ibid.
Behring u. Wernicke, Über Immunisierung und Heilung von Versuchstieren bei der Diphtherie. Zeitschr. f. Hyg., Bd. XII, pag. 10.
Behring, Über Immunisierung und Heilung von Versuchstieren beim Tetanus. Zeitschrift f. Hyg., Bd. XII, pag. 45.
Ders., Mitteilungen aus dem Institut für experimentelle Therapie von Prof. E. Behring in Marburg. Dtsch. med. Wochenschr. 1898, pag. 293.
Behring, E., Über die spezifisch giftigen Eigenschaften der Tuberkulinsäure. Berl. klin. Wochenschr. 1899, Nr. 25, pag. 537.
v. Behring, Allgemeine Therapie der Infektionskrankheiten, pag. 1070 u. ff.
Beitzke u. Neuberg, Zur Kenntnis der Antifermente. Virchows Archiv 1906, Bd. CLXXXIII, pag. 169.
Belfanti, S., Sur le gami dell' emolisina. Primo Congresso dei Pathologi Italiani, Torino, 2—4 ottobre 1902. Bioch. Centralbl. 1903, Bd. I, pag. 279.
Belfanti, Über die Natur des Diphtheriegiftes. Giornale delle R. accademia di medicina di Torino, Vol. LXVII, pag. 333—34 (nach Maly, 1904, pag. 1031).
Bendix, E., Zur Chemie der Bakterien. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 2, pag. 18.
Bergell u. Lewin, Über den Abbau der Eiweißkörper im Organismus. Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. 1906, Bd. III, pag. 425.
Bergell, P. und Meyer, Fr., Über eine neue Methode zur Herstellung von Bakteriensubstanzen, welche zu Immunisierungszwecken geeignet sind. Medizin. Klinik 1906, Nr. 16, pag. 412.
Bergell, Peter u. Schütze, Alb., Zur Frage der Antipankreatinbildung. Zeitschrift f. Hyg., Bd. L, pag. 305.
Bergmann u. Schmiedeberg, Centralbl. f. d. medizin. Wiss., Jahrg. 1868, pag. 497.
Bergmann, G. v., Die Todesursache bei akuten Pankreaserkrankungen. Zeitschrift für exper. Pathol. u. Therapie, Bd. III, pag. 401.
Bernard, León u. Salomon, M., Über die durch das Chloroformextrakt des Tuberkelbazillus hervorgerufenen Läsionen der Niere. Compt. rend. Soc. biol., Tome LV, pag. 1233.
Bertarelli, E., Über aktive Immunisierung des Menschen gegen Cholera. Dtsch. med. Wochenschr. 1904, pag. 1194.
Ders., Über die aktive Immunisierung des Menschen gegen Cholera vermittelst autolytischer Produkte des choleragenen Vibrio und über das Wesen dieser autolytischen Produkte. Centralbl. f. Bakt. I, Orig., Bd. XXXVIII, H. 5, pag. 584.
Ders., Über die Antilipase. Centralbl. f. Bakt. u. Par. 1906, Bd. XL, pag. 231.
Besredka, Über die aktive Immunisierung gegen Pest, Cholera und Typhus. Ann. Inst. Pasteur 1902, pag. 918.
Ders., Über den Typhusbazillus und Pestbazillus. Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome XIX, pag. 477.
Ders., De l'anti-endotoxine typhique et des anti-endotoxines, en général. Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome XX, pag. 149.
Ders., Des endotoxines solubles typhique, pesteuse de dysenterique. Ann. Inst. Pasteur, Tome XX, Nr. 4, pag. 304.
Beumer, O. u. Peiper, E., Über die immunisierende und heilende Wirkung antitoxischen Hammelserums gegen das Typhusgift. Zeitschr. für klin. Mediz., Bd. XXVIII, pag. 328.
Beyerinck, M. W., Die Laktase, ein neues Enzym. Centralbl. für Bakt. 1889, Bd. VI, pag. 44.
Biernacki, Das Verhalten der Verdauungsenzyeme bei Temperaturerhöhungen. Zeitschr. für Biol., Bd. XXVIII, pag. 49.
Bierry, H., Untersuchungen über Nephrotoxine. Compt. rend. Soc. biol., Tome LV, pag. 476.
Bierry, H. u. Mayer, André, Über die Wirkung des durch intraperitoneale Injektion der Lebernukleoproteide hepatotoxisch gemachten Blutes. Compt. rend. Soc. biol., Tome LVI, pag. 1016.

Bierry, H. u. Pettit, Auguste, Über das cytotoxische Vermögen gewisser Sera nach Injektion von Nukleoproteid. Compt. rend. Soc. biol., Tome LVI, pag. 238.

Billard, G. u. Mallet, Versuch einer Serumtherapie gegen die rhinospasmotische Bronchitis. Compt. rend. Soc. biol., Tome LIX, pag. 248.

Bisanti, Ch., Compt. rend. Soc. biol., Tome LVII, pag. 393; nach Maly, Bd. XXXIV, pag. 1051.

Bischoff, H., Das Typhusimmunisierungsverfahren nach Brieger. Zeitschr. für Hyg. und Infekt. 1906, Bd. LIV, H. 2.

Bitter, H., Über Festigung von Versuchstieren gegen die Toxine der Typhusbazillen. Zeitschr. für Hyg., Bd. XII, pag. 298.

Blachstein, Über das Verhalten des Chrysoidins gegen Choleravibrionen. Münchener med. Wochenschr. 1896, Nr. 44 u. 45.

Blanchard, R., Substances toxiques produites par les parasites animaux. Arch. de Parasitol. 1905/06, Vol. X, pag. 84.

Blell, Eduard, Experimentelles über Immunisierung mit Choleranukleoproteid. Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt., Bd. LV, pag. 187.

Blum, F., Über eine neue Klasse von Verbindungen der Eiweißkörper. Zeitschr. für physiol. Chemie 1896, Bd. XXII, pag. 127.

Blum, L., Über Antitoxinbildung bei Autolyse. Hofmeisters Beiträge, Bd. V, pag. 142.

Boidin, L., Experimentelle Untersuchungen über die Gifte des Milzbrandbazillus. Arch. de médec. expér. et d'anat. path., Tome XVII, pag. 695.

Bokorny, Th., Vergleichende Studien über die Giftwirkung verschiedener chemischer Substanzen bei Algen und Infusorien. Pflügers Archiv, Bd. LXIV, pag. 305.

Bolton, Ch., A further communication on the specificity and action in vitro of gastrotoxin. Prec. Roy. 1906, Serie B, Vol. LXXVII, pag. 426.

Bonome u. Vivaldi, Über die spezifische Wirkung einiger Substanzen etc. Deutsche med. Wochenschr. 1892.

Bordet, J., Les leukocytes et les proprietés actives du serum chez les vaccinés. Ann. de l'Inst. Pasteur 1895, Tome IX, pag. 463.

Ders., Le mécanisme de l'agglutination. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII, pag. 225.

Ders., Les serums hemolytiques, leurs antitoxines et les theories des sérums cytolytiques. Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, Tome XIV, pag. 257.

Bordet et Gengou, Recherches sur la coagulation du sang et les serums anticoagulants. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV, pag. 129.

Dies., Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans les serums etc. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV, pag. 289.

Borissow, Über die chemotaktischen Wirkungen verschiedener Substanzen auf amöboide Zellen und ihren Einfluß auf die Zusammensetzung des entzündlichen Exsudats. Zieglers Beiträge, Bd. XVI.

Borrel, A., Experimentalstudie über die Schafpocken. Ann. de l'Inst. Pasteur, Bd. XVII, pag. 123.

Bosc et Delezenne, Compt. rend. de l'Acad. des sciences, 14. Sept. 1896.

Bourquelot et Bertrand, G., Die Bläuung und die Schwärzung der Pilze. Compt. rend. de la Soc. de biol. 1895, pag. 582.

Brieger, L., Über Ptomaine. August Hirschwald, Berlin 1885. Ferner Ber. d. D. chem. Ges., Nr. 17, pag. 515, 1137 u. 2741.

Ders., Weitere Untersuchungen über Ptomaine, pag. 83. Aug. Hirschwald, Berlin 1885.

Ders., Untersuchungen über Ptomaine, III. Teil, pag. 119. Aug. Hirschwald, Berlin 1886.

Ders., Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Mytilotoxins nebst einer Übersicht der bisher in ihren Haupteigenschaften bekannten Ptomaine und Toxine. Virchows Archiv, Bd. CXV, pag. 483.

Ders., Zur Kenntnis der Bildung von Ptomainen und Toxinen durch pathogene Bakterien. Sitzungsber. d. Königl. Preuß. Akad. zu Berlin 1899, pag. 1; Chem. Centralbl. 1889, Bd. I, pag. 523.

Ders., Über die Darstellung einer spezifisch wirkenden Substanz aus Typhusbakterien. Deutsche med. Wochenschr., Nr. 28, pag. 477.

Ders., Weitere Erfahrungen über Bakteriengifte. Zeitschr. für Hyg. 1895, Bd. XIX, pag. 101.

Ders., Versuche zur Reinigung des Ricins und des Diphtherieantitoxins. Festschr. für R. Koch, 1903, pag. 445.

Ders., Über Schutzimpfung gegen Typhus und Cholera. Verhandl. des Deutschen Kolonialkongresses 1905, pag. 182.

Brieger u. Boer, Über Antitoxine und Toxine. Zeitschr. für Hyg. 1896, Bd. XXI, pag. 259.
Dies., Über die Toxine der Diphtherie und des Tetanus. Deutsche med. Wochenschr. 1896, Nr. 49, pag. 783.
Brieger, L. u. Cohn, G., Untersuchungen über das Tetanusgift. Zeitschr. für Hyg. 1893, Bd. XV, pag. 1.
Brieger, L. u. Fränkel, C., Untersuchungen über Bakteriengifte. Berliner klin. Wochenschr. 1890, Nr. 11 u. 12.
Brieger, L. u. Mayer, M., Weitere Versuche zur Darstellung spezifischer Substanz aus Bakterien. Deutsche med. Wochenschr. 1903, pag. 304, I.
Dies., Zur Gewinnung spezifischer Substanzen aus Typhusbazillen. Deutsche med. Wochenschr. 1904, pag. 980.
Brieger, L., Kitasato, S. u. Wassermann, A., Über Immunität und Giftfestigung. Zeitschr. für Hyg., Bd. XII, pag. 137.
Brieger u. Krause, Kann man durch Einspritzung von Chemikalien, wie übermangansaures Kali und Chlorkalk, den menschlichen und tierischen Organismus gegen die Wirkung des Schlangengiftes schützen? Archiv f. Schiffs- u. Tropenhyg., Bd. XI, H. 6.
Brieger, L. u. Wassermann, A., Über künstliche Schutzimpfung von Tieren gegen Cholera asiatica. Deutsche med. Wochenschr. 1892, Nr. 31.
Dies., Beobachtungen über das Auftreten von Toxalbuminen beim Menschen. Charité-Annalen. Chem. Centralbl. 1892, Bd. II, pag. 927.
Briot, Thèse de Paris 1900.
Bruylants et Vanneman, Le Jequirity et son principe phlogogéne. Bull. de l'Acad. Roy. de Med. de Belg. 1884, pag. 147.
Brandl, J., Über Sapotoxine und Sapogenin von Agrostemma Githago. Archiv für exp. Path. u. Pharm., Bd. LIV, pag. 245.
Brezina, E., Über die Spezifizität des Kotes und die Unterscheidung verschiedener Kotarten auf biologischem Wege. Wiener klin. Wochenschr. 1907, pag. 560.
Buchner, H., Die Bakterienproteine und deren Beziehung zur Entzündung und Eiterung. Centralbl. für Chir. 1890.
Ders., Die chemische Reizbarkeit der Leukocyten und deren Beziehung zur Entzündung und Eiterung. Berliner klin. Wochenschr. 1890, Nr. 47.
Ders., Pyogene Stoffe in der Bakterienzelle. Berliner klin. Wochenschr. 1890, Nr. 30.
Ders., Die Entwicklung der Bakterienforschung seit Nägelis Eingreifen in dieselbe. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 25.
Ders., Tuberkulinreaktion durch Proteine nicht spezifischer Bakterien. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 49.
Ders., Über den Einfluß der Neutralsalze auf Serumalexine, Enzyme, Toxalbumine, Blutkörperchen und Milzbrandsporen. Archiv f. Hygiene 1893, Bd. XVII, pag. 138.
Ders., Bakteriengifte und Gegengifte. Münchener med. Wochenschr. 1893, pag. 449.
Ders., I. Neuere Fortschritte in der Immunitätsfrage. II. Über Immunität und Immunisierung. Münchener med. Wochenschr. 1894, Nr. 24, 25, 37, 38.
Ders., Zu Robert Kochs Mitteilungen über neue Tuberkulinpräparate. Berliner klin. Wochenschr. 1897, pag. 322.
Ders., Gewinnung von plasmatischen Zellsäften niederer Pilze. Münchener med. Wochenschr. 1897, pag. 1343.
Buchner, H. u. Gruber, M., Chem. Centralbl., Bd. II, pag. 829. (D. R. P. Kl. 53 i. Nr. 137, pag. 643.)
Buchner, H. u. Orthenberger, M., Versuche über die Natur der bakterientötenden Substanz im Serum. Archiv f. Hyg. 1890, Bd. X, pag. 149.
Buchner, Voit, Fr., Littmann u. Orthenberger, Untersuchungen über die bakterienfeindlichen Wirkungen des Blutes und Blutserums. Archiv f. Hygiene, Bd. X, pag. 84.
Buchner, E., Untersuchungen über den Inhalt der Hefezellen und die biologische Seite des Gärungsproblems. Zymasegärung: Von E. Buchner, Hans Buchner und Martin Hahn. R. Oldenburg, München u. Berlin 1903, pag. 67.
Bujwid, O., Über eine Methode der Konzentrierung der Diphtherie und anderer therapeutischer Sera mittelst Ausfrierung. Centralbl. für Bakt. 1897, Bd. XXII, pag. 287.
Bullock, W., The influence of salts on the action of Immune Hämolysins. Transactions of the Pathologic. Society of London, Vol. LIV, pag. 258.
Bunzl-Federn, E., Über Immunisierung und Heilung bei der Pneumokokkeninfektion. Archiv f. Hyg., Bd. XX, pag. 152.

Burian, Ergebnisse Asher-Spiro 1904,, Bd. III, pag. 55.

Buxton, B. H. u. Schaffer, P.; Buxton, B. H. u. Teagne, O., Die Agglutination und verwandte Reaktionen in physikalischer Hinsicht, I, II u. III. Zeitschr. für physikal. Chemie, Bd. LVII, pag. 47 u. ff.

Calcar, v., R. P., Über Dialyse und einzelne ihrer Anwendungen. Berl. klin. Wochenschrift, Bd. XLII, pag. 1368.

Ders., Über die Konstitution des Diphtheriegiftes. Eine neue Methode zum Nachweis der Toxine. Berl. klin. Wochenschr. 1904, pag. 1028.

Calmette, A., Vergiftungen durch tierische Gifte. Handbuch der Tropenkrankheiten, herausgegeben von C. Mense, Bd. I, pag. 291.

Ders., Etude experimentale du venin de Naja tripudians ou Cobra capel et exposé d'une méthode de neutralisation de ce venin dans l'organisme. Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, Tome VI, pag. 160.

Calmette, A., Über die Eigenschaften des Blutserums gegenüber dem Schlangengifte immunisierter Tiere und über die Behandlung der Schlangengiftvergiftung. Wiener med. Blätter 1894, Nr. 17, p. 213.

Ders., Beitrag zur Kenntnis des Schlangengiftes. Ann. de l'Inst. Pasteur 1894, Tome VIII, pag. 275.

Ders., Contribution à l'étude des venins, des toxines et des serums antitoxiques. Ann. de l'Inst. Pasteur 1895, Tome IX, pag. 225.

Ders., Sur le venin des serpents et sur l'emploi du serum antivenimeux etc. Ann. de l'Inst. Pasteur 1897, Tome XI, pag. 214.

Ders., Über den Mechanismus der Immunisation gegen Schlangengifte. Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome XII, pag. 343.

Calmette, E. et Delearde, A., Sur les toxines non microbiennes et la mecanisme de l'immunite par les serums antitoxique. Ann. de l'Inst. Past. 1896, Tome X, pag. 675.

Calmida, Dante, Weitere Untersuchungen über das Gift der Tänien. Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXX, p. 374.

Camus, Compt. rend. de la Soc. de Biol., Tome XLVIII, Nr. 50.

Ders., Compt. rend. de l'Academie des Sciences 1901.

Cano-Brusso, Über den Untergang des Tetanusgiftes im Darm. Societa fisic. med. universitar. di Sassari, Jan. 1901; nach Maly; 1901, pag. 914.

Carbone, T., Über die von Proteus vulgaris erzeugten Gifte. Centralbl. für Bakt. 1890.

Carega, Alex., Über aktive Substanzen des Bact. coli. Centralbl. für Bakt., Bd. I, pag. 34, 323.

Carnevale, A., Über die lokale und allgemeine Wirkung der Extrakte der Bakterienkörper. Annali d'Igiene sperimentale 1902, nach Maly 1902, Bd. XXXII, pag. 893.

Carrière, Toxines et Digestion. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII, pag. 435.

Ders., Du sort la toxine tétaniques introduit dans le tube digestif. Soc. Biol. 1899, Tome LI, pag. 179.

Celli, A. u. Blasi de D., Ist das Wutgift filtrierbar? Deutsche med. Wochenschr. 1903, pag. 945—946.

Centanni, Hämolysimeter. Reso conti dell' Acad. med. chir. di Ferrara Nov. 190, nach Maly, Bd. XXXII, pag. 926.

Chanaz, Courmont, P. u. Doyon, M., Wirkungen der Abkühlung durch flüssige Luft auf agglutinierendes Serum und agglutinierbare Kulturen. Compt. rend. de la Soc. de Biol., Tome LII, p. 764.

Chantemesse, Lösliches Ty-Toxin und antitoxisches Serum des typhösen Fiebers. Wiener med. Blätter 1898, Nr. 18, 19.

Charrin, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1890.

Ders., Actions des sucs digestifs sur les poisons microbiens. Arch. de phys. 1898, Tome LXVII.

Ders. u. Lefévre, Action de la pepsine sur la toxine diphth. Soc. Biol. 1897, Tome XLIX, pag. 830, Sem. med. 1897, pag. 296.

Ders. u. Levaditi, Action du pancreas sur la toxine diphth. Soc. Biol. (1899), Tome LI, pag. 215.

Chassin u. Moussu, Einfluß der Dialysen oder intraorganischen Filtrationen auf die toxischen Substanzen. Compt. rend. Soc. Biol., Tome LII, pag. 694.

Chauveau, Über den Mechanismus der Immunität. Compt. rend. Soc. Biol., Tome CVI, pag. 392.

Christmas, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome V, pag. 501.

Citron, J., Über natürliche und künstliche Aggressine. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. LXI, pag. 230.

Ders., Die Immunisierung gegen die Bakterien der Hogcholera (Schweinepest) mit Hilfe von Bakterienextrakten. Ein Beitrag zur Aggressinfrage. Zeitschr. für Hyg. 1906, Bd. LIII, pag. 515.

Citron, J., Über Komplementbindungsversuche bei infektiösen und postinfektiösen Erkrankungen (Tabes dors.), sowie bei Nährstoffen. Vortrag im Verein für innere Medizin in Berlin vom 3. Juni 1907. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 29.
Coco, Meta, Beitrag zur Kenntnis der Hyperleukocytose und der Leukocytose bei experimenteller Diplokokkeninfektion. Rif. medica 1898, Nr. 14, 27, 37, 52, 65, nach Maly Bd. XXIX, pag. 938.
Connstein, Hoyer u. Wartenberg, Über fermentive Fettspaltung. Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft 1902, pag. 3988.
Connstein u. Hoyer, Seifensiederzeitung 1905, pag. 509 ff.
Conradi, H., Zur Frage der Toxinbildung bei den Milzbrandbakterien. Zeitschr. für Hyg. 1899, Bd. XXXVII, pag. 287.
Ders., Über lösliche, durch aseptische Autolyse erhaltene Giftstoffe von Ruhr und Typhusbazillen. Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 26.
Ders., Über die Bildung bakterizider Stoffe bei der Autolyse. Hofmeisters Beiträge, Bd. I, pag. 193.
Costamagna, S., Über eine neue von Loeffler vorgeschlagene Methode zur Produktion von Antikörpern. Giornale della R. accademia die medicina die Torino, Vol. LXVIII, pag. 499.
Craw, J. A., Über die physikalische Chemie der Toxin-Antitoxinreaktion mit besonderer Berücksichtigung der Neutralisation von Lysin und Antilysin. Proceed. Roy. Soc. 1905, Tome LXXVI, pag. 179. Zeitschr. für physikal. Chemie, Bd. LII, pag. 569.
Crendiroupoulo u. Ruffer, A., Mitteilungen über die Dialyse der von B. pyocyaneus durch Kollod.-Säckchen gebildeten löslichen Produkte. Compt. rend. de Soc. Biol., Tome LII, pag. 1109.
Ders. u. Miss Sheldon Arnos, On aggutination of vibrions. Journ of path. and bact. 1904, pag. 260.
Cushny, A. R., Über das Ricingift. Archiv für experim. Path. und Pharm. 1898, Bd. XLI, pag. 439.
Czapek, F., Stoffwechselprozesse in der geotropisch gereizten Wurzelspitze und in phototropisch sensiblen Organen. (Vorläufige Mitteilung.) Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft 1902, pag. 464.
Danysz, J., Contribution à l'étude des propriétés et de la nature des melanges des toxines avec leurs antitoxines. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Tome XVI, pag. 329.
Dautwitz, Fr. u. Landsteiner, K., Über Beziehungen der Lipoide zur Serumhämolyse. Hofmeisters Beiträge 1907, Bd. IX, pag. 431.
Dauwe, Ferd., Über die Absorption der Fermente durch Kolloide. Hofmeisters Beiträge, Bd. VI, p. 426.
Dean, Experimentelle Immunität gegen Pankreas und seine Fermente. Transaction pathol. Society, Tome LII, p. 127, zitiert nach Maly, 1902.
Dechandt, C., Über die Darstellung und Bestandteile des Tuberkulins. Inaug.-Diss., Leipzig 1901.
Defalle, W., Recherches sur le role de l'enveloppe des microbes dans l'agglutination. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Tome XVI, pag. 595.
Dehne, R. u. Hamburger, F., Experimentaluntersuchungen über die Folgen parenteraler Einverleibung von Pferdeserum. Wiener klin. Wochenschr. 1904, pag. 807.
Delezenne, C., Recherches sur le mecanisme de l'action anticoagulante des injections intravasculaires de peptone, de serum d'anguille et d'extraits d'organes, Travaux de physiologie de l'Université de Montpellier, pag. 213. Octave Doin. Paris 1898.
Ders., Sur le mecanisme d'action des agents anticoagulants du groupe de la peptone. Ibid., pag. 284.
Ders., Untersuchungen über die Gerinnung des Blutes von Vögeln. Arch. de phys. 1891 et 1897, pag. 333.
Ders., Sur l'action kinasique des venins. Compt. rend. Acad. des Sciens. 11. August 1902.
Denys et Leclef, La Cellule (1894), Tome X, I.
Denys, J. et van de Velde, H., Sur la production d'une antileukocydine chez les lapins vaccinés contre le staphylococque pyogene. La Cellule, Tome XI; 2e fascicule.
Deycke Pascha u. Reschad Bey, Ein bakterielles Fett als immunisierende Substanz bei der Lepra, seine theoretische Bedeutung und seine praktische Verwendung. Deutsche med. Wochenschr., 1907, Nr. 3.
Dietrich, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., 1902, Bd. XXXII, pag. 165.
Dietrich, A., Beruht die bakterienvernichtende Wirkung bakterieller Stoffwechselprodukte nach den von Emmerich und Löw dafür angeführten Beweisen auf proteol. Enzymen (Nuklas.)? Arbeiten aus d. pathol. Inst. in Tübingen 1901, Bd. III, H. 2.

DITTRICH, P., Über methäglobinbildende Gifte. Arch. f. exp. Path. u. Pherm. 1891, Bd. XXIX, pag. 247.
DIXSON, zit. nach CUSHNY.
DOERR, R., Über Aggressine. Wiener klin. Wochenschr. 1896, Nr. 25, pag. 759.
Ders., Über ungiftige dissoziierbare Verbindungen der Toxine. Wiener klin. Wochenschr. 1907, pag. 5.
DUNBAR, Zur Frage betreffend die Aetiologie und spezifische Therapie des Heufiebers. Berliner klin. Wochenschr. 1903, pag. 537, 567, 596.
Ders., Zur Ursache und spezifischen Heilung des Heufiebers. R. Oldenburg, München und Berlin 1903.
DUNGERN, Freih. v., Eine neue diagnostische Serumreaktion. Centralbl. f. Bakt., Bd. XXIV, H. 1, pag. 710.
Ders., Globulizide Wirkungen des tierischen Organismus. Münchener med. Wochenschr., 1899, Nr. 13 u. 14, pag. 405.
Ders., Beiträge zur Immunitätslehre. Münchener med. Wochenschr. 1900, Nr. 20, pag. 677.
Ders., Die Antikörper, Resultate früherer Forschungen und neue Versuche, pag. 72 u. 73. Jena 1903.
Ders., Neue Versuche zur Physiologie der Befruchtung. Zeitschr. f. allgem. Physiol. 1902, Bd. I, pag. 34.
DZIERZGOWSKI, Zur Frage über die Beziehungen zwischen dem antidiphth. Heilserum und dem Diphtherietoxin. Arch. internat. de pharmakodyn. (1898), Tome V, pag. 1.
DZIERZGOWSKI, V. u. REKOWSKI, V., Ein Apparat, um Flüssigkeiten bei niederer Temperatur keimfrei abzudampfen. Centralbl. f. Bakt. 1892, Bd. XI, Nr. 22.
EHRLICH, P., Untersuchungen über Immunität. I. Über Ricin. II. Über Abrin. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 32 u. 44.
Ders., Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. Abdruck aus dem klin. Jahrb., Bd. VI. Jena 1897.
Ders., Schlußbetrachtungen in Nothnagels spez. Path. u. Therap., Bd. VIII, pag. 163.
EHRLICH, P., Chemotherapeutische Trypanosomenstudien. Berliner klin. Wochenschr. 1907, N. 9—12.
EHRLICH u. SACHS, Über die Vielheit der Komplemente des Serums. Berliner klin. Wochenschr. 1902, Jahrg. XXXIX, pag. 297.
Dies., Über den Mechanismus der Amboceptorenwirkung. Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 21.
EISENBERG, PHILIPP, Beiträge zur Kenntnis der spezifischen Präzipitationsvorgänge. Bull. de l'academie des sciences de Cracovie, Mai 1902, pag. 289.
Ders., Sur le leukocidines des anaerobies. Soc. biol. 1907, Tome LXII, Nr. 10.
EISLER, M. V., Über die Konservierung präzipitierender Sera auf Papier. Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 17.
ELFSTRAND, M., Über giftige Eiweiße, welche Blutkörperchen verkleben. Habilitationsschr., Upsala 1897; nach Hammarstens Referat: MALY, Bd. XXVII, pag. 932.
EMMERICH, R., Über die Infektion, Immunisierung und Heilung bei krupöser Pneumonie. Zeitschr. f. Hygiene 1894, pag. 167.
Ders., Schutzimpfung durch Anthrakase-Immunprotein gegen Milzbrand. Centralbl. f. Bakt., Bd. I, pag. 32, 821.
EMMERICH, R. u. LÖW, O., Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten. Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXI.
Dies., Die künstliche Darstellung der immunisierenden Substanzen (Nukleasen-Immunproteidine) und ihre Verwendung zur Therapie der Infektionskrankheiten und zur Schutzimpfung an Stelle des Heilserums. Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXVI, pag. 9—28.
EMMERICH, LÖW und KORSCHUN, Die bakteriolytische Wirkung der Nukleasen und Nukleasenimmunproteidine als Ursache der natürlichen und künstlichen Immunität. Centralbl. für Bakteriol., I. Abt., 1902, Bd. XXXI, pag. 1.
EMMERICH, R. u. TROMMSDORF, R., Über die erfolgreiche Behandlung tödlicher intraperitonealer Streptokokkeninfektionen bei Kaninchen durch präventive Pyocyanase-Immunproteidin-Injektionen. Centralbl. für Bakt., Bd. I, pag. 33, 627.
ENGELS, Centralbl. für Bakt. 1897, Bd. XXI, H. 3.
EWING, B. C., Einfluß des Klapperschlangengiftes auf die bakterienfeindliche Wirkung des Blutserums. Boston Medical und Surgical Journ., Vol. LXXX, pag. 487.
FALLOISE, A., Sur l'exist. de l'alexine hémolitique dans le plasma sanguin. Bull. de la Cl. des Sciences de l'Acad. Roy. de Belgique 1903, pag. 521.

Faust, E. S., Beiträge zur Kenntnis des Salamandarins. Archiv f. exper. Path. u. Pharm. 1898, Bd. XLI, pag. 229 und Beiträge zur Kenntnis der Salamanderalkaloide, daselbst 1899, Bd. XLIII, pag. 84.
Ders., Über Bufonin und Bufotalin, die wirksamen Bestandteile des Krötenhautdrüsensekretes. Archiv f. exper. Path. u. Pharm. 1902, Bd. XLVII, pag. 278.
Ders., Über das Fäulnisgift Sepsin. Archiv für exper. Path. u. Pharm., Bd. LI, pag. 248.
Ders., Über das Ophiotoxin aus dem Gifte der ostindischen Brillenschlange, Cobra di Capello (Naja tripudians). Archiv für exper. Path. u. Pharm., Bd. LVI, pag. 236.
Fermi, Cl., Die Leimgelatine als Reagens zum Nachweise tryptischer Enzyme. Archiv für Hyg., Bd. XII, pag. 238.
Ders., Reagentien und Versuchsmethoden zum Studium der proteolytischen und gelatinolytischen Enzyme. Archiv für Hyg. 1906, Bd. XL, pag. 155.
Fermi, C. u. Celli A., Contributo allo studio del velene chel tetano. Gaz. degli Ospit. 1893, Nr. 129; nach Maly, Bd. XXIV, pag. 799.
Fermi, C., Über die Enzyme. Zeitschr. für Hyg. u. Infekt. 1894.
Ders., Über die antienzymische Wirkung des Blutserums. Centralbl. für Bakt. 1897, Bd. XXII, pag. 1.
Ferrata, A., Die Wirksamkeit der komplexen Hämolysine in salzfreien Lösungen und ihre Ursache. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Bd. XLIV, pag. 366.
Ficker, M., Über die Typhusdiagnostik. Berliner klin. Wochenschr. 1903, pag. 1021.
Fleckseder, R. u. Stejskal, Karl Ritter v., Biologische Reaktionen mit Bandwurmextrakt. Wiener klin. Wochenschr. 1904, pag. 793.
Flexner, S. u. Noguchi, H., The constitution of snake venom. and snake sera. Journ. of Path. and Bact., Vol. VIII, pag. 379.
Dies., Journ. of medic. Research. 1904.
Dies., The influence of colloids upon the diffusion of haemolysins. Journ. of exper. Med. 1906, Vol. VIII, pag. 547.
Ford, W. W., Beitrag zur Lehre von den Hämagglutininen. Zeitschr. für Hyg. u. Inf. 1902, H. 2.
Ders., Antitoxica for poisonous mushroom intoxication. Med. News, Vol. LXXXVII, pag. 771.
Ders., The toxicological constitution of amanita phalloides. Journ. of exper. Med. 1906, Vol. VIII, pag. 437.
Ders., The toxins and antitoxons of poisonous mushroome (amanita phalloides). Journ. of infections diseases 1906, Vol. III, pag. 192.
Forssner, G., Über die Möglichkeit, isolierte Eiweißkörper bzw. eiweißhaltige Flüssigkeiten, welche aus ein und demselben Organismus stammen, durch Präzipitinreaktion zu differenzieren. Münchener med. Wochenschr. 1905, pag. 892.
Foth, H., Untersuchungen über die wirksamen Bestandteile des Malleins und über Mallein. Zeitschr. für Veterinärkunde 1892, Bd. IV.
Ders., Über die praktische Bedeutung des trockenen Malleins. Zeitschr. für Tiermed. 1893, Bd. XIX und 1894, Bd. XX.
Ders., Über die Gewinnung eines festen Malleins und über seine Bedeutung. Berlin 1896.
Fränkel, Eug., Über spezifische Behandlung des Abdominaltyphus. Deutsche med. Wochenschr. 1893, Nr. 41.
Frantzius, E., Einige Beobachtungen über die Wirkungen der Röntgenstrahlen auf das Gift der Tollwut. Centralbl. für Bakt., Bd. XXI, I, pag. 261.
Ders., Die Galle toller Tiere als Antitoxin gegen Tollwut. Centralbl. für Bakt., Bd. XXIII, I, pag. 782.
Fraser, Thomas, Bemerkungen über die antitoxischen Eigenschaften der Galle von Schlangen und anderen Tieren. British med. Journ. 1897, Nr. 1907.
Frenkel, L. u. Bronstein, O., Experimenteller Beitrag zur Frage über die tuberkulösen Toxine und Antitoxine. Berliner klin. Wochenschr. 1901, pag. 861.
Freund, E., Gerinnung des Blutes in v. Limbecks Grundriß einer klinischen Pathologie des Blutes. Jena 1896, pag. 173.
Ders., Ein Beitrag zur Kenntnis der Blutgerinnung. Wiener med. Jahrb. 1886, pag. 46.
Ders., Methodik des Toxinnachweises. Referat, erstattet am III. internationalen Kongreß für angewandte Chemie in der Sektion II C. Österreich. Chemikerzeitung 1899, Nr. 3, pag. 69.
Freund, E. u. Grosz, S., Über die Beziehungen von Albumosen zur passiven Immunisierung. Centralbl. für innere Med., Bd. XVII, pag. 497.

FREUND, E., GROSZ, S. u. JELINEK, O., Über die Beziehungen zwischen Gerinnung und der Wirkung der Antitoxine. Centralbl. für innere Med., Bd. XVI, pag. 913 u. 937.

FRIEDEMANN, U., Über ein komplexes Hämolysin der Bauchspeicheldrüse, I. Mitteil. Deutsche med. Wochenschr. 1907, pag. 585.

FRIEDMANN, F. F., Zur Tuberkuloseimmunisierung mit Schildkrötentuberkelbazillen. Deutsche med. Wochenschr., Bd. 31.

FRIEDBERGER, Untersuchungen über die Bedeutung der Salze für die Agglutination. Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXX, Nr. 8.

Ders., Über die Wirkungsweise anorganischer Salze und organischer Kristalloide auf die Agglutination der Bakterien. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXI, pag. 109.

FRIEDBERGER, E. u. MORESCHI, CARLO, Vergleichende Untersuchungen über die aktive Immunisierung von Kaninchen gegen Cholera und Typhus. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXIX, pag. 453.

FRIEDENTHAL, H., Weitere Versuche über die Reaktion auf Blutverwandtschaft. Engelmanns Archiv 1904, pag. 387.

FROUIN, A., Sur la formation des sérums, exclusivement agglutinants ou hémolitiques. Soc. biol. 1907, Tome LXII, Nr. 3.

FÜRTH, O. v. und JERUSALEM, E., Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentartigen Melaninbildung. Hofmeisters Beiträge, Bd. X, pag. 131.

GABRITSCHEWSKY, Sur les propriétés chimiotactiques des leukocytes. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1890, Tome IV.

GALEOTTI, G., Sulle inviulazioni preventive contra peste bubbonica. Lo sperimentale 1899, Tome LIII, pag. 240.

Ders., Wirkung der Nukleoproteide auf die Zellen und Gewebe. Lo speerimentale 1900, H. 5 (nach MALY, Bd. XXXI, pag. 910).

Ders., Beitrag zur Kenntnis der bakteriellen Nukleoproteide. Zeitschr. f. physiolog. Chem., Bd. XXV, pag. 48.

GAMALEIA, N., Actions des ferm. sol. sur les poisons diphth. Sem. med. 1892, Nr. 10.

Ders., Über die Wirkung der löslichen Fermente auf das diphtheritische Gift. Compt. rend. Soc. biol., Tome XLIV, pag. 153.

Ders., La vaccination préventive du cholera asiatique. Compt. rend., Tome CVII, pag. 432.

GAUTIER, ARMAND, Sur les alkaloides dérivés de la destruction bactérienne ou physiologique des tissus animaux. Ptomaines et leucomaïnes. Extrait du bulletin de l'acad. de méd., 12 et 19 janvier 1886.

GENGOU, O., Sur l'immunité naturelle des organismes monocellulaires contre les toxines. Ann. Inst. Pasteur 1898, Tome XII, pag. 465.

Ders., Contributions à l'etude de l'origine de l'alexine des sérums normaux. Ann. Pasteur, Tome XV, pag. 68 u. 232.

Ders., Compt. rend. de l'academ. de science, 11. April 1904.

Ders., Arch. de pharmacodyn, Tome VI, fasc. 5, 6, pag. 315.

GESSARD, G., Etudes sur la tyrosinase. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV, pag. 539.

GESSARD, C., Tyrosinase et Antityrosinase. Compt. rend. Soc. biol., Tome LIV, pag. 551.

GHÉORGHIEWSKY, Du mécanisme de l'immunité vis-a-vis du bacille pyocyanique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII, pag. 298.

GLÄSSNER, KARL, Über die Vorstufen der Magenfermente. Hofmeisters Beiträge, Bd. I, pag. 1.

Ders., Über die antitryptische Wirkung des Blutes. Hofmeisters Beiträge, Bd. IV, pag. 79.

Ders., Über den Einfluß der chemischen Zusammensetzung des Nährbodens auf die Immunkörper. I. Teil: Beeinflussung des Agglutinogens. Zeitschr. für exper. Path. u. Ther., Bd. I, pag. 640.

GLÄSSNER, K. u. ROSCULEC, V., Über den Einfluß der chemischen Zusammensetzung des Nährbodens auf die Immunkörper. II. Teil: Beeinflußung der Bakterienhämolysine, Bakterienfermente und deren Antikörper. Zeitschr. f. exper. Path. u. Ther. 1906, Bd. III, pag. 314.

GOSIO, B., Zur Methodik der Pestvaccinebereitung. Zeitschr. f. Hyg., Bd. L, pag. 519.

GOTTLIEB, R. u. LEFMANN, G., Über die Giftstoffe des artfremden Blutes. Medizinische Klinik 1907, pag. 414.

GRASSBERGER, R. u. SCHATTENFROH, A., Über das Rauschbrandgift und ein antitoxisches Serum, mit einem Anhange: Die Rauschbrandschutzimpfung. Eine experim. Studie. Wien und Leipzig, Fr. Deuticke.

GRIFFITHS, A. B., Compt. rend., Tome CXIII, pag. 656.

Grosz, S., Zur Kenntnis der antitoxisch wirkenden Substanzen. Wiener klin. Rundschau 1896, Nr. 17 u. 18.
Grund, G., Über organspezifische Präzipitine und ihre Bedeutung. Deutsches Archiv für klin. Med. 1906, Bd. LXXXVII, pag. 148.
Guéchoff, La methode des sacs de collodion appliquée à l'étude du bacille d'Eberth et du bacille coli. Thèse Montpellier 1900.
Guinochet, E., Beitrag zum Studium des Diphtheriebazillus. Compt. rend. Soc. biol., Bd. XLIV, pag. 480 und Compt. rend. de l'Acad. des sciences, Tome CXIV, p. 1296.
Gürber, A., Die Salze des Blutes. Verhandl. d. Physik.-med. Gesellschaft zu Würzburg (1894), Bd. XXVIII.
Ders., Zur Kenntnis der Chemie und Physiologie des Blutserums. Beiträge zur Physiologie: Festschr. für A Fick, 1899.
Hahn, M., Über die chemische Natur des wirksamen Stoffes im Kochschen Tuberkulin. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 30.
Ders., Über die Steigerung der natürlichen Widerstandsfähigkeit durch Erzeugung von Hyperleukocytose. Berliner klin. Wochenschr. 1896, Nr. 39, pag. 864.
Ders., Über die Beziehungen der Leukocyten zur bakteriziden Wirkung des Blutes. Archiv für Hyg., Bd. XXV, pag. 105.
Ders., Immunisierungs- und Heilversuche mit den plasmatischen Zellsäften von Bakterien. Münchener med. Wochenschr. 1897, pag. 1344.
Ders., Über die chemischen und immunisierenden Eigenschaften der Plasmine (Zellinhaltstoffe). Journ. of physiol., Vol. XXVIII, Suppl. 45.
Ders., Über die Einwirkung von Blut und Galle auf Gärungsvorgänge. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 50, pag. 2172.
Ders., Der Petrolätherextrakt des Blutes normaler und immunisierter Tiere. Münchener med. Wochenschr. 1904, pag. 689.
Hahn, M. u. Trommsdorff, R., Über Agglutinine. Münchener med. Wochenschr. 1900, pag. 413.
Halpern, M., Zur Frage über die Hämolysine des menschlichen Serums. Berliner klin. Wochenschr. 1902, pag. 1121 u. 1154.
Hamburger u. Hekma, Quantitative Studien über Phagocytose. I. Resistenz von Phagocyten gegenüber Wasserzusatz. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. III, pag. 88.
Hammerschlag, A., Bakteriologisch-chemische Untersuchungen über Tuberkelbazillen. Centralbl. für klin. Mediz., Bd. XII, pag. 9—18.
Hausmann, W., Zur Kenntnis des Abrins. Hofm. Beitr. 1902, Bd. II, pag. 134.
Ders., Die Entgiftung des Saponins durch Cholesterin. Hofm. Beitr., Bd. VI, pag. 567.
Hausmann, W. u. Kolmer, W., Über die Einwirkung kolloidaler Gifte auf Paramäcien. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. III, pag. 503.
Hausmann u. Wozasek, Über Entgiftung des Solanins durch Kohlensäure. Centralbl. für Physiol., Bd. XX, pag. 304.
Havet, La Cellule (1894), Bd. X, pag. 221.
Hayashi, H., Weitere Forschungen über die chemische Natur des Tetanustoxins. Archiv für exper. Pathol. u. Pharmak., Bd. XLVII, pag. 9—18.
Hedon, E., Sur l'hemolyse par les glycosides et les conditions de milieu qui la favorisent ou l'empechent. Archives intern. de pharmac. et de ther., Vol. IX, pag. 392 u. Vol. VIII, pag. 381, u. Compt. rend. d. Soc. biol., août 1900.
Henri, V. u. Kaylof, Étude des toxines contenues dans les pedicellaires chez les oursins. Soc. biol. 1906, 25. Mai. Tome LX, pag. 884.
Heller, Otto, Versuche zur Schutzimpfung gegen Cholera mit Choleranukleoproteid. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXIX, pag. 106.
Heller, O. u. Bertarelli, E., Beitrag zur Frage der Bildung toxischer Substanzen durch Lyssavirus. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXVI, pag. 216.
Hermann, M., Über den Ursprung der Alexine. Bull. de l'Acad. roy. de médéc. de Belgique (4), Tome XVIII, pag. 137.
Hess u. Römer, Experimentelle Untersuchungen über Antikörper gegen Netzhautelemente. Archiv für Augenheilkde. 1906, Bd. LIV, H. 1 u. 2.
v. Hoesslin, H., Klinische und experimentelle Untersuchungen über die Ausscheidung von Agglutininen durch den Harn Typhuskranker. Münchener med. Wochenschr. 1907.
v. Hofmann, Zur Kenntnis der Eiweißkörper in den Tuberkelbazillen. Wiener klin. Wochenschr. 1894, Nr. 7, pag. 12.
Honda, J., Untersuchungen über die Saponinsubstanzen der Dioscorea Tokoro Makino. Archiv für exper. Pathol. u. Pharmak. 1904, Bd. LI, pag. 211.
Hoppe-Seyler, Medizinisch-chemische Untersuchungen 1867, pag. 169; dann Hoppe-Seylers Thierfelder Handbuch der physiol.-chem. Analyse.

Hueppe, F., Nachweis des Choleragiftes beim Menschen. Berliner klin. Wochenschr. 1894, No. 17.
Ders., Über die Ätiologie und Toxikologie der Cholera. Deutsche med. Wochenschr. 1891, No. 53.
Hueppe, F. u. Kichuchi, J., Über eine neue sichere und gefahrlose Immunisierung gegen die Pest. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXIX, pag. 610.
Hueppe u. Scholl, Über die Natur der Kochschen Lymphe. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 4 u. 8.
Ide, M., Hémolyse et Antihémoglobine. La Cellule, Tome XX, 2d fasc.
Ders., Electivité moleculaire des précipitines. Bull. de l'Acad. roy. de médéc. Belg. (4), Tome XVII, pag. 913.
Immerwahr, R., Über das Vorkommen von Toxalbumin im menschlichen und tierischen Organismus. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 30.
Isaak, S. u. van den Velden, Eine spezifische Präzipitinreaktion bei Botriocephalus latus beherbergenden Menschen. Deutsche med. Wochenschr. 1904, pag. 982.
Ishizaka, Tomotaro, Studien über das Habuschlangengift. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Ther. 1907, Bd. IV, pag. 88.
Irimescu, S., Vergleichung der Wirkung der Paratuberkuline. Compt. rend. Soc. biol., Tome LIX, p. 385.
Jacobsohn, Leo, Über Antikörperbildung nach Injektion von Zymase. Münchener med. Wochenschr. 1903, pag. 2171.
Jacoby, M., Über die chemische Natur des Rizins. Archiv für exper. Pathol. u. Pharmak., Bd. XLVI, pag. 28—40.
Ders., Über Rizinimmunität. Hofm. Beitr. 1901, Bd. I, pag. 51, u. 1902, Bd. II, pag. 535.
Ders., Über Krotinimmunität. Hofm. Beitr. 1903, Bd. IV, H. 5/6, p. 212.
Ders., Über die Wirkung des Kobragiftes auf das Nervensystem. Salkowski-Festschrift.
Ders., Über die Beziehungen der Verdauungswirkung und der Labwirkung. Biochemische Zeitschr. 1906, Bd. I, pag. 53.
Ders., Zur Kenntnis der Fermente und Antifermente. Mitteil. I—V. Biochemische Zeitschr., Bd. II, pag. 144, 247; Bd. IV, p. 21, 471.
Jammes u. Mandoul, H., Académie des sciences. Sitzung vom 25. Juli 1904; nach Münchener mediz. Wochenschr. 1904, p. 1718.
Joos, Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination, I u. II. Zeitschr. für Hyg., Bd. XL, pag. 203 u. Bd. XXXVI, pag. 422.
Ders., Über die Bedeutung anorganischer Salze für die Agglutination der Bakterien. Centralbl. f. Bakt. 1901, Bd. XXX, Nr. 23.
Kammann, Zur Kenntnis des Roggenpollens und des darin enthaltenen Heufiebergiftes. Hofm. Beitr. zur chem. Phys. und Pathol., Bd. V, pag. 346.
Kasparek, Th., Ein Vakuumapparat zum Abdampfen von Kulturen mit Ehmannscher Wasserheizung. Centralbl. für Bakt. 1897, Bd. XXII, pag. 6.
Kempner, W. u. Schepilewsky, E., Über antitoxische Substanzen gegenüber dem Botulismusgift. Zeitschr. für Hyg., Bd. XXVII, pag. 213.
Klebs, E., Über die Wirkung des Kochschen Mittels auf Tuberkulose der Tiere nebst Vorschlägen zur Herstellung eines unschädlichen Tuberkulins. Wiener med. Wochenschr. 1891, Nr. 15.
Ders., Über heilende und immunisierende Substanzen aus Tuberkelbazillenkulturen. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XX. pag. 488.
Ders., Die kausale Behandlung der Tuberkulose. Hamburg 1894.
Klein, A., Zur Kenntnis der Agglutinine und gewisser Präzipitine des Blutes. Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 5 u. 6.
Ders., Über Erythropräzipitine und andere Immunprodukte einzelner Bestandteile des Blutes. Centralbl. für Bakt. u. Par. I, Bd. XXXIX, pag. 438.
Ders., Über die Spezifizität der Erythropräzipitine. Wiener klin. Wochenschr., Bd. XVIII, Nr. 41.
Ders., Über die Beeinflussung des hämolytischen Komplements durch Agglutination und Präzipitation. Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 48.
Klemperer, G. u. F., Versuche über Immunisierung und Heilung bei der Pneumokokkeninfektion. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 34 u. 35.
Klimoff, Zur Frage der Immunstoffe des Organismus. Zeitschr. für Hyg. 1901, Bd. XXXVII, pag. 115.
Knorr, A., Experimentelle Untersuchungen über die Grenzen der Heilungsmöglichkeit des Tetanus durch Tetanusheilserum. Habilitationsschrift. Marburg 1895.
Ders., Das Tetanusgift und seine Beziehungen zum tierischen Organismus. Münchener med. Wochenschr. 1898, Nr. 11 u. 12.

Kobert, R., St. Petersburger med. Wochenschr. 1891, Bd. XVI, Nr. 51.
Ders., Sitzungsber. der Naturforsch. Ges. zu Rostock 1899, Nr. 5.
Ders., Sitzungsber. der Naturforsch. Ges. zu Rostock (Anhang z. Archiv d. Vereins der Freunde der Naturges. in Mecklenburg 1900, 25. Mai, Nr. 3).
Ders., Gibt es für den Menschen gefährliche Spinnen? Die med. Woche 1902, pag. 154.
Ders., Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen. Stuttgart 1904, bei F. Enke.
Koch, R., Berichte über die in Kimberley ausgeführten Experimentalstudien zur Bekämpfung der Rinderpest. Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 225, 241.
Ders., Mitteilung über ein Heilmittel gegen Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, pag. 101.
Ders., Weitere Mitteilungen über das Tuberkulin. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 43.
Ders., Über neue Tuberkulinpräparate. Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 209.
Ders., Über die Agglutination der Tuberkelbazillen. Deutsche med. Wochenschr. 1901, pag. 829.
Kolle, W., Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Schutzimpfung des Menschen gegen Cholera asiatica. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 4—6.
Ders., Bericht über die Tätigkeit in der zu Studien über Pest eingerichteten Station des Instituts für Infektionskrankheiten. Zeitschr. für Hyg. 1899/1900, Bd. XXXVI, pag. 397.
Ders., Über den Stand der Typhus-Schutzimpfungsfrage auf Grund der neuesten Untersuchungen. Deutsche med. Wochenschr., Bd. XXXI, pag. 449.
Kolle, W. u. Strong, Über Schutzimpfung des Menschen mit lebenden abgeschwächten Pestkulturen (Pestvaccination). Deutsche med. Wschr. 1906, Nr. 11.
Kolle u. Wassermann, Versuche zur Gewinnung und Wertbestimmung eines Meningokokkenserums. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 16.
Korschun, Über Lab und Antilab. Zeitschr. für phys. Chemie 1902, Bd. XXXVI, pag. 141.
Ders., Sind im Labmolekül mehrere funktionierende Gruppen anzunehmen? Zeitschr. für phys. Chemie 1903, Bd. XXXVII, pag. 366.
Korschun, S. u. Morgenroth, J., Über die hämolytischen Eigenschaften von Organextrakten. Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 37, pag. 870.
Kossel, A., Beschreibung einiger Apparate. Zeitschr. für phys. Chemie 1901, Bd. XXXIII, pag. 5.
Kossel, A. u. H., Über die Einwirkung der Nukleinsäure auf Bakterien. Verh. d. Berliner phys. Ges. 1893/94, Nr. 4, 5 u. 6. Du Bois-Reym. Archiv f. Phys. 1894, pag. 200.
Kossel, H., Zur Kenntnis des Diphtheriegiftes. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XIX, pag. 977.
Ders., Über bakterizide Bestandteile tierischer Zellen. Zeitschr. für Hyg., Bd. XXVII, pag. 36.
Kowarski, Alb., Über den Nachweis vom pflanzlichen Eiweiß auf biologischem Wege. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 27, pag. 442.
Kraus, R., Über spez. Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera-, Typhus- und Pestbouillonkulturen erzeugt durch homologes Serum. Wiener klin. Wochenschr. 1897, pag. 736.
Kraus u. Dörr, Die experimentelle Grundlage einer antitoxischen Therapie der bazillären Dysenterie. Zeitschr. für Hyg. u. Inf. 1906, Bd. LV, pag. 1.
Kraus, R. u. Joachim, J., Über die Beziehungen der präzipitogenen Substanz zur agglutinogenen der Bakterien. Centralbl. f. Bakt. I, Bd. XXXVI, pag. 662 u. Bd. XXXVII, pag. 73.
Kraus u. Pribram, Über Beziehungen der Immunkörper zur präzipitogenen Substanz des Blutserums (Bakterienagglutinine). Centralbl. für Bakt. I, 1905, Orig., Bd. XXXIX, H. 1.
Kraus, R. u. von Stenitzer, Über Toxine des Typhusbazillus. Wiener klin. Wochenschr. 1907, pag. 344.
Kresling, K., Über die Bereitung des Maleins und seine Bestandteile. Archives des sciences biologiques, St. Petersburg, Bd. I, pag. 711.
Krompecher, E., In welchem Maße sind Tuberkelbazillen fähig, tuberkulöse Erkrankungen hervorzurufen? Magy. Orv. Archiv, N. F. Bd. I, pag. 297; nach Maly, Bd. XXX, pag. 1028.
Krüger, S., Über den Einfluß des konstanten elektrischen Stromes auf Wachstum und Virulenz der Bakterien. Zeitschr. für klin. Med., Bd. XXII, H. 2.
Kruse, Neue Untersuchungen über die Ruhr. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 8 u. 9, daselbst pag. 340.

KÜHNE, W., Virchows Archiv 1865, Bd. XXXIII, pag. 95.
Ders., Weitere Untersuchungen über die Proteine des Tuberkulins. V. Abhandlung aus der Reihe: Erfahrungen über Albumosen und Peptone. Zeitschr. für Biol., Bd. XXX, pag. 221 (N. F. Bd. XII).
KULLMANN, Hämolyse durch Karzinomextrakte. Berliner klin. Wochenschr. 1904, pag. 190 und Zeitschr. für klin. Med., Bd. LIII, pag. 239.
KYES, P., Über die Wirkungsweise des Kobragiftes. Berliner klin. Wochenschr. 1902, pag. 886 u. 918.
Ders., Über die Isolierung von Schlangengiftlecithiden. Berliner klin. Wochenschr. 1903, pag. 956, 982.
Ders., Kobragift und Antitoxin. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 19.
Ders., Über die Lecithide des Schlangengiftes. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 99.
KYES, P. u. SACHS, H., Zur Kenntnis der Kobragift aktivierenden Substanzen. Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 2—4.
LAMB, G., Über das Präzipitin des Kobragiftes, ein Mittel zur Differenzierung der Proteide von verschiedenen Schlangengiften. Lancet 1902, Vol. II, pag. 431.
LANDMANN, G., Über eine neue Methode der Tuberkulose-Toxinbehandlung. Hyg. Rundschau 1900, Bd. X, Nr. 8, pag. 361.
LANDSTEINER, K., Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. Centralbl. für Bakt. I, 1900, Bd. XXVII, pag. 357.
Ders., Über die Unterscheidung von Fermenten mit Hilfe von Serumreaktion. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII, pag. 344.
Ders., Über Beziehungen zwischen dem Blutserum und den Körperzellen. Münchener med. Wochenschr. 1903, pag. 1812.
LANDSTEINER, K. u. BOTTERI, A., Über Verbindungen von Tetanustoxin mit Lipoiden. IV. Mitteil. Centralbl. für Bakt. I, 1906, Orig., Bd. XLII, pag. 565.
LANDSTEINER u. V. EISLER, Über Präzipitinreaktionen des menschlichen Harnes. Wiener klin. Rundschau, Bd. XVII, pag. 10.
Dies., Über die Wirkungsweise hämolytischer Sera. Wiener klin. Wochenschr. 1904, pag. 676.
LANDSTEINER, K. u. JAGIĆ, N., Über die Verbindungen und die Entstehung von Immunkörpern. Münchener med. Wochenschr. 1903, pag. 764.
Dies., Über Analogien der Wirkungen kolloidaler Kieselsäure mit den Reaktionen der Immunkörper und verwandter Stoffe. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 3, pag. 63.
Dies., Über Reaktionen anorganischer Kolloide und Immunkörperreaktionen. Münchener med. Wochenschr. 1904, pag. 1185.
LANDSTEINER, K. u. REICH, MATH., Über die Verbindungen der Immunkörper. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXIX, pag. 83.
LANDSTEINER, K. u. STANKOVIČ, R., Über die Absorption von Eiweißkörpern und über Agglutininverbindungen. II. Mitteil. Centralbl. für Bakt. I, 1906, Orig., Bd. XLI, pag. 108.
Dies., Über die Bindung von Komplement durch suspendierte und Kolloid gelöste Substanzen. III. Mitteil. Centralbl. für Bakt. I, 1906, Orig., Bd. XLII, pag. 353.
LANDSTEINER, K. u. UHLIRZ, R., Über die Absorption von Eiweißkörpern. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XL, Orig., pag. 265.
LANGE, F., Über ein Exotoxin des Typhusbazillus. Compt. rend. Soc. biol., Tome LVIII, pag. 771.
LANGER, J., Über das Gift unserer Honigbiene. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. XXXVIII, pag. 381.
Ders., Zur Frage der Bildung spezifischer Antikörper im Organismus von Bandwurmwirten. Münchener mediz. Wochenschr., Nr. 52, pag. 1665.
LANNOY, Sur l'action protéolytique des venins. Compt. rend. Acad. d. Sc. 1902, 1. Sept.; zit. nach NOC.
LATAPIE, M., Nouveau broyeur pour la préparation de la pulpe d'organes. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, fasc. XVI, pag. 947.
LATSCHTENKO, P., Über Extraktion von Alexinen aus Kaninchenleukocyten mit dem Blutserum anderer Tiere. Arch. für Hyg., Bd. XXXVII, pag. 290.
LAVERAN et MESNIL, Recherches morphologiques et experimentales sur les trypanosome des rats (TR. LEWISI KENT.). Ann. Inst. Pasteur 1901, Tome XV, pag. 673.
LECLAINCHE u. VALLÉE, Compt. rend. de la Soc. biol. 1901.
LEVADITI, C., Wirkung der Salze auf den Organismus, hinsichtlich der Genese der agglutinierenden Eigenschaften. Compt. rend. de Soc. biol., Tome LI, pag. 757.

Levaditi, C., Über die thermostabilen Hämolysine des Blutserums. Compt. rend. de Soc. biol., Tome LVIII, pag. 579.

Levy, E. u. Steinmetz, C., Studien über den Diplococcus pneum. Fränkel. Archiv für exper. Pathol. u. Pharmak., Bd. XXXVII, pag. 89.

Levy, E., Über die Möglichkeit Meerschweinchen gegen Tuberkulose zu immunisieren. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXIII, pag. 701.

Levy, E. u. Blumenthal, Franz, Über die bakterizide Wirkung des Zuckers. Immunisierung vermittelst trockener, durch Galaktose abgetöteter Typhusbazillen. Mediz. Klinik 1906, Nr. 16, pag. 411.

Levy, E. u. Pfersdorff, E., Über die Gewinnung der schwer zugänglichen in der Leibessubstanz enthaltenen Sfoffwechselprodukte der Bakterien. Deutsche med. Wochenschr. 1902, pag. 879.

Lilienfeld, L., Über Blutgerinnung. Zeitschr. für physiol. Chem. 1895, Bd. XX, pag. 89.

Ders., Zur Chemie der Leukocyten. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XVIII, pag. 473.

v. Lingelsheim, Ausfällung bakterizider und globulizider Blutfermente durch Pflanzenschleim. Zeitschr. für Hyg. 1903, Bd. XLII, pag. 308.

Lipstein, A., Über Immunisierung mit Diphtheriebazillen. Deutsche med. Wochenschrift 1902, pag. 821.

Löbisch, W., Über Nukleinsäure-Eiweißverbindungen unter besonderer Berücksichtigung der Nukleinsäure der Milchdrüse und ihrer angeblichen Beziehung zur Kaseinbildung. Hofm. Beitr. 1906, Bd. VIII, pag. 191.

Loele, W., Über die Anwendung von Formalin bei dem Uhlenhuthschen Verfahren. Münchener med. Wochenschr. 1906, pag. 1053.

Löwenstein, E., Beiträge zur Kenntnis des Alexins. Sitzungsberichte d. Deutschen nat.-med. Vereines für Böhmen „Lotos" 1902, Nr. 3.

Ders., Über Katalasen in Bakterienfiltraten. Wiener klin. Wochenschr. 1903, pag. 1393.

Ders., Die Wirkung des Formalins auf die Milch und das Labferment. Zeitschr. für Hyg., Bd. XLVIII, pag. 238.

Löwit, Über die Beziehung der Leukocyten zur baktericiden Wirkung und zur alkalischen Reaktion des Blutes und der Lymphe. Beiträge zur pathol. Anatomie u. allgem. Pathol. 1897, Bd. XXII, pag. 172.

Ders., Über bakterizide Leukocytenstoffe. Centralbl. für Bakt. 1898, Bd. XXIII, pag. 1025.

Loewy u. Richter, Über den Einfluß von Fieber und Leukocytose auf den Verlauf von Infektionskrankheiten. Vorl. Mitteil. Deutsche med. Wochenschr. 1895, Nr. 15.

Lübbert u. Prausnitz, C., Zur Serumbehandlung des Heufiebers. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 11 u. 12.

Lübbert, A., Zur Serumbehandlung des Heufiebers. Therap. Monatsheft, Nr. 18, pag. 605—614.

Lüdecke, Zur Kenntnis der Glyzerinphosphorsäure und des Lecithins. Inaug.-Dissert. München 1905 (zit. nach Kyes).

Lüdke, H., Untersuchungen über die bazilläre Dysenterie. I. Über das Dysenteriegift. Centralbl. für Bakt. I, Orig., Bd. XXXVIII, H. 3, pag. 289.

Ders., Beiträge zum Studium der Komplemente. Münchener med. Wochenschr., Nr. 52, pag. 2065 u. 2126.

Lumière, Aug., Lumière, L. u. Chevrottier, J., Wirkung der künstlichen Oxydasen auf Tetanustoxin. Compt. rend., Tome CXXXVIII. pag. 652—654.

Lusini, Siero precipitante per l'oppio. Atti R. Accadem. dei Fisiocritici. Ser. IV, Vol. XVIII; nach Biochem. Centralbl. 1906, Bd. V, pag. 444.

Lust, Fr. A., Über einen Antikörper gegen Crotin im normalen Organismus. Hofm. Beitr. 1905, Bd. VI, pag. 132.

Lustig, A., Über die Wirkung des aus den Pestbazillen extrahierten Nukleins. Lo sperimentale 1898, Nr. 5.

Lustig, A. u. Galeotti, G., Versuche mit Pestschutzimpfungen bei Tieren. Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 227 u. 289.

Macfadyen, M. u. Rowland, Berichte der Deutschen chem. Ges. 1900, Bd. XXXIII, pag. 2768.

Macfadyen, A., Über die immunisierende Wirkung der Zellbestandteile des Typhusbazillus, die durch Zermalmen der Bazillen bei der Temperatur flüssiger Luft gewonnen werden. Proceedings of the Royal Society, Vol. LXXI, pag. 351.

Ders., Über das Vorkommen und den Nachweis von intrazellulären Toxinen. Zeitschr. für allgem. Physiol. 1904, Bd. III, pag. 302—312.

Macfadyen, Allan u. Rowland, Sidney, Das intrazelluläre Typhusgift. Proceedings Royal Soc. London, Vol. LXXI, pag. 77.

MACFADYEN, ALLAN u. ROWLAND, SYDNEY, Über die intrazellulären Toxine gewisser Mikroorganismen. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXV. pag. 415—416.
Dies., Über die intrazellulären Bestandteile des Typhusbazillus. Centralbl. f. Bakt., Bd. XXX, pag. 753.
MADSEN, Oversigtover d. Kgl. danske Vidensk. Selskabs Forhandlinger 1905, Nr. 1.
MADSEN, TH. u. NOGUCHI, H., Toxine und Antitoxine: Saponin und Cholesterin. Bull. de l'Acad. des Sc. et des Lettres de Danemark 1904, pag. 457.
Dies., Toxine und Antitoxine, Gifte und Gegengifte (Crotalus adam., Naja tripudians, Ancistrodon piscivorus). Bull. de l'Acad. des Sc. et des Lettres de Danemark 1906, pag. 233.
MADSEN, FAMULENER u. WALBUM, nach ARRHENIUS, Immunochemie, pag. 14.
MADSEN u. WALBUM, Toxine und Antitoxine. Über Rizin und Antirizin. Centralbl. für Bakt. 1904, I, Bd. XXXVI, pag. 242.
MAGNUS, W. u. FRIEDENTHAL, H., Über die Spezifizität der Verwandtschaftsreaktion der Pflanzen. Ber. der Deutschen botan. Ges., Bd. XXV, pag. 242.
MAGNUS, R., Die Wirkung synthetischer Gallensäuren auf die pankreatische Fettspaltung. Zeitschr. für physiol. Chem. 1906, Bd. XLVIII, pag. 376.
MALFITANO, G., La proteolyse chez l'aspergillus niger. Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, Tome XIV, pag. 60.
MALVOZ, E., Recherches sur l'agglutination du bacillus typhosus par des substances chimiques. Ann. de l'Inst. Pasteur 1897, Tome XI, pag. 582.
Ders., Sur les propriétés du sérum des animaux traités par les blastomycetes. Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXIX, pag. 688.
MARAGLIANO, E., Das antituberkulöse Heilserum und dessen Antitoxin. Berliner klin. Wochenschr. 1896, Nr. 35.
Ders., Der wäßrige Auszug der Tuberkelbazillen und seine Derivate. Berliner klin. Wochenschr. 1899, pag. 385.
MARENGHI, G., Über die gegenseitige Wirkung des antidiphtherischen Serums und des Diphtherietoxins. Centralbl. für Bakt. 1897, I, Bd. XXII, pag. 520.
MARKL, G., Beitrag zur Kenntnis der Pesttoxine. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXIV, pag. 641 u. 728.
Ders., Über Hemmung der Hämolyse durch Salze. Zeitschr. f. Hyg. 1902, Bd. XXXIX.
MARMIER, L., Sur la toxine charbonneuse. Ann. de l'Inst. Pasteur 1895, pag. 532.
MARTIN, Intercolon. med. Journ. of Australasia. August 1897; Proc. roy. soc. N. S. W. August 1896; nach MALY, Bd. XXIX, pag. 972.
MARTIN, C. J. u. THOMAS, CHERRY, The nature of the antagonism between toxins and antitoxins. Proc. roy. soc. 1898, Vol. LXIII, pag. 420.
MARTIN, SIDNEY u. WOLFENDEN NORRIS, R., Physiological action of the active principle of the seeds of Abrus precatorius. Proc. roy. soc. 1889, Vol. XLVI, pag. 94.
Ders., The toxic of the albumose from the seeds of Abrus precator. Proc. roy. soc. 1889, Vol. XLVI, pag. 100.
Ders., The chemical products of the growth of Bacillus anthracis and their physiological action. Proc. roy. soc., Vol. XLVIII, pag. 78—80.
Ders., Die chemischen Produkte pathogener Bakterien mit besonderer Berücksichtigung des Typhus. Wiener med. Blätter 1898, Nr. 25.
MARTIN, E. J., Experimenteller Beitrag zur Lehre von der Tollwutimpfung. Thèse Montpellier 1903.
MASSART, J., Le chimiotaxisme des leukocytes et l'immunité. Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, Tome VI, pag. 321.
MASSART et BORDET, CH., Le Chimiotaxisme des leukocytes et l'infektion mikrobienne. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome V, pag. 417.
Dies., Recherches sur l'irritabilité des leukocytes. Journ. de la soc. royale des scienc. med. et nat. de Bruxelles 1890.
MASURA, A., Zur Kenntnis von der Wirkung toter Tuberkelbazillen, mit einem Nachtrage von R. KOCKEL. Zieglers Beiträge z. pathol. Anat., Bd. XVI, H. 2.
MATTHES, Verhandlungen des Kongresses für innere Medizin 1907.
MAUWARING, W. H., Die Wärmeempfindlichkeit des Komplements. Centralbl. f. Bakt. I, 1907, Bd. XLIV, pag. 70.
MAYER, FR. u. ASCHOFF, L., Über die Receptoren der Milcheiweißkörper. Berliner klin. Wochenschr. 1902, pag. 638.
MAYER, M., Experimentelle Beiträge zur Trypanosomeninfektion. Zeitschr. f. exp. Path. u. Ther., 1905, Bd. I, pag. 539.
Ders., Weitere Versuche zur Darstellung spezifischer Substanzen aus Bakterien. II. Cholerabazillen. Deutsche med. Wochenschr. 1904, pag. 56.
MELCHIORI, G., Estrazione di sostanze agglutinati della orine dei tifosi. Boll. della Soc. Eustachiana 1906, Vol. III, fasc. 9—12; nach Bioch. Centralbl., Bd. V, pag. 339.

Messineo u. Calmida, Über das Gift der Tänien. Centralbl. f. Bakt. I, 1901, Bd. XXX, pag. 346.
Metalnikoff, S., Ein Beitrag zu der Frage über die Immunität gegen die Infektion mit Tuberkulose. Centralbl. f. Bakt. I, 1906, pag. 391.
Metschnikoff, E., Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. Ann. de l'Inst. Pasteur 1887, Tome I, pag. 321.
Metschnikoff, E., Roux et Taurelli-Salimbeni, Toxine et antitoxine cholérique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1896, pag. 257.
Mett, Dubois Archiv 1894, pag. 68.
Michaelis, L. u. Fleischmann, Über die angeblich präzipitogene Eigenschaft des Harnes. Fortschritte der Medizin, Bd. XXII, pag. 1257.
Michaelis, L. u. Rona, P., Eine Methode zur Entfernung von Kolloiden aus ihren Lösungen; insbesondere zur Enteiweißung von Blutserum. Biochem. Zeitschr. 1906, Bd. II, pag. 219.
Dies., Über die Löslichkeitsverhältnisse von Albumosen und Fermenten mit Hinblick auf ihre Beziehungen zu Lecithin und Mastix. Biochem. Zeitschr., Bd. IV, 1. Heft, pag. 11.
Moll, Leop., Über die Antiurease. Hofmeisters Beiträge, Bd. II, pag. 344.
Morawitz, P., Beiträge zur Kenntnis der Blutgerinnung. Deutsches Arch. f. klin. Med. 1904, Bd. LXXIX, pag. 215.
Ders., Über die gerinnungshemmende Wirkung des Kobragiftes. Deutsches Arch. f. klin. Med. 1904, Bd. LXXX, pag. 340.
Moreschi, C., Zur Lehre von den Antikomplementen. 2. Mitteilg. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Bd. XLIII, pag. 100.
Morgenroth, J., Über den Antikörper des Labenzyms. Centralbl. f. Bakt., Bd. XXVI, pag. 349.
Ders., Zur Kenntnis der Labenzyme und ihrer Antikörper. 2. Mitteilg. Centralbl. f. Bakt. 1900, Bd. XXVII, pag. 721.
Ders., Über Wiedergewinnung von Toxin aus seiner Antitoxinverbindung. Berliner klin. Wochenschr. 1905, Bd. XLII, Nr. 50.
Ders., Weitere Beiträge zur Kenntnis der Schlangengifte und ihrer Antitoxine. Festschrift zur Eröffnung des Pathol. Instituts Berlin, herausgeg. von J. Orth, Berlin 1906.
Ders., Methodik der Hämolysinuntersuchung. Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung, herausgegeben von P. Ehrlich. Berlin, Aug. Hirschberg, 1904, pag. 461.
Morgenroth u. Carpi, Über ein Toxolecithid des Bienengiftes. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 44, pag. 1424.
Dies., Über Toxolecithide. 1. Mitteilg. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 248.
Morgenroth u. Pane, Über Beobachtungen reversibler Veränderungen an Toxinen. Biochem. Zeitschr. 1906, Bd. I, pag. 354.
Morgenroth u. Stertz, Über den Nachweis syphilitischer Antikörper im Liquor cerebrospinalis von Paralytikern nach dem Wassermann-Plautschen Verfahren der Komplementablenkung. Virchows Archiv 1907, Bd. CLXXXVIII.
Mosen, Die Herstellung wägbarer Mengen von Blutplättchen. Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abtlg., 1893, pag. 352.
Much, H. u. Römer, P. H., Über belichtete Perhydrasemilch. Berliner klin. Wochenschr., Bd. XLIII, pag. 1004 ff.
Müller, P. Th., Über den Einfluß lokaler und allgemeiner Leukocytose auf die Produktion der Antikörper. Sitzungsbericht der K.K. Akad. der Wiss. Wien, math.-naturw. Kl. III, pag. 113, 163.
Murata, N., Schutzimpfung gegen Cholera. Centralbl. f. Bakt. I, Bd. XXXV pag. 605.
Néfédieff, N., Serum nephrotoxique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV, pag. 17.
Neisser, E. u. Döring, Zur Kenntnis der hämolytischen Eigenschaften des menschl. Serums. Berliner klin. Wochenschr. 1901, Nr. 22, pag. 593.
Neisser, M. u. Friedemann, U., Studien über Ausflockungserscheinungen, I u. II. Münchener med. Wochenschr. 1907, pag. 465 u. 827.
Neisser, M. u Sachs, M., Ein Verfahren zum forensischen Nachweis der Herkunft des Blutes. Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 44.
Neisser, M. u. Shiga, K., Über freie Receptoren von Typhus- und Dysenteriebazillen und über das Dysenterietoxin. Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 4.
Neisser, M. u. Wechsberg, Fr., Über eine neue einfache Methode zur Beobachtung der Schädigung lebender Zellen des Organismus (Bioskopie). Münchener med. Wochenschr. 1900, Nr. 37, pag. 1216.
Dies., Über die Wirkungsart bakterizider Sera. Münch. med. Wochenschr. 1901, pag. 697.

NEISSER, M., Über die Vielheit der im normalen Serum vorkommenden Antikörper. Deutsche med. Wochenschr. 1900, pag. 790.

NENCKI, M., Zur Geschichte der basischen Fäulnisprodukte. Journ. f. prakt. Chem., Bd. XXVI, pag. 47.

Ders., Über das Eiweiß der Milzbrandbazillen. Berichte der Deutschen chem. Gesellsch. 1884, Bd. XVII, pag. 2605.

NENCKI, M. und SCHAFFER, F., Über die chemische Zusammensetzung der Fäulnisbakterien. Journ. f. prakt. Chem., Bd. XX, pag. 443.

NENCKI, M., SIEBER, N. u. SCHOUMOW-SIMANOWSKI, Die Entgiftung der Toxine durch die Verdauungssäfte. Centralbl. f. Bakt., Bd. XXIII, Nr. 19 u. 20.

NEUBERG, C. u. REICHER, C., Lipolyse, Agglutination und Hämolyse. 2. Mitteilg. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 281.

NEUBERG, C. u. ROSENBERG, E., Lipolyse, Agglutination und Hämolyse. Berliner klin. Wochenschr. 1907, pag. 54.

NEUMANN, A., Nukleinsäuren A u. B aus Thymus und Nukleothyminsäure. Archiv f. Anat. u. Physiol. 1889, Suppl. pag. 552.

NICOLLE, CH., Recherches sur la substance agglutinée. Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, Nr. 2, pag. 161.

NICOLLE, M., Sero-immunité vis à vis du „Choleàte de soude". Ann. de l'Inst. Pasteur 1907, Tome XXI, pag. 26.

NIKOLAI, C., Der wirksame Bestandteil des Jequirity. Feestbundel Donders-Jubileum, Amsterdam, F. van Bossen; nach MALY, Bd. XVIII, pag. 340.

NIKANOROW, P. J., Über das Diphtherietoxin und -antitoxin. Wratsch 1896, Nr. 31; nach MALY 1896, Bd. XXVI, pag. 983.

NISHIMURA, L., Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung eines Wasserbazillus. Archiv für Hyg. 1893, Bd. XVIII, pag. 318.

NOC, F., Sur quelques propriétés physiologiques des differents venins de serpents. Ann. de l'Inst. Pasteur 1904, Tome XVIII, pag. 387.

Ders., Propriétés bactériolytiques et anticytasiques du venin de cobra. Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, Tome XIX, Nr. 4, pag. 209.

NOCARD et LECLAINCHE, Les maladies microbiennes des animaux. 3 édit. Paris 1903.

NOGUCHI, HIDEYO, The antihaemolyticaction of bloodsera, milk and cholesterin upon agaricin, saponin and tetanolysin together with observations upon the agglutination of hardened red corpuscles. Bakt. Centralbl. I, 1902, Bd. XXII, pag. 377.

Ders., On certain thermostabile venom activators. Journ. of Exp. Medicine, Vol. VIII, pag. 87.

Ders., On the coctostabile, non-specific anticomplement constituents of blood. Journ. of Exp. Medicine 1906, Vol. VIII, Nr. 6.

Ders., On the siccostability of complements and opsonin, and the influence of high temperatures upon these principles in the dry state. Journ. of Exp. Medicine 1907.

Ders., Toxine und Antitoxine. Therapeutische Versuche mit den Gegengiften (Crotalus adam. und Ancistrodon pisciv.). Bull. de l'Acad. des Sc. et des Lettres de Danemark 1906, pag. 269.

NOLF, P., Contribution à l'étude des sérums antihématiques. Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, Tome XIV, pag. 296.

NOVY, G. J., The immunizing power of Nucleohiston and of Histon. Journ. of exp. Medicine I, pag. 693.

OBERMAYER, FR. u. PICK, E. P., Biolog.-chemische Studie über das Eiklar. Wiener klin. Rundschau 1902.

Dies., Über den Einfluß physikalischer und chemischer Zustandsänderungen präzipitinogener Substanzen auf die Bildung von Immunpräzipitinen. K. K. Gesellschaft der Ärzte in Wien. Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 22.

Dies., Beiträge zur Kenntnis der Präzipitinbildung. Wiener klin. Wochenschr. 1904.

Dies., Über die chemischen Grundlagen der Arteigenschaften der Eiweißkörper. (Bildung von Immunpräzipitinen durch chemisch veränderte Eiweißkörper). Wiener klin. Wochenschr. 1906.

Dies., Über Veränderungen des Brechungsvermögens von Glykosiden und Eiweißkörpern durch Fermente, Säuren und Bakterien. Hofmeisters Beiträge 1905, Bd. VII, pag. 331.

ODDO, GUISEPPE u. COLOMBANO, AMEDEO, Über das Solanin aus Solanum sodomaeum Linn., cit. nach Chem. Centralbl. 1906, Bd. II, pag. 1650.

Dies., Über die Produkte, die man aus Solanum sodomaeum extrahiert. Berichte der Deutschen chem. Gesellsch., 38. Jahrg., pag. 2755.

OPIE, E. L., The enzymes in phagocystic cells of inflammatory exsudates. Journ. of exper. Med., Vol. VIII, pag. 410.

Oré, cit. nach Abel u. Ford, Arch. de physiolog. norm. et path. (II) 1877, Tome XL, pag. 274.
Ori, A., Richerche sul valore dell' etere etilico come mezzo di conservazione dei siera. Riv. d'igiene e sanita publica 1906, Jahrg. 16, Nr. 9.; cit. nach Bioch. Centralbl., Bd. V, pag. 196.
Osborne, Th. B., Lafayette B. Mendel and Isaac F. Harris, A study of the proteins of the castor bran, with special reference to the isolation of ricin. Amer. Journal of Physiology 1905, Sept. 1, Vol. XIV, Nr. 3.
Otto, R., Die staatliche Prüfung der Heilsera. Arbeiten aus dem Königl. Institut für exper. Therapie zu Frankfurt a. M., Heft 2. Jena 1906.
Otto u. Sachs, Über Dissoziationserscheinungen bei der Toxin-Antitoxinverbindung. Zeitschr. für exper. Path. u. Ther. 1906, Bd. III, pag. 19.
Ottolenghi, D., Über die Konservierung präzipitierender Sera. Wiener klinische Wochenschr. 1906, Nr. 29.
Pascucci, O., Die Zusammensetzung des Blutscheibenstromas und die Hämolyse. Erste Mitteilung: Die Zusammensetzung des Stromas. Hofmeisters Beiträge, Bd. VI, pag. 543.
Ders., Die Zusammensetzung des Blutscheibenstromas und die Hämolyse. Zweite Mitteilung: Die Wirkung von Blutgiften auf Membranen von Lecithin und Cholesterin. Hofmeisters Beiträge, Bd. VI, pag. 552.
Pasquini, P., Über das Tetanusgift in den Organen an Tetanus gestorbener Tiere. La riforma medica, Tome XVIII, Nr. 23, pag. 226; Maly, Bd. XXXII, pag. 895.
Passini, Fr., Über Giftstoffe in den Kulturen des Gasphlegmonebazillus. Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 36, pag. 921.
Pauli, W., Über den Anteil der Kolloidchemie an der Immunitätsforschung. Wiener klin. Wochenschr., Bd. XVIII, pag. 665.
Ders., Über die elektrische Ladung von Eiweiß und ihre Bedeutung. Naturw. Rundschau 1906, Bd. XXI, pag. 3 u. 17.
Pawlowsky, D. A., Über die Behandlung des Rhinoskleroms und Rhinosklerin. Deutsche med. Wochenschr. 1894, Nr. 13 u. 14.
Petrie, G. F., An Enquiry in to the essential Nature of bacteriolytical enzymes. Journ. of Path. and Bact., Vol. VIII, pag. 200.
Petruschky, Versuche zur spezifischen Behandlung des Typhus abdom. Zeitschr. für Hyg., Bd. XL, pag. 567.
Petterson, A., Über die Virulenz und immunisierende Wirkung des Typhusbazillus. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXVIII, pag. 73.
Ders., Ein sichtbarer Nachweis von Alexinwirkungen. Centralbl. für Bakt., Bd. XXX, pag. 726.
Pfeiffer, H., Experimentelle Studien zur Lehre von Autointoxikationen. Zeitschr. für Hyg. 1906, Bd. LIV, pag. 419.
Pfeiffer, R., Über die spezifische Immunitätsreaktion der Typhusbazillen. Deutsche med. Wochenschr. 1894, Nr. 48.
Pfeiffer, R. u. Kolle, W., Experimentelle Untersuchungen z. Frage der Schutzimpfung des Menschen gegen Typhus abdom. Deutsche med. Wochenschr. 1896, Nr. 46.
Pfeiffer, R. u. Marx, Über Schutzimpfungen gegen Cholera und Typhus mit konserviertem Impfstoff. Deutsche med. Wochenschr. 1898, pag. 489.
Pfersdorff, F., Über die schwer zugänglichen, in der Leibessubstanz enthaltenen Stoffwechselprodukte des Milzbrandbazillus. Biologie des asporogenen Milzbrandbazillus. Diss., Bern 1903. Zeitschr. für Tiermedizin, Bd. VIII, pag. 79 bis 97; nach Maly, Bd. XXXIV, pag. 1040.
Philippson, P., Über die Verwendbarkeit der Schilfschläuche zur Dialyse. Hofmeisters Beiträge, Bd. I, pag. 80.
Phisalix, C., La Tyrosine, vaccin chimique du venin de vipére. Compt. rend. Soc. biol., Tome L, pag. 153; Compt. rend. Soc. biol., Tome CXXVI, pag. 431.
Ders., Die Pilzsäfte vaccinieren gegen das Viperngift. Compt. rend. Soc. biol., Tome CXXVII, pag. 1036.
Ders., Antagonisme entre le venin des Vespidae et celui de la Vipère: le premier vaccine contre le second. Compt. rend. Soc. biol. [10] 1897, Tome IV, pag. 1031.
Ders., Über das Bienengift. Académie des sciences: Sitzung vom 25. Juli 1904; nach Münchner med. Wochenschr. 1904, pag. 1718.
Pick, E. P., Zur Kenntnis der Immunkörper. II. Mitteilung. Hofmeisters Beiträge 1902, Bd. I.
Ders., Zur Kenntnis der Immunkörper. III. Mitteilung. Über die Einwirkung chemischer Agentien auf die Serumkoaguline, Agglutinine, sowie auf den Vorgang der spezifischen Niederschlagsbildung und der Agglutination. Hofmeisters Beiträge, Bd. I, Heft 7—12.

PICK, E. P. u. SPIRO, K., Über gerinnungshemmende Agentien im Organismus höherer Wirbeltiere. Zeitschr. für physiol. Chemie 1900, Bd. XXXI, pag. 235.
PICOU, R. u. RAMOND, F., Action bactéricide de l'extrait de Taenia inerme. Compt. rend. Soc. biol. 1899, Tome LI, pag. 176; nach FAUST; „Tierische Gifte", pag. 225.
POHL, J., Über Blutimmunität. Arch. intern. d. pharmak. et d. therap., Vol. VIII, pag. 437 u. Vol. VII, pag. 1.
PODBELSKY, Contribution à l'etude de l'immunite vis-a-vis du bacillus subtilis. Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, Tome XII, pag. 427.
POLLAK, LEO, Zur Frage der einheitlichen und spezifischen Natur des Pankreastrypsins. Hofmeisters Beiträge 1904, Bd. VI, H. 3/4.
PORGES, OTTO, Über die Beziehungen zwischen Bakterienagglutination und Ausflockungserscheinungen der Kolloide. Centralbl. für Bakt. I, 1905, Bd. XL, pag. 133.
POUCHET, GABRIEL A., Recherches sur les ptomaïnes et composes analogues. Compt. rend. Soc. biol., Tome XCVII, pag. 1560.
POZERSKI, Über den befördernden Einfluß von Blutserum auf die Pankreas-Amylase. Compt. rend. Soc. biol. 1903, Bd. LV, pag. 429.
PRAUSNITZ, KARL, Zur Natur des Heufiebergiftes und seines spezifischen Gegengiftes. Berliner klin. Wochenschr., Nr. 42, pag. 227.
PRETI, L., Über die Existenz und Spezifizität der immunisatorischen Antidiastasen. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 6.
PRÖSCHER, F., Über die künstliche Immunität gegen Staphylokokken. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXIV, pag. 437.
PRUDDEN, M. and HODENPYL, E., Studies on the action of dead bacteria in the living body. The New-York med. Journ. 1891, June 6 and 20.
RADIGUER, P., Rolle der lokalen Tuberkulosetoxine im tuberkulösen Prozesse. Thèse de Paris 1905 (J. Anclair); nach MALY 1905, pag. 943.
RANSOM, Choleragift und Choleraantitoxin. Deutsche med. Wochenschr. 1895, Nr. 29.
Ders., Saponin und sein Gegengift. Sitzungsber. der Gesellschaft zur Beförd. der gesamten Naturwiss. zu Marburg 1901, pag. 37—41.
RASETTI nach MORGENROTH, L'Orosi. Giornale di Chimica, Farmacia e Scienze Affini, 1898, Settembre.
REHNS, JULES, Wirkung der Formoldämpfe auf verschiedene Antikörper und Antigene im trockenen Zustande. Compt. rend. Soc. biol., Tome LVI, pag. 64—65.
Ders., Beitrag zum Studium der erworbenen Immunität. Compt. rend. Soc. biol., Tome LII, pag. 1058.
REISS, E., Eine Beziehung des Lecithins zu den Fermenten. Berliner klin. Wochenschrift 1904, Nr. 45.
Ders., Über das Verhalten von Fermenten in kolloidalen Lösungen. Hofmeisters Beiträge, Bd. VII, pag. 151.
REMLINGER u. RIFFAT-BEY, Compt. rend. Soc. biol., Tome LV, pag. 730.
REMLINGER, P., Isolierung des Rabies-Virus durch Filtration. Ibid., pag. 1433.
Ders., Zum Studium des Wuttoxins (experimentelle Tatsachen). Compt. rend. Soc. biol., Tome LVI, pag. 346.
Ders., Der Durchgang des Hundewutvirus durch Filter. Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome XVIII, pag. 150—164.
REPIN, Sur l'absorption de l'abrine par les muqueuses. Ann. de l'Inst. Pasteur 1895, Tome IX, pag. 517.
RIST, E., Über die Giftigkeit von Diphtheriebazillen. Compt. rend. Soc. biol., Tome LV, pag. 978.
RITTHAUSEN, H., Über die Eiweißkörper der Rizinussamen der Proteinkörper, sowie der Kristalloide dieser Samen. Pflügers Archiv für Phys., Bd. XIX, pag. 15—53.
ROCHAT, G. FR., Beitrag zur Kenntnis des giftigen Bestandteiles des Ricins. Nederl. Tijdschr. v. Genesk. 1902, Bd. II, pag. 215; nach MALY, Bd. XXXII, pag. 942.
RODET, A. u. GALAVIELLE, Zum Einfluß von Glyzerin auf das Wutgift. Compt. rend. Soc. biol., Tome LIV, pag. 850.
RODET, A. u. GUÉCHOFF, Versuche, die Methode der Kollod.-Säckchen auf die Kenntnis der toxischen Produktion von Eberthschen Bazillen und des Bac. coli anzuwenden. Compt. rend. Soc. biol., Tome LII, pag. 962.
Dies., Über die Eigenschaft der Kollod.-Säckchen und ihre Rolle in der Bakteriologie. Ibid. pag. 965.
RODET, A. u. LAGRIFFOUL, Antityphussera. Ihre multiplen Eigenschaften in bezug auf die experimentelle Infektion. Compt. rend. Soc. biol., Tome LIX, pag. 267.
RODET, A., LAGRIFFOUL u. WAHBY, ALY, Das lösliche Toxin des Eberthschen Bacillus. Compt. rend. Soc. biol., Tome LVI, pag. 794, 998.
Dies., Arch. de médec. exper. et d'anat. path. I, Tome XXVI, pag. 397.
Dies., La toxine soluble du bacille d'Eberth. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXVI, pag. 593.

Roemer, Fr., Über den fermentativen Reiz der Proteine Buchners auf die Leukocyten. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 36.

Ders., Darstellung und Wirkung proteinhaltiger Bakterienextrakte. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 51.

Ders., Die chemische Reizbarkeit tierischer Zellen. Virchows Archiv, Bd. CXXVIII, pag. 98.

Rössle, R., Spezifische Sera gegen Infusorien. Archiv f. Hyg. 1905, Bd. LIV, pag. 1.

Rona, P. u. Michaelis, L., Beitrag zur Frage nach der kolloidalen Natur von Albumosenlösungen. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. III, pag. 109.

Rosenthal, Das Dysenterietoxin (auf natürlichem Wege gewonnen). Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 7, pag. 235.

Roux et Chamberland, Immunité contre la septicémie. Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome II, pag. 561.

Roux et Yersin, Contribution à l'etude de la diphtherie (2e memoire). Ann. de l'Inst. Pasteur 1889, Tome III, pag. 273.

Ruffer, M. A. u. Crendiropoulo, M., Mitteilungen über eine Methode zur Darstellung von Hämolysinen. British med. Journal 1903, Bd. I, pag. 150.

Dies., Über die antihämolytischen (hämosozic.) Eigenschaften des normalen Harnes. British med. Journal 1904, Bd. I, pag. 1418.

Dies., Sur le pouvoir hémosozique du chlorure de sodium et son mode d'action. Compt. rend. Soc. biol. 1906, Tome LX, pag. 79.

Ruppel, W. G., Zur Chemie der Tuberkelbazillen. I. Mitteil. Zeitschr. für phys. Chemie. Bd. XXVI, pag. 218.

Ders., Die Proteine. Behrings Beiträge zur experimentellen Therapie 1900, H. 4, pag. 89.

Sacharoff, G., Über Injektionen von Diphtherieantitoxin bei Tieren, welche mit normalem Pferdeserum vorbehandelt waren. Centralbl. für Bakt. I, 1900, Bd. XXXIX, pag. 99.

Sachs, H., Zur Kenntnis des Kreuzspinnengiftes. Hofmeisters Beiträge 1902, Bd. II, pag. 125.

Ders., Über Antipepsin. Fortschr. der Med. 1902, pag. 425.

Ders., Über Differenzen der Blutbeschaffenheit in verschiedenen Lebensaltern. Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV, pag. 686.

Sachs, H. u. Teruuchi, S., Die Inaktivierung der Komplemente im salzfreien Medium. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 16, 17 u. 19.

Salkowski, E., Über die Wirkung der Antiseptica auf Toxine. Berliner klin. Wochenschr. 1898, pag. 545.

Ders., Über die eiweißfällende Wirkung des Chloroforms. Zeitschr. für phys. Chemie, Bd. XXXI, pag. 329.

Sasaki Kumaji, Bestimmung der nicht dialysablen Stoffe des Harnes. Hofmeisters Beiträge 1907, Bd. IX, pag. 386.

Sata, A., Wirkung und Spezifizität der Cytotoxine im Organismus. Zieglers Beiträge z. path. Anat. 1906, Bd. XXXIX, pag. 1.

Schattenfroh, A., Über das Vorhandensein von bakteriziden Stoffen in den Leukocyten und deren Extraktion. Münchener med. Wochenschr. 1897, Nr. 4—6 und daselbst pag. 414.

Ders., Über die bakterienfeindlichen Eigenschaften der Leukocyten. Archiv f. Hyg., Bd. XXXI, pag. 1—81.

Ders., Neuere Erfahrungen über die bakterienfeindlichen Stoffe der Leukocyten und über hitzebeständige bakterizide Leukocytenstoffe. Münchener med. Wochenschr. 1898, pag. 1109.

Ders., Über spezifische Blutveränderungen nach Harninjektionen. Münchener med. Wochenschr. 1901, pag. 1239 u. Zeitschr. für Hyg., Bd. XLIV, pag. 339.

Schaumann, O. u. Tallquist, T. W., Über die Blutkörperchen auflösenden Eigenschaften des breiten Bandwurms. Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 24, pag. 312.

Schmidt, Fr., Immunisierung gegen Schweinepestbazillen mit Autolysaten, Schüttelextrakten und Zerreibungsprodukten dieser Bazillen. Inaug.-Diss. der Univ. Gießen. Arbeiten aus dem Hyg. Inst. der Kgl. tierärztl. Hochschule Berlin, 1906, Nr. 9.

Schütze, A., Über die spezifische Wirkung einer aus Typhusbakterien gewonnenen Substanz im tierischen Organismus. Deutsche med. Wochenschr., Bd. XXVIII, pag. 478.

Ders., Weitere Beiträge zum Nachweise verschiedener Eiweißarten auf biologischem Wege. Zeitschr. für Hyg., Bd. XXXVIII, pag. 487.

SCHÜTZE, A., Zur Frage der Differenzierung einzelner Hefearten mittels der Agglutinine. Zeitschr. für Hyg. u. Inf. 1903, Bd. XLIV, pag. 423.
Ders., Über einen Antikörper gegen Steapsinsolution. Deutsche med. Wochenschr. 1904, pag. 308.
Ders., Über Antilaktase. Zeitschr. für Hyg. u. Inf. 1904, Bd. XLVIII, pag. 457.
Ders., siehe BERGELL, P. u. SCHÜTZE, A., Zur Frage der Antipankreatinbildung. Zeitschr. für Hyg. u. Inf., Bd. L, pag. 308.
SCHULZ. FR. N., Der Eiweißkörper des Hämoglobins. Zeitschr. für phys. Chemie 1898, Bd. XXIV, pag. 454.
Ders., Die Kristallisation von Eiweißstoffen und ihre Bedeutung für die Eiweißchemie, pag. 30. Jena, G. Fischer. 1901.
SCHULZE, E. u. CASTORO, N., Bildet sich Homogentisinsäure beim Abbau des Tyrosins? Zeitschr. für phys. Chemie 1906, Bd. XLVIII, pag. 396.
SCHUR, H., Über Hämolyse. Hofmeisters Beiträge 1902, Bd. III.
SCHUURMANS-STEKHOVEN, Zeitschr. für phys. Chemie, Bd. XXXIII, pag. 296 und Malys Jahresber. f. Tierchemie 1901, Bd. XXXI, pag. 212.
SCHWARZ, L., Uber Verbindungen der Eiweißkörper mit Aldehyden. Zeitschr. für phys. Chemie 1900, Bd. XXXI, pag. 460.
SCHWARZ, OSW., Zur Kenntnis der Antipepsine. Hofmeisters Beiträge, Bd. VI, pag. 524.
SCHWEINITZ, DE A. E. and DORSET, MARION, Some products of the Tuberculosis Bacillus and the treatment of experimental Tuberculosis with antitoxic Serum. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXII, pag. 208.
SCHWONER, Eine Differenzierung der Diphtheriebazillen von den Pseudodiphtheriebazillen durch Agglutination. Wiener klin. Wochenschr. 1902, pag. 1274.
SCIOLLA, S., Sui prodotti tossici della tuberculose. 7. Kongreß f. innere Med. Rom 1896; nach MALY, Bd. XXVII, pag. 893.
SEIBERT, Inaug.-Diss. München 1893.
SELMI, F., Ptomaine, Bericht d. D. chem. Ges., Bd. XLI, pag. 808 u. 1838.
SELMI, J., CASALI, A. u. PESCI, L., Gli alcaloidi dei cadaveri. Bollettino delle scienze mediche Bologna 1876, pag. 256; nach MALY, Bd. VI, pag. 79.
SHIGA u. NEISSER, Über freie Rezeptoren von Typhus- und Dysenteriebazillen und über das Dysenterietoxin. Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 4.
SHIGA, K., Über aktive Immunisierung von Menschen gegen Typhusbacillus. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 79.
SHIBAYAMA, A., Einige Experimente über Hämolysine. Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXX, pag. 760.
SIEBER, N., Über die Entgiftung der Toxine durch die Superoxyde. Zeitschr. für phys. Chemie 1901, Bd. XXXII, pag. 573.
SIEBER, N. u. SCHUMOFF SIMONOWSKI, C., Die Wirkung des Erepsins und des Darmsaftes auf Toxine und Abrin. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXXVI, pag. 244.
SIEBER, N., Über die oxydierenden Enzyme. Gazeta lekarska, Tome XXII, pag. 271; nach MALY, Bd. XXXII, pag. 944.
SIEGFRIED, A., Ein Beitrag zur Kenntnis des physiologisch-chemischen Verhaltens des kieselsauren Natriums, des Kieselfluornatriums und des Fluornatriums. Archives internationales de Pharmacodynamie et de Therapie 1901, Tome IX, pag. 225.
SLUYTS, CH., Etude sur les propriétés du poison du choléra asiatique. Extrait de la Revue „La Cellule“, Tome X, H. 1, pag. 187.
SOBERNHEIM, G., Experimentelle Untersuchungen über Choleragift und Choleraschutz. Zeitschr. für Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. XIV, pag. 485.
SPENGLER, K., Ein neues immunisierendes Heilverfahren der Lungenschwindsucht mit Perlsuchttuberkulin, zitiert nach MALY, Bd. XXXIV.
SSAWTSCHENKO, J. u. SABOLOTNY, D., Die Immunisierung des Menschen gegen Cholera. Wratsch 1893, Nr. 20 u. 21. St. Petersb. med. Wochenschr. 1893, Beil. Nr. 5; nach MALY, Bd. XXIII, pag. 677.
STEINHARDT, EDUA, Der Einfluß des Filtrierens auf die bakteriologischen Komplemente. Journ. med. research, Tome XII, pag. 479—490.
STERN, Über einige Injektionsversuche mit Stoffwechselprodukten von Tuberkelbazillen. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 31.
STERNBERG, C., Über die Ergebnisse seiner Untersuchungen über die Wirksamkeit toter Tuberkelbazillen. Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte, 74. Versammlung zu Karlsbald 1902, II. Teil, 2. Hälfte, pag. 11.
STRAUSS u. GAMALEIA, Contribution à l'étude du poison tuberculeux. Arch. de méd. exper. 1891, Tome VI.

Strong, R. P., Über Schutzimpfung gegen asiatische Cholera. Journ. infectious Diseases 1905, Jan. 12.
Tarassévitch, L., Sur les cytases. Annales de l'Institut Pasteur 1902, Tome XVI, pag. 127.
Tavel. Krumbein, Glücksmann, Über Pestschutzmaßregeln. Zeitschr. für. Hyg., Bd. XL, pag. 239.
Terni, C. u. Bandi, J., Bereitung der antipestösen Lymphe aus dem peritonealen Exsudat der infizierten Tiere. Deutsche med. Wochenschr. 1900, pag. 463.
Teruuchi, Yutaka, Die Wirkung des Pankreassaftes auf das Hämolysin des Kobragiftes und seine Verbindungen mit dem Antitoxin und Lecithin. Zeitschr. für physiol. Chemie 1907, Bd. LI, pag. 478.
Theohari, A. u. Babes, Aurel, Über ein Gastrotoxin. Zentralbl. für allgem. Pathol. 1903, Nr. 11.
Tiberti, N., Über die immunisierende Wirkung des aus dem Milzbrandbazillus extrahierten Nukleoproteins. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXVI, pag. 62—71.
Ders., Intorno al potere immunizzante del nucleoproteide estratto dal bacillo del carbonichio ematico. Lo sperimentale 1906, Bd. LIX, H. 5, pag. 531; nach Biochem. Centralbl. 1906, pag. 338.
Tichomiroff, M., Über die Fällung von Toxalbuminen durch Nukleinsäure. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXI, pag. 90.
Tizzoni, G. u. Cattani, G., Über das Tetanusgift. Archiv für exper. Path. u. Pharm., Bd. XXVII, pag. 432.
Tizzoni, G. u. Bongiovanni, A., Weiteres über die Behandlung der Wut mittels Radiumstrahlen und über den Mechanismus ihrer Wirkung. Centralbl. für Bakt. I, 1906, Orig., Bd. XLII, pag. 80.
Tröster, O. R., Zeitschr. für Veterinärkde. 1892, Bd. IV.
Trommsdorff, R., Können von lebenden Leukocyten Alexine sezerniert werden? Archiv für Hyg., Bd. XL, pag. 382.
Uhlenhuth, 1. Sitzung des Vereins für Mikrobiologie, Berlin 1906. Centralbl. f. Bakt. 1906.
Uschinsky, Recherches sur la nature des poisons de la diphtherie et du cholera. Archiv de med. exp. d'anat. path. 1893, Tome V, pag. 293.
Ders., Über eine eiweißfreie Nährlösung für pathogene Bakterien nebst einigen Bemerkungen über Tetanusgift. Centralbl. f. Bakt. u. Par. 1893, Bd. XIV, pag. 316.
Vaillard u. Vincent, Über das Tetanusgift. Compt. rend. soc. biol., Tome XLII, pag. 634.
Vaillard, L., Sur quelques points concernant l'immunité contre le Tetanos. Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, Nr. 4.
Vallée, H., Erhöhung der Virulenz in den Körperflüssigkeiten hyperimmunisierter Tiere. Compt rend. soc. biol., Tome LI, pag. 432.
Vansteenberghe, P., Konservierungsverfahren für Rabiesgift im trockenen Zustande. Compt. rend. soc. biol., Tome LV, pag. 1646.
Vaughan, V. C. jr., The production of active immunity with the split products of the colon bacillus. Journ. of Med. Research. 1904, Vol. XIV, pag. 67.
van de Velde, H., Cellule, Tome X et XI.
Ders., Contribution à l'immunisation des lapins contre le staphylocoque et le streptocoque pyogénes. Ann. de l'Inst. Pasteur 1896, Tome X, pag. 580.
Vandevelde, J. J. A. (Gent, Belg.), Über Diffusion von Enzymen durch Cellulosemembrane. Biochem. Zeitschr. 1906, Bd. I, pag. 408.
Vincent, M. H., Sur les propriétés des mélanges de toxine et d'antitoxine tetaniques. Compt. rend. de societ. biol. 1907, Bd. LXII, pag. 122.
Waele, de et Sugg, Experimentelle Untersuchungen über die Kuhpockenlymphe. Centralbl. f. Bakt., I, 1905, Orig., Bd. XXXIX, pag. 46 u. 142.
Waele, H. de, Etude sur l'immunité conferée par la méthode des sacs de cellulose et sur les products microbiens dialysants. Centralbl. f. Bakt. I, 1906, Bd. XLII, pag. 636.
Waele, H. de, Sugg, E. u. Vandevelde, A. J. J., Über die proteolytischen Fermente der Bakterien und eine Methode, die Verflüssigung der Gelatine quantitativ zu bestimmen. Centralbl. f. Bakt., Bd. XXXIX, pag. 353.
Warden and Waddell, The non-bacillar nature of Abrus poison. Kalkutta 1884; zit. nach Maly, Bd. XX, pag. 16.
Wassermann, Experimentelle Untersuchungen über einige theoretische Punkte der Immunitätslehre. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrkh. 1896, Bd. XXII, pag. 263.
Ders., Über eine neue Art von Diphtherieserum. Deutsche med. Wochenschr. 1902, pag. 785.

WASSERMANN, A. u. CITRON, JUL., Zur Frage der Bildung von bakteriellen Angriffsstoffen im lebenden Organismus. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Bd. XXXI. pag. 1101.

Dies., Neuere experimentelle Beobachtungen über Nährstoffe. Deutsche med. Wochenschrift 1906, Bd. XXXII, pag. 645.

Dies., Über die Beziehungen des Serums zu gewissen Nährstoffen (Glykogen, Albumosen, Pepton). Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therapie 1907, Bd. IV, pag. 273.

WASSERMANN, A. u. PROSKAUER, B., Über die von den Di-Bazillen erzeugten Toxalbumine. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 17.

WASSERMANN, A. u. TAKAKI, T., Über tetanusantitoxische Eigenschaften des normalen Centralnervensystems. Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 5—6.

WEICHARDT, W., Über das Ermüdungstoxin und -antitoxin. Münchener med. Wochenschr., Nr. 12—13, pag. 2121—2126.

Ders., Über das Eiweißabspaltungsantigen von Ermüdungstoxincharakter und dessen Antitoxin. Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. XLIII, Heft 4.

WEICHARDT, W., Serologische Studien auf dem Gebiete der experimentellen Therapie. Stuttgart, Ferd. Enke, 1906.

Ders., Über das Ermüdungstoxin und dessen Hemmungskörper. Mediz. Klinik 1906, Nr. 44.

WEIL, EDM., Über Aggressinimmunisierung von Schweinen gegen Schweineseuche. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLI, H. 1.

Ders., Untersuchungen über Infektion und Immunität bei Hühnercholera. Archiv für Hyg., Bd. LII, pag. 412.

WEINLAND, Über Antifermente I und II. Zeitschr. für Biol. 1902, Bd. XLIV, pag. 1 u. 45.

WELEMINSKY, F., Über mechanische Gewinnung bakterizider Leukocytenstoffe. Prager med. Wochenschr., Nr. 25, H. 9 u. 10.

WENDELSTADT, H., Über einen Antikörper gegen Blutegelextrakt. Archives intern. de pharmakodyn. et de therap. 1901, Vol. IX, pag. 407.

Ders., Einwirkung von Glykogen auf hämolytische Vorgänge. Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV, pag. 831.

WERNER, Über Rizinen und die wirksamen Bestandteile der Rizinussamen. Pharmazeutische Zeitg. für Rußland 1870, Nr. 2.

WEYL, TH., Zur Chemie und Toxikologie des Tuberkelbazillus. Deutsche mediz. Wochenschr. 1891, Nr. 7.

WHEELER, The extraction of the intracellulär toxin of the colon bacillus. Journ. Am. Med. Assoc. 1905, Bd. XLIV, pag. 1271; Biochem. Centralbl., Bd. IV, pag. 923.

WIECHOWSKI, W., Eine Methode zur chemischen und biologischen Untersuchung überlebender Organe. Hofmeisters Beitr. 1907, Bd. IX, pag. 232.

WILDE, M., Über die Absorption der Alexine durch abgetötete Bakterien. Berliner klin. Wochenschr. 1901, pag. 878.

Ders., Über die Beeinflussung der Alexinwirkung durch Absorption. Ein Beitrag zur Kenntnis der natürlichen Schutzstoffe des Blutes. Archiv für Hyg. 1902, Bd. XLIV, pag. 1.

WINTERBERG, H., Untersuchungen über das Typhus-Agglutinin und die agglutinierbare Substanz der Typhusbouillon. Zeitschr. für Hyg., Bd. XXXII, pag. 375.

WOELFEL, A., Identifizierung von Alkohol löslichen Hämolysinen im Blutserum. Journ. of infect. dis. 1905, Vol. II, pag. 97.

WOHLGEMUTH, J., Untersuchungen über den Pankreassaft des Menschen. IV. Mitteil. Über ein in ihm enthaltenes komplexes Hämolysin und über die Darstellung des Lecithids. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 471.

WOLFENDEN, NORRIS R., The venom of the indian Cobra (Naja tripudians). Univers. College, London. Journ. of physiol., Vol. VII, pag. 327.

Ders., A note upon the venom of the indian viper (Dab. Russ.). Journ. of physiol., Bd. VII, pag. 357.

WOLFF-EISNER, A., Über Komponenten des Tetanustoxins bei Anwendung von wasserfreiem Salzsäuregas bei der Temperatur der flüssigen Luft. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 44, pag. 2145.

Ders., Das Heufieber. München, J. F. Lehmann, 1906.

WOOLDRIDGE, Zur Chemie der Blutkörperchen. Du Bois-Reymonds Archiv 1881, pag. 387.

WRIGHT, On the Leukocytes of Peptone and other Varieties of liquid Extravascular Blood. Proceedings of the Royal Society, Febr. 1893.

Wright, A. E. u. Leishman, W. B., Bemerkungen über die bei Antityphusinokulationen erhaltenen Resultate und über die bei der Bereitung der Vaccine angewendeten Methoden. British med. Journ. 1900, 20. Jan., pag. 17.

Wright, A. E. and Semple, D., Remarks on vaccination against typhoid fever. British med. Journ. 1897, 30. Jan., pag. 11.

Wyrschikowsky, Über die Wirkung der Verdauung auf das Virus der Tollwut. Archiv f. Veterinärwiss. 1891; nach Maly, Bd. XXII, pag. 612.

Yabé Tatsusaburo, L'étude de l'immunité de la Tuberculose. Paris 1900; zitiert nach Ruppel „Die Proteine". Beiträge zur experimentellen Therapie, H. 4. Marburg 1900.

Zangger, H., Deutungsversuch der Eigenschaften und Wirkungsweise der Immunkörper. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXIV, pag. 428—437.

Zlatogoroff, S. J., Über die Anwendung des Streptokokkenimpfstoffes bei Scharlach. Centralbl. für Bakt. I, 1906, Orig., Bd. XLII, pag. 77.

Zinno, Andrea, Beitrag zum Studium der Entstehung der Toxine mit besonderer Berücksichtigung neuer Kulturböden mit starker Erzeugung von Toxinen. Centralbl. für Bakt. I, Bd. XXXI, pag. 42—56.

Darstellung der Schutzstoffe und Methoden der Schutzimpfung gegen Infektionskrankheiten der Menschen.

XVII.

Technik und Methodik der Vaccination.

Von

Dr. Gustav Paul,

Direktor der Staatsimpfanstalt in Wien.

I. Historischer Teil.

Kein Zweig der medizinischen Wissenschaft wurzelt so tief in der historischen Überlieferung als die Vaccination und nirgends ist die Technik und Methodik so eng mit ihr verknüpft, wie hier, weil ja gerade die Fundamentalfrage nach Herkunft, Art und Wahl des Ausgangsmateriales ohne genaue Kenntnis und kritische Musterung der bezüglichen, in der gewaltigen Impfliteratur der ersten Hälfte des vorigen Jahrhunderts niedergelegten Erfahrungstatsachen gar nicht zu beantworten ist.

Es ist auch keineswegs leicht, in dem Wirrsal der darin vorkommenden, einander diametral entgegengesetzten Meinungen und Deduktionen, die nur zum geringsten Teile auf dem Boden exakter experimenteller Forschung ruhen, den leitenden Faden zu finden, um eine sichere Basis für eine rationelle Methodik und Technik auf diesem Gebiete zu gewinnen.

Auch ist die Kenntnis der historischen Entwicklung der Vaccination zum Verständnis ihres Wesens unerläßlich, jedoch bei dem großen Umfange der einschlägigen Literatur nicht ohne erhebliche Mühe zu erlangen, weshalb ein kurz gefaßter Abriß derselben Manchem willkommen sein dürfte.

Selbstverständlich soll nur jener Teil der Historie, der sich auf die Impfstoff-Frage selbst bezieht, Gegenstand der Besprechung in den nachfolgenden Ausführungen sein.

Als Kuhpocken (cow pox, Variola vaccina, s. Variolae vaccinae) bezeichnet man ein lokalisiertes Exanthem von besonderer Eigenart, das bei Kühen an den Zitzen, den sogenannten Strichen, ab und zu spontan und scheinbar autochthon auftritt und das man lange Zeit als originäre Erkrankung der Kühe aufgefaßt hat. Die immunisierende Wirkung des auf den Menschen überimpften Inhaltes der Kuhpocken in Verbindung mit der auffallenden Ähnlichkeit des voll entwickelten Exanthems bei Menschenpocken mit jenem der Kuhpocken, veranlaßten Edward Jenner, dieser merkwürdigen Affektion in Gegenüberstellung mit der Variola humana den Namen Variola vaccina (Variolae vaccinae nach der Originalbezeichnung Jenners) beizulegen. Jenner nahm wohl eine nahe Verwandtschaft dieser beiden Prozesse an, war jedoch weit entfernt davon, die Variola vaccina als direkten Abkömmling der Variola humana zu erkennen, wofür gegenwärtig der Beweis experimentell erbracht erscheint. In seiner ersten berühmten Schrift (Anquiry into the causes and effects of the Variolae-Vaccinae, London, 1798) ist vielmehr Jenner geneigt, den Ursprung der Kuhpocken auf den Hufausschlag der Pferde, die sogenannte Mauke, the greas, zurückzu-

führen. Später erklärte er die Kuh- und die Menschenpocke für identische Prozesse, meinte aber, die Kuhpocke sei die Urform und die Menschenpocke eine bösartige Abart derselben.

Die zufällig gefundenen, „echten" Kuhpocken sind nach Bollingers wohlfundiertem Urteile keine originäre Erkrankung der Kühe, wie etwa die Schafpocken eine solche des Genus ovinum darstellen, sondern nur die Folge einer zufälligen Übertragung von Variolavirus, wie bei der „Urpocke" Jenners, oder des Vaccinevirus von geimpften Kindern — die bei weitem häufigere Gelegenheitsursache —, auf Kühe durch die infizierten Hände der Melker. Schon die Lokalisierung der spontanen Kuhpocken auf die Striche des Euters und die Beschränkung ihres Vorkommens auf weibliche Tiere, deutet untrüglich auf das erwähnte mechanische Moment der Infektion. Die Vaccination gelingt nämlich an beliebigen Hautstellen ebensogut bei männlichen, wie bei weiblichen Impftieren.

Der Ausdruck Vaccine erscheint in der älteren und neueren Literatur promiscue bald als Bezeichnung für das Lokalexanthem (Exanthema variolae vaccinae), bald als Bezeichnung für den Inhalt der Kuhpocke, die Kuhpockenlymphe (Lympha variolae vaccinae). Die Bezeichnung Variolavaccine wird aber nicht nur im Jennerschen Sinne als Andeutung der Verwandtschaft der Vaccine mit der Menschenblatter, sondern auch vielfach in dem Sinne gebraucht, um eine bestimmte Art der Vaccine näher zu bezeichnen, nämlich als solche, die durch absichtliche künstliche Übertragung von Variolavirus auf das Rind (die sog. Variolation) erzeugt worden ist.

Der flüssige Inhalt der tierischen Kuhpocke wird kurzweg Tierlymphe oder animale Vaccine genannt im Gegensatz zum Inhalt der auf den Menschen durch perkutane Impfung übertragenen „humanisierten Kuhpocke", die man kurzweg als Menschenlymphe oder humanisierte Lymphe bezeichnet. Die humanisierte Kuhpocke heißt auch Schutzpocke.

Unter Equine versteht man sowohl den Lokaleffekt nach erfolgreicher Überimpfung animaler oder humanisierter Vaccine auf das Pferd, als auch den flüssigen Inhalt dieser Pferdepocken.

Ähnliches gilt auch von der Lapine, dem Produkte der Vaccinierung von Kaninchen.

Die Mauketheorie wurde zum Gegenstande lebhafter Angriffe. Jenner jedoch hielt sie aufrecht und sprach seine volle Überzeugung von der Bedeutung seiner Wahrnehmungen schon im Jahre 1780 seinem Freunde Gardner aus. Im Jahre 1787 eröffnete er seinem Neffen Georg Jenner seine Gedanken über die Beziehungen zwischen Pferde- und Kuhpocken. Im Jahre 1801 hat Lay als Erster nach vielen Mißerfolgen den experimentellen Nachweis von der Übertragbarkeit der Pferdepocken auf Kühe erbracht. Die zahlreichen Mißerfolge späterer Experimentatoren sollen daher rühren, daß man die echten Pferdepocken (horse-pox), welche einen generalisierten Bläschenausschlag an den Fesselgelenken darstellen, mit der Mauke, einer phlegmonösen Entzündung in der Gegend der Fesselgelenke, verwechselt hat. Erst im Jahre 1860 hat Bouley den von Lay als generalisierte Grease beschriebenen Ausschlag beim Pferde als Horsepox von der phlegmonösen Mauke wieder abgegrenzt. Nach der gültigen Auffassung sind also die Pferdepocken (variola equina, horse-pox) durch zufällige Verschleppung von Kuhpockeninhalt auf die exkoriierte Haut des Pferdes

entstandene Vaccineefloreszenzen, deren Inhalt man zum Unterschiede von der eigentlichen Vaccine Equine nennt. Durch Rückübertragung von pockenkranken Pferden können selbstverständlich wieder Rinder infiziert werden, bei denen dann legitime Vaccinebläschen entstehen. Solche wechselseitig zustande gekommene, durch gemeinschaftliches Wartepersonal vermittelte Infektionen sind in der Tat wiederholt beobachtet und in der älteren Impfliteratur beschrieben worden.

Die Übertragungsmöglichkeit von menschlichem Variolavirus auf Pferde ist durch Infektionsversuche unzweideutig erwiesen worden.

Humanisierte und animale Vaccine haftet auf der Pferdehaut sehr leicht. Die Differenz gegenüber der Rinderpocke besteht in der langsameren Reifung, wobei die Pocke an Größe zurückbleibt, keine Delle und reichlicheren Serumgehalt aufweist und schließlich in der eigenartigen Krustenbildung. Durch Rückimpfung auf Rinder liefert die Equine kleine jedoch charakteristische Kuhpocken, ebenso bei der Überimpfung auf Kinder. Rückimpfungen auf Pferde und Kühe geben die gleichen Resultate.

Der strikte Beweis der Herkunft der Vaccine oder Equine von der menschlichen Variola kann nur durch Variolation, d. h. durch eine absichtliche, von positivem Erfolge begleitete Übertragung von Variolavirus auf hiefür empfängliche Tiergattungen, wozu insbesondere das Rind und das Pferd zählen, geliefert werden.

Die Streitfrage, ob die Variola und die Vaccine zwei von einander vollständig verschiedene Affektionen darstellen oder gemeinsamen Ursprunges seien und nur infolge des Wechsels des Bodens gewisse Veränderungen ihres ursprünglichen Charakters angenommen haben, ist mehr als ein Jahrhundert alt.

Der experimentelle Nachweis hierfür ist jedoch nicht einfach zu führen, da die Haftung der Variolalymphe auf einem fremden Boden nicht so leicht gelingt wie jene der humanisierten Lymphe. Es bedarf einer ganzen Reihe von besonders günstigen Umständen, so z. B. einer besonders sorgfältigen Wahl des Aussaatmaterials und einer von den gewöhnlichen Impfmethoden ganz abweichenden Technik, um zu dem gewünschten Ziele zu gelangen. Dies ist auch der Hauptgrund der in der älteren Impfliteratur zahlreich verzeichneten Mißerfolge, denen nur eine Minderzahl gelungener Inokulationsversuche gegenüberstehen. Diese Divergenz der von den verschiedenen Autoren erzielten Resultate war es auch, die in der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts zu leidenschaftlichen Diskussionen und zeitweilig zu äußerst stürmischen Debatten in den angesehensten wissenschaftlichen Körperschaften Frankreichs Veranlassung gab.

Die zufällig aufgefundenen, sog. spontanen oder „originären" Cow-pox sind ein so seltenes Ereignis, daß sie als Ausgangsmaterial für eine Weiterimpfung eine sehr unsichere Lymphequelle darstellen. Wohl in der Voraussicht der drohenden Unmöglichkeit, bei dem Mangel von regelmäßig zur Verfügung stehenden sogen. originären Kuhpocken die Impfungen in ununterbrochener Reihe fortsetzen zu können, eine Lage, in der sich Jenner wohl selbst einmal befunden haben mochte, unternahm es dieser, die Kuhpocken am menschlichen Organismus fortzupflanzen und erfand so die Impfung von Arm zu Arm, die sogenannten „Jennersche Methode" der Kuhpockenimpfung.

Man warf jedoch dieser Methode vor, daß sie das kostbare Virus vor einer progressiven Degeneration nicht bewahre und die Gefahr heraufbeschwöre, dasselbe im geeigneten Momente nicht erneuern zu können, wenn gerade originäre Kuhpocken nicht auffindbar wären.

Diese Erwägungen waren es auch hauptsächlich, welche in Verbindung mit der immer klarer werdenden Einsicht von der hygienisch nicht einwandsfreien Beschaffenheit des aus der menschlichen Vaccineblatter entnommenen Impfstoffes, der sogenannten humanisierten Lymphe, zur Praxis der ununterbrochenen Kultur des vaccinalen Virus auf tierischem Boden, der sogenannten animalen Vaccination führten.

Die erste Mitteilung über eine gelungene Variolation von Kühen findet sich in der Salzburger med. chirurg. Zeitung 1807. Der bayerische Landgerichtsarzt Gassner in Günsburg hatte bei 11 Kühen mit Menschenpockenlymphe positiven Impferfolg und erhielt bei der Weiterimpfung auf Kinder echte Vaccinebläschen. Ihm folgten Neumann in Utrecht und Billing in Stockholm im Jahre 1825, Mac Phail in Baltimore 1832, Mac Pherson in Indien 1836. Zur selben Zeit soll es Sunderland in Barmen gelungen sein, Variola auf die Weise auf eine Kuh übertragen zu haben, daß er ihren Kopf in wollene Decken einhüllte, die vorher Blatternkranke benutzt hatten. Hierauf kommen die ausgedehnteren, exakteren und darum entschieden überzeugenden Übertragungsversuche von Ceely in Aylesbury, Thiele in Kasan (1839), Badcock in Brighton (1840), Adamus und Waltham, Putmann (1852) und Senfft (1871). Es würde zu weit führen, wollte man die von den genannten Forschern angewendeten Übertragungsmethoden ausführlich beschreiben. Es sei diesbezüglich nur erwähnt, daß einige dieser Versuche nur zum Teil gelangen, während andere, so die von Ceely, Thiele und Badcock von vollständigem Erfolge gekrönt waren. Diese Autoren erhielten wohl charakterisierte Eruptionen beim Rinde, die identische Merkmale mit der regulären Vaccine aufwiesen und auf den Menschen überimpft, vollständig legitime Vaccinebläschen lieferten, wie man sie sonst zu sehen gewohnt war. Die genannten Experimentatoren benutzten selbst durch eine Reihe von Jahren das Produkt ihrer Kulturen für Kinderimpfungen und nahmen mehrere Tausende von Vaccinationen damit vor, ohne jemals gefährliche Erscheinungen beobachtet zu haben, die darauf hätten schließen lassen, daß das eingeimpfte Virus von menschlicher Variola stamme oder daß es bei der Rückkehr auf den Mutterboden auch nur andeutungsweise die Tendenz zeige, seine ursprüngliche Bösartigkeit wiederzugewinnen.

Die Veröffentlichung der Arbeiten der genannten Autoren schied die damalige ärztliche Welt in zwei feindliche Lager: in die Anhänger der Identität beider Affektionen, die sogenannten Unicisten und in die Gegner dieser Theorie, die Dualisten.

Da war es nun die Société des sciences médicales in Lyon, die im Jahre 1865 über Antrag ihres angesehenen Präsidenten M. Chauveau an die verantwortliche Aufgabe herantrat, das strittige Problem durch anschauliche Versuche der Lösung zuzuführen und so eine Streitfrage aus der Welt zu schaffen, die die Geister so lange Zeit erregt und in lebhafter Weise beschäftigt hatte.

Die ad hoc zusammengesetzte Kommission gelangte nach sehr mühevollen Versuchen zu nachfolgenden Schlußfolgerungen:

1. Das Variolavirus kann mit gleicher Sicherheit der Haftung dem Rinde und dem Pferde inokuliert werden.

2. Die durch beide Virusarten (Variola und Vaccine) erzeugten lokalen Inokulationseffekte sind voneinander absolut verschieden.

3. und 4. Die Variola und die Vaccine besitzen ein Immunisierungsvermögen gegen die Variolainfektion von gleicher Stärke.

5. Die methodisch kultivierte, d. h. von Rind auf Rind oder von Pferd auf Pferd fortgeimpfte Variola nähert sich keineswegs der Vaccineeruption, sondern bleibt stets was sie war, oder erlischt gänzlich.

6. Auf den Menschen rückübertragen, ruft sie wieder nur Variola hervor.

7. Vom Menschen wiederum auf das Rind oder Pferd überimpft, ruft sie auch bei dieser zweiten Invasion niemals cow-pox oder horsepox hervor.

8. Trotz des zweifellosen engen Bandes, das diese beiden Affektionen umschlingt, sind diese nichts desto weniger voneinander vollkommen unabhängig und keine von ihnen kann für die andere eintreten oder sich wechselseitig umwandeln.

Diese auf experimentellen Grundlagen der Lyoner Kommission beruhenden Thesen schienen das Verdammungsurteil der Identitätstheorie zu bedeuten.

Noch heutigen Tages gelten diese Lyoner Thesen im großen und ganzen für die dualistische Schule als unanfechtbar, der die überwiegende Mehrzahl der französischen Ärzte angehört.

Erst 1881 meldete Voigt in Hamburg, daß es ihm nach einigen mißglückten Versuchen gelungen sei, auf eine bestimmte Weise Variolavirus in echte Vaccine umzuwandeln. Er verwendete nämlich zu seinen Inokulationsversuchen Saugkälber und gab an, daß er diese „Variolavaccine" habe bis zur 20. Generation fortzüchten können. In einer späteren Arbeit berichtete Voigt, mit demselben Stamme und auf demselben Boden bis zur 80. Passage gelangt zu sein. Auch habe er mit dem Produkte seiner Kulturen zahlreiche Menschenimpfungen vorgenommen, ohne daß hierbei irgend eine Unzukömmlichkeit oder eine Tendenz zur Virulenzsteigerung bei der Fortimpfung von Arm zu Arm sich gezeigt hätte. Alle Impfungen hätten den Charakter einer „klassischen" Vaccine getragen.

Hierauf folgten die aufsehenerregenden Mitteilungen Fischers in Karlsruhe über zwei gelungene Rindervariolationen im Jahre 1886 und 1890, die insofern eine besondere Bedeutung für sich beanspruchen können, als sie unter Umständen erfolgten, die Chauveau als unbedingte Voraussetzung einer zwingenden Beweiskraft forderte, nämlich den Ausschluß jeder Möglichkeit einer mitunterlaufenen zufälligen vaccinalen Verunreinigung des Impffeldes, wie dies bei der Vornahme der Versuche in Impfanstalten immerhin im Bereiche der Möglichkeit gelegen sei. Beide Inokulationen Fischers waren von vollständigem Erfolge gekrönt. Fischer glaubt, den Schlüssel zu diesem Erfolge, der anderen Experimentatoren vor ihm so häufig versagt blieb, darin gefunden zu haben, daß der Pockeninhalt frühzeitiger als man dies dahin getan hatte, entnommen und zur Variolation verwendet worden sei. Weiter habe er nicht bloß den flüssigen Inhalt aus den Blattern der Pockenkranken, sondern die ganzen Pocken samt dem Boden ausgeschabt und, mit etwas Glyzerin vermischt, zu den Inokulationen benutzt. Endlich habe er bei seinen Versuchen möglichst große Kontaktflächen durch Anlegen größerer Impfschnitte als sie gewöhnlich üblich seien, durch Kreuzschnitte und Skarifikationen angestrebt und möglichst sorgfältig und energisch das fein verriebene Pockenmaterial in die Impfstellen eingestrichen. Die Stichmethode, die in Frankreich noch allgemein geübt werde, ließ er bei seinen Inokulationen ganz bei Seite, weil er ihr in Anbetracht der negativ ausgefallenen Versuche Chauveaus und der der Lyoner Kommission mißtraute. Fischer ist also bei seinen Versuchen wesentlich anders verfahren als Chauveau und er schreibt auch diesem eigenartigen Vorgehen seine günstigen Erfolge zu.

Prof. Eternod und Haccius nahmen im Jahre 1891 die Versuche der Lyoner Kommission bezw. jene von Voigt und Fischer wieder auf und verwendeten hiezu sowohl junge Tiere (Saugkälber) als auch erwachsene Rinder, um unter denselben Bedingungen zu arbeiten, wie die Lyoner Kommission. Ebenso wie Voigt, Fischer und Hime kamen auch diese beiden Forscher zu Resultaten, die mit jenen der Lyoner Kommission in diametralem Gegensatz standen. Zur Vervollständigung der Aufzählung jener Forscher, die mehr oder minder gelungene Variolationen von Rindern ausgeführt haben, wobei allerdings nur einige dieser Versuche als beweiskräftig zu betrachten sind, seien folgende Autoren angeführt:

Simpson in Kalkutta, Copeman in London (1892), Jubel-Rénoy und Dupuy in Aubervilliers (1894); Ausset und Barret in Limoges; Layet und Le Dantec in Bordeaux (1904). Chaumier in Tours (1901) hat die Variolation eines Esels mit Benutzung großer Kontaktflächen vorgenommen und vollen Haftungserfolg erzielt. Er erhielt Effloreszenzen von durchaus charakteristischer Form, von denen er genügend reichliches Material zur animalen Weiterimpfung gewinnen konnte. Die Weiterzüchtung auf Rindern war ihm damals bis zur fünfzehnten Passage gelungen. Chaumier verwendet, ebenso wie seine Kollegen in Deutschland, das Produkt dieser Kulturen zu Kinderimpfungen und bezeichnet die damit erzielten Erfolge in allen Punkten als identisch mit jenen, die in Deutschland, Rußland, England und der Schweiz beobachtet worden sind.

Die positiven Resultate von Voigt, Fischer, Hime, Eternod und Haccius nahm Chauveau verwunderlicher Weise abermals zum Anlasse, die Beweisführung seiner Gegner anzuzweifeln und der Akademie seine Ansichten und seinen Standpunkt in der Interpretation der Transformations- und Attenuationstheorie von neuem darzulegen (in den Sitzungen vom 20. und 27. Oktober 1891). Chauveau, als Wortführer der französischen Dualisten, bestreitet dem Variolavirus, das er als „Virus fort“ bezeichnet, die Fähigkeit, sich in ein anderes Virus fort umwandeln zu können, als das auch die Vaccine angesehen werden müssen. Die Möglichkeit der Umwandlung eines Virus fort in ein anderes sei mit den gegenwärtig gültigen biologischen Gesetzen unvereinbar und man könne die Vaccine auch nicht als ein abgeschwächtes Variolavirus (Virus variolique atténué) anerkennen, da sie eine wohl abgegrenzte Spezifität besitze, die in nichts eine derartige Annahme gerechtfertigt erscheinen lasse. Nach Chauveau sind also beide Virusarten absolut autonom und er beharrt auf dieser seiner Meinung trotz aller positiven Resultate, welche die Tatsache einer solchen Transformation aufs klarste beweisen. In neuerer Zeit sind Freyer in Stettin (1895), Meder (1898), Blezinger in Cannstatt (1903), Stumpf in München (1899, 1900 und 1906), Chaumier in Tours (1903) Rindervariolationen bezw. Umzüchtungen von Variola in Vaccine zweifellos gelungen. Die Versuche Meders und Stumpfs sind dadurch besonders bemerkenswert, daß diese beiden Autoren die Variolavaccine bereits in der zweiten Propagation zu Menschenimpfungen mit durchaus regelmäßiger streng lokalisierter Pustelentwickelung verwendet haben*).

Der gegenwärtige Stand unserer Kenntnisse dieser fundamentalen Frage erscheint in den von Haccius in seiner viel bemerkten „Antwort

---

*) Die Publikationen Chaumiers waren neuerdings Gegenstand einer Verhandlung in der Académie de médecine in Paris.

an Professor CHAUVEAU" formulierten Schlußsätzen (conclusions générales) klar präzisiert, so daß sie in extenso an dieser Stelle Platz finden mögen:

1. Die Variola ist auf das Rindergeschlecht unfehlbar sicher übertragbar, wenn die Operationsmethode gut und das zu inokulierende Variolavirus zur richtigen Zeit von einem Variolakranken entnommen worden ist.

2. Einem Rinde inokuliert und durch mehrere Generationen (Passagen) auf derselben Tierart fortgepflanzt, ändert die Variola ihren individuellen Charakter und macht einer Eruption Platz, die alle Merkmale einer regulären Vaccine, sowohl was das anatomische als auch das klinische Bild betrifft: die Variola wird zur Variolavaccine.

3. Menschen und Rindern eingeimpft, verhält sich die Variola-Vaccine identisch wie die gewöhnliche Vaccine: sie ruft eine gutartige, rein lokale Eruption hervor, welche dieselben Charaktere darbietet und denselben Verlauf nimmt wie eine rein vaccinale Eruption.

4. Diese Einverleibung (Inokulation) verleiht dem Menschen, wie dem Tiere mit Sicherheit Immunität gegen die gewöhnliche Vaccination und aller Wahrscheinlichkeit nach auch gegen die Blatternansteckung.

5. Der Virulenzgrad der künstlich gezüchteten Variolavaccine wechselt sicherlich mit der Zahl der Propagationen auf dem Rinde.

6. Erst Zeit und Erfahrung können über die Stärke und die Dauer der dadurch verliehenen Immunität sowie über den praktischen Wert der Impfungen mit Variolavaccine Klarheit verschaffen.

7. Bei dem gegenwärtigen Stande unserer Kenntnisse ist es schwer, zu entscheiden, ob die Variola bei dem Übergange vom Menschen auf das Tier eine einfache Abschwächung (Atténuation) oder eine Umwandlung (Transformation) erfährt, um zur Variolavaccine zu werden.

Bezüglich der einzuschlagenden Inokulationsmethodik bei der Variolisierung von Rindern sei im allgemeinen bemerkt, daß größere Kontaktflächen als bei der Vaccination erforderlich sind, um Haftung zu erzielen. HACCIUS empfiehlt das Wundreiben größerer Hautflächen mittels Glaspapier und intensives Einreiben möglichst frischer Variolalymphe, welche nicht nur die flüssigen Bestandteile der Blatternpustel, sondern auch Gewebselemente derselben enthalten müsse. Am besten sei es, wie dies bereits FISCHER geraten habe, die ganze Pocke mittels einer Kürette abzuschaben und mit etwas Glyzerin zu einer feinen Emulsion zu verreiben. VOIGT empfiehlt auch Pockenborken mitzuverreiben.

Die unleugbaren Schwierigkeiten, mit dem Inhalte der natürlichen Menschenpocke bei Rinderimpfungen Haftung zu erzielen, ließ schon in den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts den Gedanken reifen, die Inokulationsblatter (nach Variolation) zu Kälberimpfungen zu verwenden. Da gegenwärtig jedoch die Variolation des Menschen als ein unerlaubter Eingriff angesehen werden muß, hat man den Versuch unternommen, Affen zu variolisieren und den Inhalt der erzielten Inokulationspustel als Material zur Variolation der Rinder zu verwenden.

EILERTS DE HAAN in Batavia, MONCKTON und COPEMAN in London haben auf diese Weise Variolavaccine erhalten.

EILERTS DE HAAN pflanzte die Lymphe von Affe zu Affe durch 6—7 Propagationen fort, übertrug sie dann auf zwei Kälber und erhielt so bei diesen reguläre Vaccinepusteln. Er hebt hierbei besonders hervor, daß bei den Affen die Inokulationspusteln erst nach sieben Tagen das charakteristische Aussehen erhalten, das sie bei Kälberimpfungen bereits nach fünf Tagen zeigen. Eine Weiterimpfung dieser bei Kälbern erhaltenen oder in den weiteren Propagationen bei Affen fortgezüchteter Vaccine auf Menschen hat DE HAAN nicht gewagt.

Im Jahre 1905 publizierte Voigt in Hamburg seine gelungenen Umzüchtungsversuche durch Variolisierung von Kaninchen, ähnlich wie dies Calmette und Guérin in Lille bereits vorher mit positivem Erfolge bei der Weiterimpfung solcher Kaninchenlymphe auf Kälber versucht hatten. Bei einigen dieser variolisierten Kaninchen entstanden an den Inokulationsstellen 2—3 Tage nach der Variolation deutliche Papeln. Voigt hält die Papel für die höchste Entwicklungsstufe des Lokalaffektes sowohl der Variola als auch der Vaccine beim Kaninchen. Für derlei Versuche empfiehlt Voigt junge Tiere zu wählen, weil diese besonders handlich seien und eine zarte Haut besitzen. Voigt gelang es, durch diese Einschiebung von Kaninchen neue Variolavaccinestämme zu züchten. Aus seinen Versuchen zieht Voigt folgende Schlüsse:

1. Pockenborken sind ein für die Gewinnung von Variolavaccine wertvolles Inokulationsmaterial, das in Verbindung mit dem flüssigen Pockeninhalt und dem Pockengewebe zur Inokulation der Versuchstiere benützt werden soll.

2. Behufs Umzüchtung der Variola in Vaccine kann man Kaninchen mit einiger Aussicht auf Erfolg als Zwischenträger benützen.

Als in den 30er Jahren des vorigen Jahrhunderts die Blattern trotz der Impfung fast überall wieder erschienen, allerdings bei den Geimpften in milderer Form als bei den Ungeimpften, und man erkannte, daß die Vaccination die Empfänglichkeit für die Menschenpocken nicht ganz zu tilgen vermag, schob man die Schuld dieser unvollkommenen Schutzkraft zunächst auf eine Entartung oder Abschwächung der von Mensch zu Mensch zu lange Zeit ununterbrochen fortgepflanzten Schutzpocke. Man suchte darum die sogenannten „natürlichen oder originären“ Kuhpocken auf, überimpfte Variola und Pferdemauke auf Kühe und impfte endlich auch die menschliche Vaccine zurück auf die Kuh, um die Schutzpocke wieder aufzufrischen, ihre Schutzkraft zu verstärken und sie von etwa durch die lang fortgesetzte Weiterimpfung am Menschen beigemengten „dyskrasischen“ Stoffen zu befreien oder wie man sich ausdrückte, zu regenerieren und zu purifizieren. In dieser Art ist damals überall die animale Vaccination betrieben worden. Erst im vierten Jahrzehnt des vorigen Jahrhunderts brach sich die Erkenntnis Bahn, daß die Wiederkehr der Pockenepidemien nicht in einer Degeneration des wirksamen Agens der Schutzpockenlymphe, sondern in der relativen Vergänglichkeit des Impfschutzes liege, daß also zur Aufrechterhaltung der vollen Blatternimmunität eine Wiederholung der Impfung nach längerer Zeit, d. i. eine Revaccination notwendig sei. Die erwiesene Unzulänglichkeit des Schutzes der einmaligen Impfung auf der einen Seite, die Unzulänglichkeit der Quantität und Qualität des humanisierten Impfstoffes für öffentliche Impfzwecke auf der anderen, dessen Bedenklichkeit immer mehr zutage trat, die sich progressiv steigernde Schwierigkeit der Beschaffung desselben riefen eine umfangreiche Bewegung gegen die Impfung überhaupt und speziell in Deutschland gegen den Impfzwang hervor.

Infolge der durch die neue Sachlage geschaffenen gesteigerten Ansprüche an die Beschaffung hinreichender Mengen einwandfreien Impfstoffes, wendete man sich wiederum der animalen Impfung zu, aber diesmal nicht in der Absicht, um den Impfstoff zu regenerieren, sondern vielmehr um ihn zu multiplizieren, d. i. zu vervielfältigen.

Die Rückimpfung der humanisierten Lymphe auf Kühe, das sogenannte Retrovaccinationsverfahren ist schon zu Jenners Zeiten

mehrfach versucht worden, denn schon JENNER und AIKIN vermeinten, daß die Vaccine auf dem Menschen schwächer werde und empfahlen, dieselbe möglichst oft wieder „von der Quelle zu nehmen".

Zunächst waren es wohl Erwägungen rein wissenschaftlicher Natur, welche Männer wie WOODWILLE, COLEMAN, VALENTIN, FRANK, FOX, BOUSQUET, CEELY und viele andere veranlaßten. die Reproduktion der humanisierten Vaccine auf Kühen zu versuchen. Andere, so insbesondere SACCO (1805), der als Impfapostel in Italien in acht Jahren gegen eine halbe Million Vaccinationen ausgeführt hatte (Jenneri aemulum nennen ihn seine Verehrer in Bologna auf einer ihm zu Ehren geprägten Denkmünze) ebenso JUNKER, PRINZ (1838), DE CARRO, ZÖHRER, OSIANDER, BREMER u. a. bedienten sich desselben, um die Vaccine lebenskräftig zu erhalten. In Italien war man auch in der Folge bei deranimalen Vaccination geblieben, während sie im übrigen Europa in Vergessenheit geriet.

Nur zum Zwecke der bereits erwähnten vermeintlichen Purifikation und Regeneration oder Auffrischung der Vaccine bediente man sich der Rückimpfung, der sogenannten Retrovaccination. Dies geschah auf folgende Weise: Man impfte Kühe direkt von der am Kinderarme eröffneten Schutzpocke und von der entwickelten Rinderschutzpocke direkt wieder Kinder. Die Retrovaccine selbst verwendete man jedoch nicht, wie dies erst viel später geschah, sondern bediente sich dieser Kinder als Lymphespender (Stammimpflinge, Impfkönige) zur direkten Weiterimpfung von Arm zu Arm oder ließ die aus den vorher angestochenen Schutzpocken hervorquellende Lymphe, die „regenerierte Vaccine" an Elfenbeinspatel antrocknen oder füllte sie in feine Kapillarröhrchen, die man beiderseits an der Spiritusflamme zuschmolz oder mit Siegellack verschloß. Die auf letzterwähnte Art konservierte humanisierte Lymphe wurde nun an die Impfärzte abgegeben, die damit zunächst einige besonders zu diesem Zwecke ausgewählte Kinder, die sogenannten „Impfkönige" impften und diese dann zur Weiterimpfung von Arm zu Arm als Stammimpflinge benutzten. In ausgedehnter und methodischer Weise hat dieses auf der Retrovaccination beruhende Lympheregenerationsverfahren der Münchener Zentralimpfarzt REITER (1830) geübt, nach ihm Dr. UNGER in St. Florian in Steiermark (1840), Dr. MUNK in Wischau in Mähren (1856) und Dr. LOWY in Wien (1858). Die erwähnten österreichischen Ärzte besaßen teils vom Staate teils vom Lande subventionierte Regenerierungsanstalten.

An dieser Stelle muß etwas eingehender der sogenannten Degeneration der humanisierten Lymphe gedacht werden, da ja die Annahme einer solchen den unmittelbaren Anstoß zur Inangriffnahme der animalen Vaccination gegeben hat. Die Literatur über die Degeneration der JENNERschen humanisierten Vaccine ist eine unheimlich große. Sie schwoll insbesondere zu einer Zeit (15—20 Jahre nach Einführung der Impfung) an, als, wie bereits früher erwähnt wurde, der Dauerschutz der Impfung für Lebenszeit sich als unzutreffend erwies und die Ursache hiefür in einer Abschwächung der Vaccine gesucht wurde. JENNERS Autorität, der ja bekanntlich an der Annahme von der Dauerhaftigkeit der vaccinalen Immunität bis an sein Lebensende festhielt, war in dieser Hinsicht damals noch unerschüttert. So behauptete KINGLAKE (1814), MAYER (1817) und BRISSET (1818), daß die JENNERschen Bläschen kleiner, die Areola schwächer, die Narben oberflächlicher geworden seien, wie vordem. BRISSET verlangte daher, mit Rücksicht auf diesen Umstand und auf das damals schon beobachtete Befallenwerden

geimpfter Personen von Blattern, eine Auffrischung der Vaccine und eine Reinigung derselben von den durch die fortgesetzte Humanisierung erhaltenen Eigenschaften bzw. die Beseitigung ihrer „Verschmutzung".

Im Jahre 1838 hat die Academie royale des sciences de France einen Preis ausgeschrieben behufs Untersuchung der vielfach behaupteten Degeneration des Impfstoffes. Im Jahre 1845 ist dieser Preis an die Doktoren Bousquet, Fiard und Steinbrenner verteilt worden. Alle drei Autoren sprachen sich für die Existenz einer Abschwächung der Vaccine aus. Ihren diesbezüglichen Untersuchungen legten sie als Vergleichsobjekte mit dem alten Impfstoffe die am 22. März 1836 in Passy entdeckte und von der Hand der Frau Fleury entnommene junge Cow-pox-Lymphe zugrunde. Diese neue Passylymphe gab angeblich rascher die lokalen Lebenszeichen an die Impfstelle und verlief langsamer als die alte humanisierte. Bousquet sagt, zwischen der alten humanisierten Vaccine und dem neuen Passystamm sei ein Unterschied gewesen, wie zwischen Variola confluens und Variola discreta oder zwischen Variola und Varioloiden. Also in der Langlebigkeit der Schutzblatter erblickte man ihre Stärke. Daß die Deutung dieses Symptomes jedoch nicht ganz zutreffend ist, dafür bietet das Verhalten der durch langes Lagern abgeschwächten, jedoch noch wirksamen animalen Vaccine einen deutlichen Beweis. Man kann häufig genug beobachten, daß bei Verimpfung animaler Vaccine, die aus irgend einer äußeren Ursache (z. B. zu lange Lagerung, zu starke Verdünnung, Aufbewahrung bei nicht entsprechender Temperatur usw.) eine Abschwächung ihrer spezifischen Virulenz erfahren hat, die Pockenentwicklung einen retardierten Verlauf nimmt, hingegen der Rückbildungsprozeß viel rascher abläuft, wobei auch die lokalen und allgemeinen Reaktionserscheinungen (Reaktionszonen und Reaktionsfieber) viel schwächer sind als bei vollvirulenter Vaccine.

Wäre die aus inneren Ursachen allmählich fortschreitende Degeneration der Vaccine eine bewiesene Tatsache, so bestünde allerdings das dringende Bedürfnis, Mittel und Wege ausfindig zu machen, ihre ursprüngliche Beschaffenheit wieder herzustellen, da ja nur hiedurch die volle Gewähr für die ausreichende Intensität und Dauer des Impfschutzes geboten wäre.

Daß es mit der infolge der ununterbrochenen Fortzüchtung am Menschen angeblich sich geltend machenden Degeneration der Vaccine seine guten Wege haben müsse, dafür spricht die Tatsache, daß in den Findelanstalten in Moskau, Petersburg und Wien die unveränderte Erhaltung des Jennerschen Bläschens durch die dokumentarisch sichergestellte ununterbrochene Fortimpfung von Arm zu Arm durch viele Tausende von Passagen bis auf unsere Zeit gelungen ist, ohne daß der Komplex der lokalen und allgemeinen Erscheinungen irgend welche Abweichung von jenem dargeboten hätte, der uns durch Wort und Bild von Jenner selbst überliefert worden ist.

Die Geschichte der „alten Jennerschen Genitur", wie der altberühmte, seit Anfang des vorigen Jahrhunderts in der Wiener Findelanstalt in ununterbrochener Reihenfolge von Arm zu Arm fortgepflanzte Lymphestamm genannt wurde, bietet nicht nur ein lokales, sondern ein eminent allgemeines Interesse, da sie geeignet erscheint, auf die überaus wichtige Rolle, die gerade die humanisierte Lymphe, das ist der flüssige Inhalt der menschlichen Schutzpocke, als Ausgangsmaterial bei der tierischen Impfung spielt, ein helles Licht zu werfen. Das zweifellos feststehende Gelingen der ein volles Jahrhundert umfassenden ununterbrochenen Fortpflanzung ein und desselben Lymphestammes, wobei der

Charakter des JENNERschen Bläschens unverändert geblieben ist, bildet eine Tatsache von fundamentaler Bedeutung.

Durch die weitere Tatsache, daß diese JENNERsche Genitur der Wiener Findelanstalt der Wiener Staatsimpfanstalt seit ihrer Gründung im Jahre 1893 die ausschließlich verwendete Ausgangslymphe geliefert hat, die durch keine andere von gleicher Güte ersetzt werden konnte, erscheint auch die uralte Streitfrage über die Entartung der lange Zeit von Arm zu Arm fortgeleiteten Vaccine unwiderleglich und endgiltig in negativem Sinne entschieden.

Als weitere notwendige Konsequenz ergibt sich hieraus für die animale Impfpraxis die unabweisbare Notwendigkeit, nur eine solche Ausgangslymphe zu wählen, die in gleich verläßlicher Weise zum mindesten identische Resultate zeitigt, wie sie mit dem Virus des zweifellos echten JENNERschen Bläschens fortdauernd erzielt werden können.

Der alte JENNERsche Lymphestamm der Wiener Findelanstalt rührt noch von jener Lymphe her, die am 10. Mai 1799, also noch vor der im Jahre 1802 erfolgten Gründung des mit der Wiener Findelanstalt, die damals noch ein Staatsinstitut war, verbundenen k. k. Schutzpocken-Hauptinstituts, von PEARSON in London übersendet worden war.

In Wien stand man der Streitfrage über die angebliche Degeneration der lange Zeit von Arm zu Arm fortgeleiteten Vaccine auch nicht teilnahmslos gegenüber, sondern suchte sich darüber durch Retrovaccinationsversuche, die ZÖHRER und später auch FRIEDINGER in sorgfältiger und einwandfreier Weise selbst vorgenommen hatten, Klarheit zu verschaffen.

ZÖHRER ging hierbei jedoch nicht von der Tendenz aus, die viele andere Experimentatoren leitete, einen „kräftigen Impfkeim“ zu gewinnen, sondern er suchte die unverändert gute Beschaffenheit des alten JENNERschen Lymphestammes zu erproben, d. h. durch Vergleich mit den neuen Genituren die Bestätigung zu erhalten, daß die Vaccinelymphe durch fortgesetzte Impfung von Arm zu Arm in ihrer „Keimfähigkeit“ in nichts herabgekommen sei. Er legte zu diesem Zwecke zwei neue Genituren an und zwar die eine von einem in Breitensee bei Wien aufgefundenen originären Kuhpockenfall und die andere von einer in Bisamberg im Jahre 1842 von ihm selbst mit Erfolg retrovaccinierten Kuh ausgehend, die er durch eine Reihe von Jahren neben der alten JENNERschen Genitur von Arm zu Arm fortpflanzte. Auch FRIEDINGER, der nach ZÖHRERS Tode im Jahre 1852 dessen Amt übernahm, kultivierte drei Lymphegenituren.

Die alte JENNERsche Genitur, die ihren ursprünglichen Charakter unverändert beibehielt, wurde in der Absicht unverändert weitergeführt, um zum Beweise zu dienen, „daß das milde Kuhpockenkontagium, gleich den Menschenblattern und gleich der Syphilis bis ins unendliche fortpflanzbar, an seiner schützenden Kraft in bestimmter Weise durch die Fortpflanzung nichts verliert“.

Auch das auf gründliche Untersuchungen basierte Urteil der zur Prüfung der Degenerationsfrage im Jahre 1839 in Liverpool zusammengetretenen Kommission, lautete in diesem Sinne: „daß in den Eigenschaften der mit einer seit einer langen Reihe von Jahren von einem Individuum auf das andere übergegangenen JENNERschen Lymphe hervorgebrachten Schutzblattern kein Mangel entdeckt werden konnte, indem sie gleich vollkommen waren, wie die mit einer frischen Retrovaccine erzeugten“.

ZÖHRER war auf Grund seiner langjährigen Erfahrung von der Unveränderlichkeit der fortgepflanzten humanisierten Vaccine felsenfest über-

zeugt, sowohl in Beziehung auf die Hervorbringung typischer Schutzblattern als auch bezüglich ihrer Immunisierungskraft.

Die Frage, ob der Impfung unmittelbar von der Kuh eine höhere und länger andauernde Schutzwirkung zukomme, als wenn man von dem Arm eines Kindes impft, beantwortet Zöhrer dahin, daß nach seiner Erfahrung die Vaccine durch Fortpflanzung von Arm zu Arm nichts von ihrer Eigenart verloren habe, noch viel weniger degeneriert sei. Denn der Vaccineprozeß „erlösche überall, wo er entarte". Der Versuch, eine verdorbene oder abgeschwächte humanisierte Lymphe durch Rückimpfung zu kräftigen, sei von vornherein aussichtslos. Die Vaccine sterbe ab, wo sie entarte, lasse sich nicht einmal unter Kindern erhalten, noch viel weniger auf Kühe rückimpfen.

Der Ausspruch Zöhrers: „Jedenfalls ergibt sich bei der Übersicht der Quellen und des Ursprunges der Kuhpocken, daß in neuerer Zeit häufiger und sicherer sie durch Rückimpfung gewonnen worden seien", charakterisiert diesen hochverdienten Impfarzt als einen scharfen Denker.

Zöhrer sieht die Vorteile der Rückimpfung auf Kühe nur in der Erprobung der spezifischen Natur der im Gebrauche stehenden Impflymphe und in der teilweisen „Bekräftigung des Vaccineprozesses in den ersten Deszendenzen". Die gänzlich entartete Impflymphe könne durch Rückimpfung aus dem ganz einfachen Grunde nicht gereinigt oder regeneriert werden, weil sie nicht hafte. Zöhrer résumiert seine bemerkenswerten, in den Hauptpunkten huete noch vollkommen zutreffenden Erörterungen:

„Wir werden die Erhaltung und Bekräftigung des Vaccinekeimes nur dann erreichen, wenn wir immer nur von gesunden kräftigen Kindern weiter impfen, so weit es sein kann immer von Arm zu Arm, mit Ausschließung aller animalen Formen; wenn wir, was wünschenswert ist, die Kuhpocken dort, wo sie in ihrer reinen originären Natur vorkommen und wo es not tut, auf Kinder übertragen oder künstlich auf Kühe rückimpfen. Diese Rückimpfung muß früher geschehen, ehe noch der Vaccinekeim entartet, denn unkräftiger, entarteter Vaccinestoff haftet in dem gewählten Impftier nicht. Diese Meinung teilen die meisten Impfärzte. Dieses in Erinnerung zu bringen halte ich für notwendig, um uns auf den richtigen Standpunkt in der Retrovaccination zu stellen." Impffähig werden von den älteren Autoren, insbesondere von Sacco, alle Tiergattungen gehalten, bei denen der Impfstoff (humanisierte Lymphe) haftet. Zöhrer hält Kühe für die geeignetsten Impftiere. Als „Impfkeim" sei der frische, der menschlichen Kuhpocke entnommene Stoff der wirksamste, dies habe wenigstens die Praxis erwiesen. Könne man daher ein geimpftes Kind mit schönen Vaccinepusteln und zwar gerade im Stadium des Übertrittes der Lympheexsudation in Entzündung im Stalle haben, so sei dieses Verfahren unter allen das beste. Rücksichtlich der Erhaltung eines reinen Impfkeimes solle auch auf den Gesundheitszustand der Eltern der Stammimpflinge gesehen werden. In dieser Beziehung würden öffentliche, vom Staate erhaltene Entbindungs- und Verpflegungsanstalten für uneheliche Mütter und ihre Kinder für die Impfung von größtem Nutzen sein. Einmal, weil hier eine hinreichend große Zahl impffähiger Kinder vorhanden ist und dann auch, weil nicht allein auf die Gesundheit der Kinder gesehen werden kann, sondern auch eine allfällige Krankheit der Mutter durch Autopsie nachgewiesen werden könne, was in allen Privatinstituten nicht und umsoweniger in der Privatpraxis erzielt werden könne.

Ich selbst hatte noch Gelegenheit, die alte JENNERsche Genitur vor ihrer Auflassung kennen zu lernen und mich überzeugen zu können, daß sich die hiermit erzielten Schutzblattern in Form und Wesen in nichts von jenen unterschieden, die wir mit unserer, von diesem Stamme abgeleiteten Retrovaccine hervorgebracht zu sehen gewohnt sind. Nur die lokalen Reaktionserscheinungen schienen im allgemeinen etwas milder und der Verlauf des Prozesses etwas rascher zu sein, als dies bei Verwendung der animalen Vaccine der Fall zu sein pflegt. Diese Beobachtung entspricht auch der allgemeinen Erfahrung. Haben doch gerade diese stärkeren Impfreaktionen der animalen Lymphe ihre Einbürgerung in die allgemeine Impfpraxis erheblich erschwert.

Dem, von dem bereits verstorbenen Direktor der niederösterreichischen Landesfindelanstalt Dr. ERNST BRAUN, dem Nachfolger FRIEDINGERS, erstatteten Jahresberichte pro 1897, entnehme ich die Mitteilung, daß auch er zu den behufs Fortsetzung der JENNERschen Genitur vorgenommenen Impfungen sogenannte Ammenkinder verwendet hat, das sind nämlich Kinder jener Mütter, die Ammendienste in der Findelanstalt zu leisten, d. h. neben ihren eigenen noch ein oder zwei fremde Kinder, sogenannte Nebenkinder, zu säugen haben. Da solche Nebenkinder nur wenige Tage Brustnahrung erhalten und dann in Außenpflege gegeben werden, die Ammen jedoch oft mit ihrem eigenen Kinde noch wochenlang zu dem gedachten Zwecke zurückbleiben, so bilden die „Ammenkinder" ein viel tauglicheres Material zu den Impfungen als die nur wenige Tage alten Nebenkinder. Schließlich wäre noch hervorzuheben, daß nur völlig gesunde und gut entwickelte Ammenkinder zu den Impfungen von Arm zu Arm herangezogen wurden, die ebenso wie ihre Mütter sowohl vor der Impfung, als auch vor der Abimpfung ärztlich genau untersucht und während des ganzen Impfverlaufes in ärztlicher Beobachtung gehalten worden sind. Dieser sorgfältigen Auswahl der Impflinge für die Fortzucht der von ZÖHRER, FRIEDINGER und BRAUN gepflegten „JENNERschen Genitur" ist die Erhaltung derselben bis auf unsere Tage wohl in erster Linie zu verdanken. Über Initiative BRAUNS wurden mit Erlaß des niederösterreichischen Landesausschusses vom 13. Oktober 1899 die Impfung von Arm zu Arm, bzw. die Verwendung humanisierter Lymphe im Hinblick auf die seither staatlicherseits erfolgte Regelung der Beschaffung tierischen Impfstoffes für die öffentlichen Impfungen überhaupt eingestellt, wodurch das Schicksal der alten JENNERschen Genitur besiegelt schien. Glücklicherweise hatte sie jedoch schon vorher in der Wiener Staatsimpfanstalt eine neue Heim- und Kultivierungsstätte gefunden, die sie vor ihrem Untergange bewahrte. Sie ist hier in verjüngter Form und zwar in Gestalt des durch alternierende Vaccination und Retrovaccination ununterbrochen weitergezüchteten Lymphestammes der k. k. Impfstoffgewinnungsanstalt wieder erstanden.

Wenn BULMERINCQ (1865), dessen Antagonismus gegen die Verbreitung der humanisierten Lymphe aus Findelanstalten gewiß berechtigt ist, die Echtheit der JENNERschen Lymphe aus der Wiener Findelanstalt angezweifelt und die Existenz ihrer ununterbrochenen Fortpflanzung daselbst in das Reich der Fabel verwiesen hat, so entbehren die von ihm ins Treffen gebrachten Argumente nicht nur ausreichender Beweiskraft, sondern es erscheint vielmehr sein Urteil in dieser Angelegenheit durch die Leidenschaftlichkeit getrübt, mit der er seine bekannte Polemik mit FRIEDINGER geführt hat. Die Tatsache, daß zu FRIEDINGERS, wohl auch schon zu ZÖHRERS Zeiten in der Wiener Findelanstalt Kinder mit

humanisierter Lymphe auch anderer Provenienz geimpft worden sind, spricht durchaus nicht gegen die Existenz einer ununterbrochenen und ungestörten Fortführung der altehrwürdigen Jennerschen Genitur, sondern ist nur auf den großen Bedarf an Lymphe zurückzuführen, den die Findelanstalt zu Beginn jeder Impfsaison statutengemäß zu befriedigen hatte, wozu die verhältnismäßig geringe Zahl der mit dieser Genitur geimpften und als Lymphespender figurierenden Ammenkinder sehr häufig nicht ausreichte. Ist also einerseits die abfällige Kritik Bulmerincqs in dieser Beziehung als unzutreffend zu bezeichnen, so muß auch das Lob, das er der „regenerierten" Lymphe aus der im Jahre 1840 gegründeten Kuhpocken-Regenerierungsanstalt des Dr. F. Unger in St. Florian spendet, aus der „alle steiermärkischen und viele ausländischen Ärzte mit alljährlich frisch regenerierter Retrovaccinlymphe stets nur in flüssiger Form" versorgt worden sind, cum grano salis aufgenommen werden. Man darf sich jedoch keineswegs vorstellen — und wie viele der damaligen Impfärzte mögen von dieser Vorstellung befangen gewesen sein — daß diese „frisch regenerierte Retrovaccinlymphe" etwa tierischer Impfstoff gewesen sei, was sie nach dem damaligen Stande der animalen Impfung gar nicht gewesen sein konnte. Sie war eben wieder nur Kinderlymphe, die von direkt von der retrovaccinierten Kuh geimpften Kindern, bzw. von solchen Kindern stammte, die von diesen von Arm zu Arm weitergeimpft worden waren. Der einzige Unterschied von der damals allgemein gebräuchlichen, rein humanisiert fortgeführten Kinderlymphe bestand also nur darin, daß bei der regenerierten Lymphe die Reihe der fortlaufenden Vaccinationen von Arm zu Arm durch eine eingeschobene Tierimpfung (Retrovaccination) unterbrochen wurde, um eine „gekräftigte, verjüngte, regenerierte, purifizierte" Kinderlymphe zu erlangen.

Die Unmöglichkeit, beide Lymphesorten nach ihrer äußeren Beschaffenheit oder nach ihrer spezifischen Wirksamkeit voneinander zu unterscheiden, sowie der Mangel jeglicher Garantie, daß der als regenerierte Lymphe bezogene Impfstoff tatsächlich diese Bezeichnung verdiene, waren die Ursachen, daß den Regenerierungsanstalten im allgemeinen kein allzu großes Vertrauen entgegengebracht wurde und diese schließlich trotz der Subventionen seitens des Staates und des Landes nach relativ kurzem Bestande wieder eingingen.

Auf Grund der bis zur Auflassung der Jennerschen Genitur fortgeführten Impfprotokolle kann als erwiesen angenommen werden, daß dieser alte Lymphestamm der Wiener Findelanstalt tatsächlich seit dem Jahre 1797 bezw. 1802 in ununterbrochener Reihe durch Impfung von Arm zu Arm rein humanisiert erhalten worden ist und dabei keine Zeichen irgendwelcher Degeneration dargeboten hat. Die Berichte Zöhrers und Friedingers über zeitweilig vorgekommene Fehlimpfungen und Impfungsanomalien bei einer ganzen Reihe von Kindern sind keinesfalls auf degenerative Veränderungen der Vaccine, sondern einzig und allein auf individuelle Ursachen bezw. auf die Ungleichheit oder Untauglichkeit des Impflingsmateriales zurückzuführen.

Das Unternehmen, die humanisierte Lymphe durch animalen Impfstoff wegen des supponierten höheren Immunisierungswertes des letzteren ersetzen zu wollen oder ihre spezifische Virulenz durch Rückimpfung auf das Rind zu steigern, erscheint demnach ebenso verfehlt, wie sein Motiv, d. i. die Verhinderung einer Degeneration der Vaccine bzw. die Herbeiführung von kräftigeren Impfungseffekten mit weit intensiverer Immunisierungswirkung.

Nach den bisherigen Erfahrungen muß vielmehr der menschliche und nicht der tierische Organismus als der natürliche Nährboden für die Vaccine betrachtet werden.

So weit stehen wir auf dem festen Boden von klinisch und experimentell festgestellten Tatsachen. Hingegen fehlt uns vorläufig zur Sicherstellung bezw. Messung des Grades der Depotenzierung der durch lange Zeit ununterbrochen von Tier zu Tier gezüchteten animalen Vaccine eine sichere Handhabe. Das gleiche gilt für die durch äußere Umstände bedingte Abschwächung der konservierten Vaccine. Und gerade diese Feststellung wäre von eminenter Wichtigkeit für die Beantwortung der fundamentalen Frage nach dem Bedürfnisse der Anzucht neuer Lymphestämme von ursprünglicher Kraft ihrer spezifischen Virulenz.

Als Gradmesser für die supponierte Abnahme der Virulenz der gebräuchlichen animalen Lymphesorten lassen sich weder die Pockenstatistiken, noch die Revaccinationsresultate heranziehen, ganz abgesehen davon, daß die Beurteilung der letzteren der Subjektivität der Beobachtung ganz besonders freien Spielraum läßt. Wissen wir doch nicht einmal, ob die Stärke der Impfreaktion parallel mit der Intensität der Immunisierungswirkung läuft. Wenn uns aber ein hiefür verwendbares statistisches Material auch bisher fehlt, so lehrt doch der enorme Rückgang der Pockenmorbidität und Pockenmortalität in den Ländern mit geordneten Impfverhältnissen und zwar schon in einer Zeit, zu der noch ausschließlich mit humanisierter Lymphe geimpft worden ist, daß die hiedurch erzielte Immunisierung gegen die Blatternansteckung vollkommen ausreichend war. Wäre die Vaccine einer fortschreitenden Degeneration unterworfen gewesen, wie man dies bereits in den zwanziger Jahren des vorigen Jahrhunderts vielfach behauptet hat, so müßte ohne Frage trotz aller Zwangsimpfung und Wiederimpfung gerade das Gegenteil, nämlich eine Steigerung der Blatternfälle erfolgt sein. Und was den von einer Reihe von Beobachtern für die supponierte Degeneration geltend gemachten Beweis anbelangt, nämlich die seit Einführung der Vaccination allmählich in Erscheinung tretende Abschwächung der örtlichen und allgemeinen Reaktionsphänomene des Impfprozesses, so steht derselbe auf ziemlich schwachen Füßen. Wenn infolge allzu großer Verdünnung, schlechter Verwahrung, zu lange fortgesetzter Konservierung, Verschmutzung durch Fremdkeime oder dgl. schlechte Impferfolge erzielt werden, so sind diese doch nicht auf eine Degeneration der Lymphe, sondern auf eine Virulenzabschwächung aus äußeren Gründen bezw. auf die individuell schwankende vaccinale Empfänglichkeit der Impflinge zurückzuführen. Einen ebensolchen Trugschluß zieht man, wenn man die Wirkung einer durch viele Generationen beim Menschen fortgeleiteten humanisierten Lymphe neben jene einer frischen Retrovaccine stellt und die mildere Impfreaktion der ersteren als den Ausdruck einer einsetzenden Abschwächung oder Degeneration deutet, weil jede frische animale Vaccine aus später zu erörternden Gründen stärkere Reaktionserscheinungen hervorruft als humanisierte Lymphe. Aus derartigen Trugschlüssen scheint die ganze Degenerationstheorie aufgebaut zu sein. Man kann vielmehr mit Bestimmtheit behaupten, daß eine bis zur Gefährdung eines ausreichenden Impfschutzes fortschreitende Degeneration der humanisierten Vaccine niemals vorhanden war und auch niemals eintritt, sondern daß vielmehr das Vaccinekontagium eine konstant bleibende Virulenzgröße bezw. Immunisierungsfähigkeit besitzt.

Hingegen findet gewöhnlich eine Abschwächung der Vaccine bei längere Zeit ununterbrochen von Tier zu Tier fortgesetzter Weiterimpfung bis unter das Virulenzniveau der humanisierten Vaccine statt, was sich nicht allein durch allmähliche Verschlechterung des äußeren Habitus

der Tierpocke, sondern auch ihrer spezifischen Qualitäten als Impfstoff für Menschenimpfungen äußert. Dieses „Affaiblissement" hat sich auch bei den durch lange Zeit angeblich rein animal fortgezüchteten altberühmten Lymphestämmen, dem Passystamm, Beaugencystamm usw. gezeigt. Übrigens haben die aus der älteren Impfliteratur geschöpften Angaben und die daran geknüpften Folgerungen über eine mit den Jahren stetig zunehmende und schließlich den ausreichenden Impfschutz direkt in Frage stellende Depotenzierung der „rein animal" fortgeleiteten Vaccine einen sehr problematischen Wert, da es als sicher angenommen werden kann, daß zur Auffrischung solcher alterschwach gewordener Stämme eine „Durchleitung durch den Kindeskörper" ausgeführt, d. i. eine Retrovaccination eingeschoben worden ist.

Es ist begreiflich, daß man nach den üblen Erfahrungen bei der Impfung von Arm zu Arm (Übertragung von Syphilis), die humanisierte Lymphe nicht nur für Menschenimpfungen, sondern auch für die Tierimpfungen ausgeschlossen wissen wollte, um einen von der Beimengung jeglicher menschlicher Säfte freien **animalischen** Impfstoff zu erhalten.

In erster Linie wurde diese Forderung seinerzeit von der Sanitätsbehörde erhoben, obwohl damals nicht nur diese Stelle, sondern auch die Ärzteschaft im allgemeinen über die praktische Seite der Impfstoffrage höchst mangelhaft informiert war und infolgedessen über die Durchführbarkeit dieser Forderung keine richtige Vorstellung besitzen konnte. Es darf daher nicht wundernehmen, wenn die wenigen Einzelnen, die sich mit der animalen Impfung und Impfstofferzeugung, deren Technik damals noch in den Kinderschuhen stak, zu Erwerbszwecken befaßten, sich zunächst wohl bemühten, originäre Vaccine aufzusuchen und weiterzuzüchten, die als Saft ganz besonderer Art galt, und daß sie trotz der Unmöglichkeit, dieser jederzeit habhaft zu werden, die Zumutung, als würden sie sich hierbei bei allfälligem Nichtvorhandensein originärer Stammlymphe etwa gar der humanisierten Lymphe zu Retrovaccinationszwecken bedienen, mit Entrüstung von sich wiesen. Wäre doch dieses Eingeständnis gleichbedeutend gewesen mit dem Ruin ihres Geschäftsunternehmens.

Als Quellen für „originäre" Stammlymphe zu Kälberimpfungen galten damals die Impfanstalten in Brüssel, Rotterdam, Berlin und Hamburg, die sich rühmten, den Passy- und Beaugencystamm, und wie alle diese altaristokratischen Stämme heißen mögen, in gerader Deszendenz rein animal fortkultiviert zu haben. Ja die behördlichen Konzessionen zur Führung animaler Impfanstalten waren, wenigstens in Österreich, seinerzeit ausdrücklich an die Bedingung geknüpft, daß zu den Tier- und Menschenimpfungen in der Anstalt die Verwendung von humanisierter Lymphe unbedingt ausgeschlossen werde. So heißt es in einer solchen Konzessionsurkunde:

„Der Anstaltsbesitzer hat in glaubwürdiger Weise darzutun, daß die in seiner Anstalt in Verwendung kommende Anfangslymphe originäre Kuhpockenlymphe und daß in der Anstalt ausschließlich Kälberlymphe zur Impfung sowohl auf Mensch als auch auf Tiere verwendet und demnach die Verwendung humanisierter Lymphe nicht gestattet sei."

Es kann jedoch als sicher gestellt betrachtet werden, daß keines der damals bestandenen Privatimpfinstitute ohne Retrovaccinationsverfahren wenigstens einschubsweise auskommen konnte.

Man darf nach dem Vorausgeschickten die in den 60er und 70er Jahren des vorigen Jahrhunderts auf diesem Gebiete besonders üppig blühende

Geheimniskrämerei nicht so ohne weiteres verdammen, da ja durch die oben zitierten behördlichen Beschränkungen und die mangelhafte Orientierung der Ärzte auf diesem Gebiete die Besitzer derartiger animaler Impfanstalten geradezu gezwungen waren, die Wahrheit zu verschleiern. Ja es muß geradezu als ein Glück bezeichnet werden, daß zu diesem frommen Betruge gegriffen wurde, weil sonst die animale Impfung wohl schon in den Anfängen stecken geblieben wäre.

In den Anfängen der animalen Vaccination ging das Bestreben in erster Linie dahin, „spontan" auftretende „genuine" oder „originäre" Kuhpocken aufzusuchen und von diesen einen neuen Lymphestamm anzuzüchten und fortzuführen. Der Engländer Robert Ceely, Hering in Stuttgart, Prinz in Dresden, und nicht wenig andere widmeten sich besonders dem Studium der „genuinen" Kuhpocke. Das Auftreten von solchen in einer Stallung gestaltete sich zu einem ganz besonderen Ereignisse. Von weit und breit eilten die Leiter von Impfinstituten, sowie Impfärzte herbei, um sich mit dem neuen „Stoffe" zu versorgen, der als etwas ganz Spezifisches und besonders Wertvolles angesehen wurde. Welche Bedeutung man diesem „primären Virus" beimaß, geht z. B. daraus hervor, daß seinerzeit Königin Viktoria dem Impfarzte Negri in Neapel, welcher im Jahre 1840 zuerst die Vaccination von Tier zu Tier mit Erfolg versucht hat und deshalb als der Vater der animalen Vaccination bezeichnet wird, durch Vermittlung des Gesandten des Königs Ferdinand II. „originäre Kuhpockenlymphe" zum Geschenk machte und daß sich auch manche Kuhpockenendemien, die zum Ausgangspunkte von Lymphestämmen wurden, einer förmlichen Berühmtheit erfreuten, wie z. B. jene von Passy, Beaugency, Essneux usw., welche dem nach ihnen bezeichneten berühmten Lymphestamm den Namen gegeben haben.

Bollinger hat diesen Nimbus gründlich zerstört, so daß man heutzutage mit der Bezeichnung „animale Vaccine" jeden Impfstoff versteht, der von Kälbern oder größeren Rindern entnommen und zur Impfung der Kinder verwendet wird, also ebenso die Retrovaccine, als auch die von originären oder durch künstliche Variolation von Rindern erhaltene und weitergezüchtete sogenannte Variolavaccine. Die seit 1871 von L. Pfeiffer in Weimar offen und energisch vertretene Auffassung, daß ein prinzipieller Unterschied zwischen der Retrovaccine und der „rein animalen" Lymphe anderer Provenienz nicht besteht, ist in Praxi anerkannt und in neuerer Zeit hat besonders die Wiener Impfstoffgewinnungsanstalt durch konsequente und methodische Retrovaccination zur allgemeinen Anerkennung dieses allein sicheren Verfahrens zur Erzeugung eines verläßlichen Impfstoffes wesentlich beigetragen. Schon von Troja (1801), seinem Schüler Galbiati (1805) und Sacco (1809) für Impfzwecke zuerst geübt, wurde das Retrovaccinationsverfahren insbesondere durch Reiter in München (1830) methodisch ausgebildet und von Weilinger in Weimar, Unger in St. Florian, Munk in Wischau, Lowy in Wien usf. weiter verfolgt. Die Kühe wurden damals in der Regel direkt mit Lymphe aus den frisch eröffneten menschlichen Schutzblattern geimpft, zu welchem Zwecke die Kinder in den Kuhstall gebracht wurden und ebenso geschah die Impfung der Kinder im Stall direkt von der Kuh. Die hierbei sich abspielenden Vorgänge erinnern nach Schilderungen lebhaft an das bekannte Bild aus der Zeitschrift „L'Illustration" (Jahrg. 1893, Heft vom 16. Sept.), das die Straßenimpfung in Paris darstellt.

Von den im Kuhstall geimpften Kindern wurde dann nach erfolgter Pockenentwicklung Impfstoff entnommen, welcher auf Beinnadeln eingetrocknet oder in Haarröhren verfüllt auch an Impfärzte zur Verteilung kam, die ihn zur Impfung ihrer Stammimpflinge verwendeten. Behufs Versendung wurden diese „imprägnierten Beinnadeln“ in weißes Papier eingeschlagen, die „Impfphiolen“ in Holzhülsen gesteckt.

II. Die Praxis der Vaccination.

A. Allgemeines.

Merkwürdig ist die auffallende Tatsache, daß seit den 70er Jahren des vorigen Jahrhunderts die wissenschaftlichen Zentren, die vordem der Impffrage und insbesondere der Beschaffung eines verläßlichen und einwurfsfreien Impfstoffes ein lebhaftes Interesse entgegengebracht hatten, dem so überaus wichtigen technischen Teile der animalen Vaccination bis in die jüngste Zeit hinein fremd und gleichgiltig gegenüberstanden. Nur so ist es erklärlich, daß die Entwicklung der animalen Impftechnik so lange brauchte, um den heutigen Stand zu erreichen, den sie nur schrittweise und zumeist auf rein empirischem Wege erklommen hat. Erst in den letzten Jahren ist erfreulicherweise wiederum ein wachsendes Interesse und eine regere experimentelle Tätigkeit auf diesem Gebiete bemerkbar.

Für die Gewinnung des animalen Impfstoffes sind gegenwärtig folgende Methoden in Übung:

1. Die rein animale Fortzüchtung zufällig auf Kühen gefundener sogenannter genuiner oder originärer Kuhpocken (cow-pox).

2. Die rein animale Fortzüchtung der durch Variolation des Rindes erhaltenen „Variola-Vaccine“, welcher Ausdruck also gegenwärtig in einem anderen Sinne aufzufassen ist, als Jenner ihn gebraucht hat.

3. Die Rückimpfung des flüssigen Inhaltes der kindlichen Schutzblatter, der sogenannten Kinderlymphe oder humanisierten Lymphe auf das Rind, die Retrovaccination, wobei entweder schon die Lympheernte der ersten Passage (die Retrovaccine erster Generation) zu Kinderimpfungen bzw. zu Versendungszwecken verwendet oder auch noch durch einige Passagen von Tier zu Tier fortgezüchtet wird, bis deutliche Abschwächung, das sogenannte „Abreißen des Stammes“, eintritt.

4. Die ausschließliche Verwendung der Retrovaccine erster Generation als Stammlymphe zu den Tierimpfungen, wobei die Weiterimpfung von Tier zu Tier aus prinzipiellen Gründen nur bis zur zweiten, ausnahmsweise auch bis zur dritten Passage (Generation) fortgesetzt und ein neuer Stamm nur dann wieder angezüchtet wird, wenn die laufende Stammlymphenserie deutliche Zeichen einer Virulenzabschwächung zeigt. (Wiener Retrovaccinationsmethode.)

Früher wurde als „echte oder genuine animale Lymphe“ nur jene anerkannt, die ihren Ursprung auf die bereits mehrfach erwähnten, in den 60er Jahren des vorigen Jahrhunderts in Frankreich und Belgien zufällig gefundenen und später auch nach Deutschland gebrachten, berühmten, angeblich originären Cow-pox-Stämme zurückleiten konnten. Hierfür liegt jedoch eine wissenschaftlich begründete Berechtigung durchaus nicht vor und L. Pfeiffer betont mit vollem Rechte, daß die sogenannten echten Cow-pox-Stämme jeder regulären Vaccine beliebiger Provenienz in bezug auf Haftbarkeit, Schutzkraft und Impfverlauf vollständig gleichwertig seien. Demnach liegt prinzipiell auch kein Grund für eine Bevorzugung der Variolavaccine vor der Retrovaccine vor;

denn auch sie ist ebenso wie die humanisierte Vaccine . . . . Variolavaccine, wie schon JENNER die Schutzpocke bzw. ihren Inhalt genannt hat.

L. PFEIFFER in Weimar hat sich, ganz abgesehen von seinen bahnbrechenden Forschungen auf dem Gebiete der Vaccinationslehre, auch dadurch ein unvergängliches Verdienst erworben, daß er als Erster mit vollem Freimut und wohltuender Klarheit für das Retrovaccinationsverfahren als rationellste Impfmethode eingetreten ist und sie an die ihr gebührende erste Stelle gesetzt hat. Ja man kann ohne Übertreibung behaupten, daß erst von diesem Zeitpunkte an für alle Impfanstalten der Welt die feste Operationsbasis für einen rationellen Betrieb gewonnen war.

Wer je im Beginne seiner spezialimpfärztlichen Tätigkeit das mehr als zweifelhafte Vergnügen genossen hat, sich aus berufsmäßigen Gründen durch den unheimlich angeschwollenen Wust der älteren Impfliteratur durchbeißen zu müssen, um eine wissenschaftlich fundierte und verläßliche Direktive für eine rationelle Art der Impfstofferzeugung zu gewinnen, der wird bei der Lektüre der Publikationen PFEIFFERs gewiß das Gefühl einer wahren Befreiung empfunden haben. Sind doch erst durch diese Schriften die Nebelschleier gelüftet worden, die in den 60er Jahren des vorigen Jahrhunderts über dem eigentlichen Wesen der animalen Impfung und ihrer Technik lagerten. Von den damaligen Erzeugern animaler Lymphe wurde aus bereits oben angedeuteten Gründen die fundamentale Frage nach der Provenienz der Anfangs- oder Stammlymphe mit großer Unaufrichtigkeit behandelt. Selbstverständlich war es immer „originäre Kuhpockenlymphe“, die angeblich zur An- und Weiterimpfung verwendet wurde.

Von den beinahe unüberwindlichen Schwierigkeiten, sich tatsächlich in den Besitz einer zufällig gefundenen genuinen Kuhpockenlymphe setzen zu können, hatten die wenigsten Ärzte, geschweige denn das große Publikum eine richtige Vorstellung. Daß es solche gab, wurde allerdings dem Publikum laut genug verkündigt, diente jedoch nur zum Aushängeschilde, weil ja erst die Existenz dieser Schwierigkeiten den „echten“ Kuhpockenstoff zu einem so gesuchten Artikel stempelte und seinen Handelswert bestimmte. Die aus prinzipiellen Gründen geübte rein animale Fortzüchtung besitzt heute vorwiegend bloß einen historischen Wert und ist mehr oder weniger Gegenstand persönlicher Liebhaberei geworden.

Als wissenschaftlich und praktisch begründete Leitsätze für einen rationellen Vorgang bei der animalen Impfung können folgende Fundamentalsätze gelten:

1. Die Vaccine läßt sich beim Menschen von Arm zu Arm durch ungezählte Generationen (Passagen) ohne Abschwächung ihrer spezifischen Virulenz und Immunisierungsfähigkeit fortimpfen. Eine Degeneration durch diese lange fortgesetzte „Humanisierung“ erfolgt also nicht und diesbezügliche Behauptungen beruhen auf unbewiesenen Voraussetzungen und unrichtigen Schlüssen. Hierbei vorkommende abortive Entwicklungsformen sind nicht als Ausdruck einer Degeneration, sondern einer a priori bestehenden verminderten Empfänglichkeit des geimpften Individuums gegen Vaccine aufzufassen. Gibt es doch auch Menschen, die sich der Vaccine gegenüber vollständig refraktär verhalten.

2. Die Vaccine ist unter gewissen Voraussetzungen auch von Tier zu Tier also „rein animal“ durch eine lange Reihe von Passagen ununterbrochen und anscheinend unverändert fortzüchtbar. Die Bedingungen hierzu sind nach meinen eigenen Erfahrungen folgende:

a) Die Verwendung einer Ausgangslymphe von voller vaccinaler Virulenz. Vollkräftige Kinderlymphe ist das vorzüglichste Ausgangsmaterial.

b) Ein entsprechendes Alter der Impftiere. Jungrinder von $^{1}/_{2}$—2 Jahren sind für Impfungszwecke vorzüglich geeignet. Ganz junge Saugkälber taugen nach den übereinstimmenden Erfahrungen zahlreicher Impfärzte zur rein animalen Fortpflanzung der Vaccine aus bisher unbekannten Gründen nicht, mag nun das Ausgangsmaterial Kinderlymphe, „originäre" Lymphe oder frisch gezüchtete Variolavaccine sein.

c) Streng aseptisches Impfverfahren mit nachfolgendem Deckverband.

d) Sorgfältige Auswahl der tierischen Schutzblattern zur Weiterimpfung. Nur typisch entwickelte, kräftige Exemplare von Schutzpocken lassen für die folgende Deszendenz gute Resultate erwarten. Erfahrungsgemäß läßt sich eine „Aufkräftigung" einer degenerierten (abortiven) Schutzpocke nicht erzielen, eine solche geht vielmehr bei der Weiterleitung ganz zugrunde, „der Stamm reißt ab".

e) Ausschaltung jener Impftiere aus der fortlaufenden Reihe, bei denen sich eine anomale Pockenentwicklung zeigt (präzipitierte Reifung, abortive oder sonst vom Typus abweichende Entwicklung). Diese Entwicklungsanomalien sind nicht etwa als Zeichen einer gradatim bis zu völligem Erlöschen fortschreitenden Degeneration, sondern als der Ausdruck der individuell schwankenden Intensitätsgröße der vaccinalen Empfänglichkeit aufzufassen, die bei den Impftieren weit größere graduelle Unterschiede aufweist als beim Menschen. Ein Abreißen eines animalen Lymphestammes kann sich deshalb viel leichter ereignen als das eines humanisierten. Völlige Unempfänglichkeit gegen Vaccine kommt bei Jungrindern auch relativ häufiger als bei Menschen vor. Es gehört zu den Seltenheiten, daß eine Reihe von Impftieren derselben Provenienz, gleichen Alters, Geschlechts und Ernährungszustandes, die an ein und demselben Tage mit derselben Stammlymphe, nach gleicher Methode geimpft worden sind, identische Impfresultate aufweisen.

Blezinger in Cannstatt, ein überzeugter Anhänger der rein animalen Fortzüchtung der Vaccine, rät auf Grund langjähriger eigener Erfahrung die Verwendung möglichst lang abgelagerter, selbstverständlich noch wirksamer Glyzerinlymphe als Ausgangsmaterial. Ferner empfiehlt er sorgfältige Pockenauswahl für die Bereitung der Stammlymphe zur Weiterimpfung und Vermischung („Verschneidung") der Impfstoffernten von mehreren Impftieren.

Ob der durch viele Passagen rein animal fortgeleiteten Vaccine dieselbe Konservierungsfähigkeit und dieselbe spezifische Keimkraft zur Hervorbringung typischer Vaccineeffloreszenzen und des damit enge zusammenhängenden Immunisierungsvermögens innewohnt, wie sie die Retrovaccine zweiter oder dritter Generation ohne Zweifel sicher besitzt, darüber fehlen ausreichende Erfahrungen.

3. Als sicherste Methode zur Gewinnung einer verläßlichen, haltbaren und kräftigen tierischen Vaccine kann ich nach eigener langjähriger Erfahrung das oben sub 4 erwähnte und in der Wiener Staatsimpfanstalt konsequent geübte Retrovaccinationsverfahren bezeichnen, das bei rationeller Methodik niemals versagt.

Die Konstanz der hiermit in unserem Institute erzielten Erfolge glaube ich auf folgende Umstände zurückführen zu können:

a) die Vortrefflichkeit der zu jeder Jahreszeit zur Verfügung stehenden humanisierten Anfangslymphe, die ausschließlich als Aussaatmaterial für die Herstellung der sogenannten Stammlymphe (Retrovaccine erster Generation) dient;

b) der unbedingte Ausschluß von Saugkälbern zur Lympheproduktion;

c) das streng aseptische Impfverfahren, wobei die Anwendung des Tegminverbandes eine Hauptrolle spielt;

d) die ausschließliche Benutzung der Retrovaccine erster Generation als Stammlymphe für die Impfung aller Jungrinder, deren Lympheertrag zur Herstellung des für Menschenimpfungen bestimmten Impfstoffes (der sogenannten Versandlymphe) dienen soll.

B. Spezieller Teil.

1. Wahl, Beschaffung, Pflege und Wartung der Impftiere.

Es dürften mehr oder weniger alle Säugetiere für Vaccine empfänglich sein. Als Impftiere *κατ' ἐξοχήν* gelten jedoch mit Recht Rinder jeden Alters, jeder Gattung und Rasse. Die Wahl nach dem Alter ist im allgemeinen von den lokalen Markt- und Konsumverhältnissen bzw. von den zur Verfügung stehenden Mitteln abhängig.

Die Tatsache, daß Ziegen gegen Tuberkulose nahezu immun sind, gab die Veranlassung, auch diese Tiere zu Vaccinationszwecken heranzuziehen, doch waren die Resultate wenig ermunternd, so daß man gegenwärtig, wenigstens in Europa, hiervon Abstand genommen hat. Dr. Fargin, französischer Militärarzt in Kabylien (Nordafrika) vacciniert Ziegen an der vorher rasierten Flanke mittels 2 cm langer und 3 cm von einander abstehender Ritzer und nimmt den Impfstoff am 7. Tage ab. Nach seiner Beschreibung erscheinen die Schutzpocken viel trockener als bei Kälbern und weniger mit Lymphe gefüllt und vertrocknen auch viel rascher. Trotzdem sollen die Menschenimpfungen direkt vom Tiere befriedigende Impfresultate ohne Komplikationen geben, die mit jenen mittels Kälberlymphe erzeugten ganz gut vergleichbar seien. Die trockene Beschaffenheit der Ziegenpocken habe weder auf die Entwicklung, noch auf die Form der menschlichen Impfpocken Einfluß. Fargin glaubt, die Trockenheit der Ziegenpocken auf die fettarme Beschaffenheit der Ziegenhaut beziehen zu sollen. Er empfiehlt die Vaccination der Ziegen für jene Gegenden, wo, wie in Kabylien, Rinder mangeln.

Im Institut Pasteur zu Saigon wurden versuchsweise Büffel, bei denen Vaccine leicht haftet und sich gut entwickelt, zu dem Zwecke vacciniert, um die Virulenz der durch den langen Transport aus Frankreich bereits abgeschwächten Kälberlymphe zu steigern. Die Versuchsanordnung war folgende: 1. Verimpfung von Kälberlymphe und Fortimpfung von Büffel auf Büffel; 2. Durchleitung von Büffelvaccine durch den menschlichen Organismus und Rückübertragung auf Büffel. 3. Alternierende Passagen von Büffel und Rind.

Durch keines dieser Mittel erreichte man den beabsichtigten Zweck der Virulenzsteigerung.

Pferde und Esel sind für Vaccine sehr empfänglich. Die Pferdevaccine nennt man Equine. Die Entwicklung der Schutzpocke bei vaccinierten Affen steht sowohl bezüglich der lokalen Erscheinungen als auch bezüglich des klinischen Verlaufes und des Immunisierungseffektes der menschlichen Vaccine am nächsten, nur erfolgt sie etwas langsamer und die Reaktion ist etwas milder.

Bei der Variolation (Inokulation mit Variolavirus) von Affen kommt es nicht nur zur Pockenentwicklung an den Inokulationsstellen, sondern auch zu einer sekundären generalisierten Pockeneruption, wie

beim Menschen. Brinckerhoff und Tyzzer, die 1906 in Manila an ungefähr 300 Affen Vaccinations- und Variolationsversuche anzustellen Gelegenheit hatten, beschreiben den Verlauf der inokulierten Variola beim Affen folgendermaßen:

Drei Tage nach der Inokulation beginnt die spezifische Lokalreaktion in Form einer papulösen Erhebung der Insertionsstellen, die am 5. Tage eine Breite von 6—7 mm erreicht und eine scharf begrenzte rote Papel darstellt, die sich hart anfühlt und ein lineares Krüstchen auf ihre Kuppe trägt. Am 6. Tage erfolgt die Umwandlung dieser Papel in die charakteristische Pocke, die am 7. Tage den Höhepunkt ihrer Entwicklung erreicht und bereits am 8. Tage unter rascher Borkenbildung sich involviert. Mitunter schießen in der Umgebung mehrere punktförmige Effloreszenzen auf. Die Temperatur steigt am 6.—7. Tage bis 41° C, hält sich jedoch nur kurze Zeit auf dieser Höhe und sinkt dann lytisch ab. 24—28 Stunden nach der Fieberakme bricht ein Allgemeinexanthem aus, das besonders im Gesichte und an den Innenflächen der Extremitäten lokalisiert erscheint, Stamm und die behaarten Teile der Extremitäten frei läßt. Das Exanthem kann auch bloß aus vereinzelten Effloreszenzen bestehen; im Maximum beträgt die Pockenzahl 60—100. Die sekundären Pocken erscheinen zunächst in Form kleiner, rosafarbener, mohnkorngroßer Knötchen, die am nächsten Tage das Doppelte ihrer ursprünglichen Größe erreichen und dann Bläschenstruktur zeigen. Am 3. Tage trocknen die Bläschen bereits ein. Der ganze Prozeß dauert etwa 14 Tage und zeigt einen ähnlichen, jedoch abgekürzten Verlauf wie die Variola inoculata des Menschen. Das Allgemeinexanthem tritt um 1—2 Tage früher auf als bei dieser und besteht nicht aus typisch ausgebildeten Pockeneffloreszenzen, sondern nur aus pustelähnlichen Bläschen. Die regionären Lymphdrüsen schwellen regelmäßig am 4.—5. Tage an, verkleinern sich vom 9.—10. Tage an, bleiben jedoch längere Zeit härter als unter normalen Verhältnissen. Die inneren Organe zeigen weder makroskopisch noch mikroskopisch wahrnehmbare Veränderungen, insbesondere fehlen spezifische Veränderungen im Knochenmark und im Hoden, wie man solche bei menschlichen Variolaleichen findet. In den Inokulationspusteln finden sich zahlreiche Guarnierische Körperchen, welche die genannten Forscher auch in den Lungenepithelien nach Inhalation von getrockneten und fein pulverisierten Pockendetritus nachgewiesen haben.

Behufs Auffrischung oder Regenerierung des humanisierten Impfstoffes, den man infolge der zahllosen Passagen durch den menschlichen Organismus für degeneriert hielt, hat man die Rückübertragung ursprünglich nur auf Kühe vorgenommen, da man von der Ansicht ausging, daß ja auch die spontane oder originäre Kuhpocke nur bei Kühen vorkomme und daher dies der natürliche Boden für ihre Entwicklung sei. Erst viel später, als die Einführung der animalen Lymphe für die allgemeine Kinderimpfung das Bedürfnis nach größeren Mengen von Impfstoff zeitigte, verließ man die damals mit erheblichen Unbequemlichkeiten verbundene Impfung des Kuheuters und versuchte es nach dem Beispiele Negris mit der Kälberimpfung.

Nach allgemeiner Erfahrung eignen sich allzu junge Saugkälber wegen der Schwierigkeit, ihre Ernährung ohne die Entwicklung der Schutzpocken beeinträchtigende Gesundheitsstörungen durchführen zu können, nur wenig als Impftiere. Die Schutzpocken reifen und involvieren sich bei Saugkälbern viel rascher als bei älteren Tieren; auch

erreichen sie niemals die Größe und den Substanzreichtum wie bei diesen. Als entsprechendste unterste Altersgrenze muß jene angesehen werden, bei der von den Tieren bereits Rauhfutter genommen wird. Schon die alten holländischen Impfärzte empfahlen Farren (Färsen, Fasseln) im Alter von 4—7 Monaten.

In der Wiener Staatsimpfanstalt werden seit ihrer Eröffnung (1893) mit immer gleich bleibendem vorzüglichem Erfolge ausschließlich Jungrinder im Alter von ca. 1—2 Jahren und darüber ohne Rücksicht auf das Geschlecht verwendet. Wenn trotzdem daselbst zumeist Bullen geimpft werden, so ist dies durch die Verhältnisse des Wiener Zentralviehmarktes bedingt, auf welchem ein starker Auftrieb von jungen Bullen herrscht, die von den Fleischselchern zur Wurstfabrikation benötigt werden. Männliches Jungvieh ist deshalb in Überzahl und in besserer Qualität vorhanden, weil die Landwirte in der Regel nur dann Kalbinnen in diesem Alter zu Schlachtungszwecken zu veräußern pflegen, wenn sie die Not oder zweifelhafter Gesundheitszustand (Tuberkuloseverdacht usw.) der jungen Kuh hierzu veranlaßt. In der Tat konnten wir beobachten, daß die Zahl jener weiblichen Impftiere, von denen der Impfstoff wegen bei der Schlachtung konstatierter Tuberkulose vernichtet werden mußte, unverhältnismäßig größer war als jene der Bullen.

Die Bevorzugung hellfarbiger Rinder vor dunkelhaarigen läßt sich weder wissenschaftlich noch praktisch zureichend begründen, sondern ist zumeist Sache der Liebhaberei. Die Pockenentwicklung erfolgt nach meinen Erfahrungen bei Verwendung kräftiger Stammlymphe bei dunkelhaarigen Rindern ebenso typisch, kräftig und ausgiebig wie bei hellfarbigen. Wenn man sich in der Regel bei bestehender freier Verfügungsmöglichkeit für erstere zu entscheiden pflegt, so geschieht dies deshalb, um die unausweichliche Beimengung des dunklen Hautpigmentes zu vermeiden, welches den Impfstoff mißfarbig macht, bezw. ihn schmutzig grau verfärbt.

Die Pflege und Fütterung der Impftiere gestaltet sich bei der Wahl von Jungrindern sehr einfach. Gutes, süßes Wiesenheu in entsprechender Menge reicht als Futter vollständig aus. Größere Schwierigkeiten bestehen bei der Ernährung von Schlachtkälbern (Saugkälbern). So junge Tiere sind außerordentlich empfindlich und die bei ihnen infolge der künstlichen Ernährung so überaus häufigen Darmerkrankungen (Diarrhoe, Meteorismus usw.) sind nicht nur an und für sich unangenehme, den regelmäßigen Anstaltsbetrieb störende Ereignisse, sondern dieselben beeinflussen auch die Pockenentwicklung in äußerst ungünstiger Weise. Peinliche Sauberkeit, sorgfältige Sterilisierung und Dosierung der Milch, die den Kälbern mittels Saughütchen aus Gummi verabreicht werden muß usw., sind Maßnahmen, um die erwähnten Störungen so weit als möglich einzuschränken. Sie sind jedoch immerhin bedeutend genug um die Schlachtkälber als minderwertiges Impfungsmaterial ja geradezu als Notbehelf erscheinen zu lassen, das erst in zweiter Linie in Betracht kommt, ganz abgesehen davon, daß die Pockenentwicklung, sowie die Qualität und Quantität des daraus gewonnenen Impfstoffes keinen Vergleich aushält mit jenem bei Jungrindern.

Behufs Hintanhaltung des üblen Stallgeruches infolge des sich zersetzenden Urins empfiehlt es sich, den Betonboden der Stände zunächst mit einer Lage von Torfmull zu bedecken, hierauf einen Lattenrost zu legen, der dann erst eine reichliche Lage von Stroh erhält. Jeder Stand muß durch eine kleine Tafel bezeichnet sein, welche die laufende Nummer

des Impftieres, das Datum der Einstellung, Einimpfung und die per anum zuletzt gemessene Morgen- und Abendtemperatur trägt. Die Temperatur des Impfstalles soll kühl gehalten werden, da nach allgemeiner Erfahrung die Pockenentwicklung in kalter Jahreszeit besser vonstatten geht als im Sommer. Bei heizbaren Stallungen, besonders bei solchen, die mit einer Zentralheizungsanlage (Dampfniederdruckheizung) verbunden sind, ist auf genaue Regulierung der Wärmezufuhr zu achten, da nach den Erfahrungen Stumpfs in München Überheizung des Impfstalles einen überaus ungünstigen Einfluß auf die Pockenentwicklung übt.

Da die vaccinierten Tiere das Impffeld zu belecken pflegen und mit der rauhen Zunge die Pocken ganz zerstören, müssen behufs Verhinderung solcher Zwischenfälle besondere Vorkehrungen getroffen werden. Bei Schlachtkälbern genügen hierzu Maulkörbe und eine entsprechende Fixierung des Kopfes. Den vaccinierten Jungrindern werden in unserem Institute Lederhalfter angelegt, die beiderseits mittels kurzer Karabinerketten an links und rechts am Futterbarren eingelassenen Eisenringen befestigt werden. Die Tiere sind dadurch weder an genügender Bewegungsfreiheit noch am Niederlegen gehindert, können jedoch mit der Zunge das Impffeld nicht erreichen.

Einrichtungen für ein Kälberbad, wie solche in manchen Impfinstituten bestehen, halte ich bei größeren Jungrindern für unpraktikabel und überflüssig, weil ja nur das Impffeld einer sorgfältigen Reinigung und Desinfektion bedarf, die ohnehin nur bei den am Impftische aufgespannten Rindern in exakter Weise erfolgen kann. Außerdem nimmt in der kalten Jahreszeit, in welcher gegenwärtig die meisten Tierimpfungen vorgenommen werden, das Trockenwerden des nassen Haarkleides sehr lange Zeit in Anspruch, wodurch eine nicht unbedeutende Erkältungsgefahr für die Tiere besteht.

In neuerer Zeit verwendet man auch Kaninchen zu Vaccinationszwecken. Das Produkt der Vaccineimpfung an Kaninchen, bezw. die auf diesen Tieren gezüchtete Vaccine nennt man Lapine, die jedoch nach Chalybäus richtiger als Leporine (Kaninchen lepus cuniculus) zu bezeichnen wäre und dies um so mehr als man ja auch Feldhasen mit demselben Erfolge vaccinieren kann. Die Impfung der Kaninchencornea zum Zwecke des Studiums der spezifischen Wirksamkeit der Vaccine ist seit den grundlegenden Versuchen Guarneris und L. Pfeiffers allgemein bekannt und vielseitig geübt. Ja sie scheint heute sogar schon ein wichtiger Behelf zur Differentialdiagnose zwischen Variola und Varizellen werden zu sollen. Auch zur Prüfung der bakteriellen Reinheit der Kälberlymphe hat man schon vor längerer Zeit das Kaninchenohr als entsprechendes und bequemes Versuchsfeld verwendet, um durch das Tierexperiment die Abwesenheit von Erysipelaserregern rasch zu erweisen.

Kaninchenimpfungen zum Zwecke der Vaccinepropagation sind indessen verhältnismäßig neueren Datums und müssen an dieser Stelle etwas eingehender besprochen werden und dies um so mehr als ihnen von einigen Seiten nachgerühmt wird, daß sie geeignet seien, die spezifische Virulenz der Vaccine zu verstärken.

Calmette und Guérin in Lille haben im Jahre 1901 zuerst das Kaninchen als taugliches Objekt für die Lymphepropagation empfohlen und zwar bezeichneten sie als geeignetste Impfstelle den frisch rasierten Rücken junger weißer Kaninchen, auf den man Glyzerinlymphe nur aufzustreichen brauche, um Haftung zu erzielen. Durch das Rasieren der zarten Kaninchenhaut allein entstehen nämlich schon zahlreiche kleine

Exkoriationen, die dem Eindringen bzw. der Ansiedlung der Vaccine ausreichende Eintrittspforten gewähren. Binnen 2—3 Tagen entwickle sich eine Eruption von mehr oder minder dichtgedrängten rasch wieder eintrocknenden Papeln, welche die höchste Entwicklungsstufe der Kaninchenpocken darstellen. Die Kürettierung der Papeln müsse zur Zeit ihres Blütestadiums, d. i. längstens nach drei Tagen erfolgen, wenn man eine wirksame, auf Kaninchen und Kälber weiter verimpfbare „Lapine" erhalten wolle. Die abgeschabte „Rohlapine" wird in gleicher Weise wie die Kälbervaccine zu Glyzerinemulsion verarbeitet.

Interessant ist das Verhalten der Kaninchen gegen eine wiederholte Vaccination. Nach den Untersuchungen Rehns (1902) werden weder vaccinierte, noch variolierte oder mit Serum von Blatternrekonvaleszenten vorbehandelte Kaninchen gegen eine auch mehrmals wiederholte Revaccination unempfänglich. Nach Paschen, der diese Beobachtungen bestätigt, verläuft jedoch analog dem Verlauf der menschlichen Revaccination der zweite Impfprozeß beschleunigter als jener der ersten Impfung.

Calmette und Guérin behaupten in einer ihrer späteren Publikationen, daß die auf Kaninchen übertragene und von einem Kaninchen auf das andere fortgezüchtete Vaccine sich kräftiger verhalte als die von Kalb zu Kalb fortgepflanzte. Es findet also nach ihrer Ansicht eine Virulenzsteigerung bezw. eine Kräftigung eines schwach gewordenen Lymphestammes statt und außerdem werde die Vaccine bei diesem Übergange von einer Tierart auf die andere gereinigt, indem die Mikrobien der an solchen ziemlich reichen Kaninchenhaut auf Kälbern zugrunde gehen sollen.

Nach Voigt gelingt auch die Variolisierung von Kaninchen verhältnismäßig leicht (von 14 variolisierten Kaninchen kam deutliche Haftung in Form einer papulösen Eruption bei fünf Tieren zustande), wobei jedoch die Reaktion schwächer gewesen soll, wie nach einer Vaccination. Voigt berichtet weiter, daß ihm die Weiterimpfung dieser Variolalapine auf Kälber bzw. die Züchtung echter Variolavaccine geglückt sei. Er empfiehlt nach diesen positiven Versuchen die Variolation der Kaninchen als handliches Hilfsmittel zur Anzucht von Variolavaccine, indem das Kaninchen jedenfalls ein bequemerer und billigerer Zwischenträger sei, als der hiezu gewöhnlich benutzte Affe. Bezüglich der direkten Verimpfung der Lapine auf Kinder hat Voigt die Erfahrung gemacht, daß dieselbe namentlich bei der Revaccination schwächer wirke als Kälberlymphe. Die Virulenz der Lapine hänge ganz wesentlich von der Virulenz des Ausgangsmateriales (der Stammlymphe) ab. Lapine von Kaninchen, die mit humanisierter Vaccine geimpft worden seien, die ich also als „Retrolapine erster Generation" bezeichnen möchte, habe sich kräftiger und haftsicherer erwiesen als jene von Kaninchen, die man mit Kälberlymphe geimpft habe.

Was die Haltbarkeit der Lapineglyzerinemulsion anbelangt, so soll sich dieselbe wie die Glyzerinvaccine monatelang wirksam erhalten. Hasen verhalten sich nach Voigts Erfahrungen der Vaccination gegenüber wie Kaninchen. Der Keimgehalt der frischen Lapine sei in der Regel ein hoher, vermindere sich jedoch nach längerem Liegen in Glyzerin. Voigt hebt ferner als Vorzug der Lapine hervor, daß sich die mit derselben beim Menschen erzeugten Impfpocken durch ganz besondere Milde des Verlaufes auszeichnen (sollte das nicht ein Zeichen ihrer „Schwäche" sein?). Voigt ist ferner der Ansicht, daß die Lapine dazu berufen sei, in den Tropen, wo die Kultivierung der Vaccine bei Rindern große Schwierigkeiten bereite, höchst wahrscheinlich ein wertvolles Ersatzmittel

für Kälbervaccine abzugeben, sowie sie bereits einen Wert zur „Aufkräftigung der Kälberlymphe“ besitze (?).

Die Verwendung von Kaninchenlymphe für Menschenimpfungen hält Voigt für unbedenklich, da man sich in jedem einzelnen Falle selbst durch die Sektion von dem Gesundheitszustande des Tieres Überzeugung verschaffen könne. Die sogenannte Hasenvenerie, die übrigens keine Syphilis sei, komme bei Kaninchen nicht vor und die bei Kaninchen so häufige Coccidienerkrankung sei durch kutane Impfung wohl nicht übertragbar. L. Pfeiffer bestätigt im großen und ganzen die Erfahrungen Calmettes, Guérins und Voigts über die Lapine, die er selbst seit 1904 als Ersatz der humanisierten Lymphe bei der Kälberlympheerzeugung mit gutem Erfolge verwende. Wenn man unmittelbar vom vaccinierten Kaninchen Kinder impfe, so sei ein Unterschied der entstehenden Pocken von den aus Kälberlymphe erzeugten nicht zu bemerken. Nachimpfungen mit Kälberlymphe nach Lapineimpfung sei erfolglos. Zur Vaccinierung von Kaninchen rät Pfeiffer, weiße Tiere zu wählen, deren Fell wenig Wollhaare besitze. Diese wüchsen auf der rasierten Hautfläche schnell nach und mengen sich bei der Abnahme der abgeschabten Papelmasse bei. Mit Glyzerin vermengte Lapine halte sich zwei bis drei Monate wirksam. Auf das Kalb verimpft Pfeiffer die Lapine frisch, d. i. sofort nach ihrer Abnahme. Die Weiterimpfung von Kalb zu Kalb sei nicht lange durchführbar; es trete ebenfalls Abschwächung wie bei jedem anderen Ausgangsmateriale ein. Aber schwächere Kälberlymphe ergebe beim Kaninchen noch eine gute Ernte (Virulenzsteigerung?). Zur Prüfung der Wirksamkeit längere Zeit abgelagerten Impfstoffes impft Pfeiffer nach dem Vorgange von Chaumier die innere Ohrfläche eines weißen Kaninchens. Diese zeige bei bestehender Virulenz des verwendeten Impfstoffes am dritten und vierten Tage bei durchfallendem Lichte einen roten Saum um ein dunkles (pustulöses) Zentrum.

Ob der Lapine tatsächlich die Rolle eines vollwertigen Ersatzmittels der nach meiner Meinung für die Impfstofferzeugung unersetzlichen humanisierten Lymphe zukommt, müssen noch ausgedehnte weitere Versuche erweisen. Chaumier in Tours verwendet in analoger Weise, wie Guérin artfremde Tiergattungen als Zwischenträger zur Steigerung bzw. Konstanterhaltung der Virulenz der Vaccine, nur bedient er sich des Esels statt des Kaninchens.

2. Beschaffung von Stammlymphe.

Der Besitz kräftiger Stammlymphe ist die unerläßliche Grundbedingung eines befriedigenden Erfolges der Tierimpfungen, das Alpha und Omega eines gesicherten und ungestörten Anstaltsbetriebes. Ihre Anzüchtung bildet daher für jedes Impfinstitut, namentlich vor Beginn der Hauptimpfsaison, den Gegenstand besonderer Aufmerksamkeit und Pflege. Nur große Sorgfalt und Sachkenntnis, insbesondere nur durch längere Erfahrung zu erwerbende Kritik des Impfresultates bzw. der Qualität der zur Herstellung der Stammlymphe bestimmten tierischen Schutzblattern schützen vor Mißerfolgen und unangenehmen Überraschungen. Als oberstes Prinzip, dessen konsequenter Befolgung ich die Stetigkeit und Regelmäßigkeit der Entwicklung der tierischen Pocken und die unbedingte Haftsicherheit der daraus bereiteten Schutzpockenlymphe von dem Beginne meiner Tätigkeit in der Wiener Staatsimpfanstalt verdanke, hat mir stets der Grundsatz gegolten, nur solche tierische Schutzblattern typischer Entwicklung zur Herstellung von Stammlymphe zu verwenden,

die von eigenhändig verimpftem Ausgangsmaterial verläßlicher Provenienz abstammen, auf dessen Gewinnung ich selbst direkten Einfluß nehmen konnte. Ein solcher, den Erfolg sichernder Einfluß ist nur bei dem Retrovaccinationsverfahren möglich.

Wie bereits in dem historischen Teile erwähnt worden ist, stand mir ursprünglich humanisierte Lymphe der alten „Jennerschen Genitur" aus der niederösterreichischen Landesfindelanstalt als Ausgangsmaterial zur Verfügung, die bei der Übertragung auf Rinder so vorzügliche Impfresultate ergab, daß ich keinen Anlaß fand, von ihrer stetigen Verwendung abzugehen, bis im Jahre 1899 infolge der Auflassung der Fortzüchtung dieses altberühmten Lymphestammes diese Lymphequelle versiegte und eine neue erschlossen werden mußte. Es gelang mir auch tatsächlich, eine Stelle ausfindig zu machen, die sich geneigt zeigte, mit animaler Lymphe unserer eigenen Zucht, die, ohne jemals einen fremden Einschub erfahren zu haben, der „Jennerschen Genitur" entstammte, zu jeder Jahreszeit über unseren Wunsch mehrere gesunde Kinder behufs Gewinnung frischer humanisierter Lymphe zu impfen. Auf diese Weise konnte der bewährte Jennersche Lymphestamm in unveränderter Kraft und Wirksamkeit weiter gezüchtet und erhalten werden.

Aus dem Gesagten geht zur Evidenz hervor, daß bei methodischer und rationeller Übung des Retrovaccinationsverfahrens jene feste Basis zu gewinnen ist, deren man bedarf, um sich unabhängig von allen jenen üblen und einen geregelten Betrieb nicht selten empfindlich störenden Zwischenfällen stellen zu können, denen man häufig genug bei der rein animalen Fortzüchtung ausgesetzt ist, ganz abgesehen davon, daß man ihr weder konsequente Einhaltung des leitenden Prinzipes, noch eine ausreichende wissenschaftliche Begründung nachrühmen kann. Wenn die „rein animale" Impfmethode trotz ihrer Mißerfolge noch nicht gänzlich verlassen ist, so liegt wohl der Hauptgrund in der Schwierigkeit der rechtzeitigen Beschaffung einer ausreichenden Quantität frischer humanisierter Lymphe in der kalten Jahreszeit, was für viele Institute eine wahre Kalamität bildet und sie zwingt, es immer und immer wieder mit der rein animalen Fortzüchtung zu versuchen. In solchen Instituten bilden jedoch Einschaltungen fremder Lymphestämme ein häufiges Ereignis.

Vor der Einführung der animalen Vaccine in die öffentliche Impfpraxis zählte die Lympheabnahme aus der eröffneten Schutzblatter am kindlichen Arm zu den wichtigsten Geschäften des Impfarztes. Das Publikum war seinerzeit daran gewöhnt und sträubte sich nicht gegen diese Prozedur, ja die Mütter setzten einen gewissen Stolz darein, wenn ihr Kind würdig befunden wurde, als Lymphespender gewählt zu werden. Heute ist die Lympheabnahme bei Kindern ein ungewöhnlicher Eingriff geworden, zu dessen Gestattung sich auch bei Aussicht auf reichliche Geldgeschenke nur wenige Mütter entschließen, geschweige denn, daß sie es zulassen würden, ihr Kind zu einer ungewohnten und nach ihren Begriffen sehr ungünstigen kalten Jahreszeit eigens zum Zwecke der Lympheabnahme vaccinieren zu lassen.

Nachdem die Beschaffung humanisierter Lymphe für Impfanstalten, welche das Retrovaccinationsverfahren üben, von aktuellstem Interesse ist, erscheint eine genaue Schilderung des bei ihrer Abnahme und Konservierung einzuschlagenden Vorganges am Platze.

Am achten Tage nach der Impfung wird die typisch und kräftig entwickelte Schutzpocke, die noch keine Zeichen beginnender Rückbildung aufweisen darf, zunächst mit einem mit Schwefeläther befeuchteten sterilen

Watte- oder Gazebäuschchen zart abgerieben, wobei jede Pustelläsion sorgfältig zu vermeiden ist; hierauf wird der ringförmige Wulst, der ihre zentrale Depression, die sogenannte Delle, umgibt, mit einer schmalen, scharf geschliffenen, horizontal gehaltenen Impfnadel an mehreren Stellen oberflächlich angestochen. Der Arm des betreffenden Kindes muß hierbei ebenso wie bei der Impfung verläßlich fixiert werden, um eine tiefere Verletzung der Schutzblatter zu vermeiden. Erfolgt die Eröffnung der Schutzpocke mit entsprechender Zartheit und Sicherheit, so ist der Eingriff für das Kind schmerz- und gefahrlos. Nach mehreren Sekunden quillt die Lymphe aus den Einstichöffnungen in Form wasserheller Tröpfchen hervor, die sich alsbald zu größeren Tropfen vereinigen und in der napfförmigen Delle zusammenrinnen. In dieses kleine Lymphereservoir wurde bei der früher geübten Impfung von Arm zu Arm die Spitze der Impfnadel behufs Weiterimpfung eingetaucht. Auch die Retrovaccination wurde ursprünglich durch direkte Entnahme der Lymphe vom kindlichen Arme und sofortige Übertragung auf das Impftier geübt, welcher Vorgang jedoch aus äußeren und sachlichen Gründen als unbequem und unhygienisch aufgegeben worden ist.

Für eine spätere Benutzung bzw. Versendung der humanisierten Lymphe waren verschiedene Arten des Sammelns und Verwahrens in Übung. Ursprünglich erfolgte die Konservierung in Form der sogenannten Trockenlymphe, deren Haltbarkeit außer Frage steht. Jenner und seine englischen Kollegen zogen nach dem Vorbilde der Variola-Inokulatoren seidene oder baumwollene Fäden wiederholt durch die angestochenen Impfpocken und ließen die mit Lymphe benetzten Fäden eintrocknen. In dieser Form kam die erste Kuhpockenlymphe nach dem Kontinent und nach den übrigen Weltteilen. Die imprägnierten Fäden wurden in die Impfverletzungen eingelegt und durch Pflaster fixiert. Später konservierte man die Lymphe durch Eintrocknen an Stahl- oder Beinlanzetten, an Holz- und Glasstäbchen. Vor der Impfung wurden die imprägnierten Spitzen dieser Impfstoffträger angefeuchtet und in die vorher mit einer Impfnadel angelegten Impfverletzungen eingerieben. Auch zwischen Glasplatten, deren Ränder sorgfältig mit Klebestoffen gedichtet waren, ließ man die Lymphe eintrocknen. Vor dem Gebrauch wurde die trockene Lymphe mit destilliertem Wasser, in späterer Zeit auch mit Glyzerin aufgeweicht und die Impflanzette damit armiert.

Als zweckmäßigste Aufbewahrungsart empfiehlt schon Zöhrer (1843) die Konservierung in flüssiger Form in den französischen sogenannten Bretonneauschen Phiolen, das sind 5—6 cm lange, an beiden Enden offene feine Haarröhrchen, oder in den italienischen spindelförmigen Glasröhrchen nach Sacco. Zöhrer selbst benutzte als Impfstoffrezipienten $3^1/_2$ Zoll lange, von weichem Kristallglas gezogene, in ein Kölbchen allmählich auslaufende, an dem anderen Ende offene, sehr feine Glasröhrchen, die die Form einer langhalsigen Phiole hatten. Das Kölbchen der leeren Phiole wurde vor ihrer Füllung mit Impfstoff einige Augenblicke über einer Spiritusflamme erwärmt und dann das offene Ende derselben rasch in das Lymphetröpfchen getaucht. Infolge der Abkühlung des Kölbchens bzw. der darin eingeschlossenen Luft wurde die Lymphe durch den äußeren Luftdruck in das Röhrchen getrieben. Das offene Ende der Phiole wurde in der Spiritusflamme zugeschmolzen oder mit Siegellack verschlossen, falls die Lymphesäule nicht weit genug in die Röhre vorgedrungen war. Die Entleerung der Phiole erfolgte auf die Art, daß man das zugekittete Ende der Phiole

abbrach und dann das Kölbchen an die Spiritusflamme brachte, wobei man gleichzeitig vor das offene Ende eine Glas- oder Elfenbeinplatte hielt.

Die Aufbewahrung der gefüllten Phiolen für den späteren Gebrauch geschah an einem gleichmäßig kühlen Ort, etwa bei Kellertemperatur, wobei man dieselben noch in feinen Sand zu vergraben oder in Watte einzuhüllen pflegte. Gegen Einwirkung höherer Temperaturgrade ist die humanisierte Lymphe sehr empfindlich, weshalb schon die alten Impfärzte rieten, die Enden der Röhrchen nicht in der Spiritusflamme zu verschmelzen oder mit brennendem Siegellak zu verschließen. Eine sorgfältig verwahrte humanisierte Lymphe kann sich auch in flüssiger Form ausnahmsweise monatelang virulent erhalten, schwächt sich jedoch in der Regel bald ab und man tut deshalb gut daran, für Zwecke der Tierimpfung möglichst frische humanisierte Lymphe zu verwenden, wenn man sichere Resultate erzielen will.

Der vormalige Direktor der königlichen Schutzblatternanstalt in Berlin, Dr. E. Müller, hat im Jahre 1866 als Erster das verdünnte Glyzerin als Vervielfältigungsmittel für humanisierte Lymphe empfohlen. Das Glyzerin hat sich als Verdünnungs- und Konservierungsmittel auch vorzüglich bewährt und behauptet als konservierender Zusatz bis auf den heutigen Tag die erste Stelle für die humanisierte und animale Vaccine. Anfangs gestattete Müller eine 10fache Verdünnung der Lymphe, riet jedoch später, weit unter diesen Verdünnungsgrad herabzugehen. Als entsprechendes Verhältnis hat sich erfahrungsgemäß eine Verdünnung von 1 Teil Lymphe auf 3—4—5 Teile Glyzerin mit 20 % Wasserzusatz am besten bewährt. Dieses Verhältnis soll nicht nach dem Augenmaß, sondern volumetrisch oder gewichtsmäßig bestimmt werden. Zu ersterem Behufe bediene man sich als Maßeinheit eines Kapillarröhrchens und gebe auf ein Röhrchen reiner Lymphe drei Röhrchen Glyzerin. Als Rezipienten für die zu sammelnde Lymphe eignen sich am besten die jetzt als Behälter für Impfstoff allgemein gebräuchlichen zylindrischen Glasröhrchen mit nicht allzu weitem Lumen, deren proximales Ende in das Lymphetröpfchen eingetaucht wird, wobei man das Röhrchen schräg abfallend hält, um die Füllung desselben rasch und bequem zu bewerkstelligen. Behufs Vermeidung von schmerzhaften und den normalen Vaccinationsverlauf möglicherweise störenden Verletzungen der tieferen Schichten der Schutzblatter, die bei unruhigen Kindern bei unzweckmäßiger Manipulation sehr leicht erfolgen können, muß beim Eröffnen der Schutzpocke und bei der Lympheabnahme nicht nur der Oberarm des Kindes von unten durch Umspannung mit der linken Hand sicher fixiert, sondern auch die rechte, die Phiole haltende Hand mit den Spitzen des kleinen und Ringfingers auf den Kinderarm gestützt werden.

Die Lympheabnahme läßt sich in überaus zweckmäßiger Weise mit der Glyzerinbeimengung vereinigen, indem man mittels eines sterilen, an den Enden abgerundeten Glasstabes einen Tropfen sterilen Glyzerins direkt auf die vorher angestochene Schutzblatter bringt und durch leichtes Reiben mit dem benetzten Ende des Glasstabes eine innige Vermengung des Glyzerintropfens mit der hervorquellenden Lymphe bewirkt, wobei auch noch der leichte Druck auf die Schutzblatter das Hervortreten der letzteren befördert. Die Füllung des Röhrchens erfolgt auch hier in der oben angedeuteten Weise. Nach Beendigung der Lympheabnahme, tupft man die Schutzpocke mit einem sterilen Bäuschchen ab, bestreut sie mit einem adstringierenden Pulver (das in unserem Institute als Streupulver bei Impflingen in der Desikkationsperiode ver-

wendete Gemenge von Amyl. pulv., Talc. ven. āā partes aequales g 40,0, Zinci oxyd., Dermatoli āā g 10,0 eignet sich auch für diesen Zweck ganz vorzüglich).

An dieser Stelle sei einer Erfahrung Raum gegeben, die ich gelegentlich experimenteller Studien über Degeneration und Regeneration der Vaccine gemacht habe und die mir für die Frage der Beschaffung kräftiger und verläßlicher Stammlymphe nicht ohne Bedeutung zu sein scheint.

Als mir zur Retrovaccination noch die alte „Jennersche Genitur" zur Verfügung stand, wiesen die damit am Tier erzielten Impferfolge eine derartige Vollkommenheit und Regelmäßigkeit auf, wie sie später, als hierzu humanisierte Lymphe nur einer einzigen Passage zu erlangen war, in diesem Maße nur selten vorkamen. Um zu ergründen, ob diese gewiß auffallende Erscheinung nur auf zufälligen Umständen oder darauf beruhe, daß die durch zahlreiche Passagen von Arm zu Arm fortgepflanzte, also dem menschlichen Organismus bereits gänzlich angepaßte Vaccine bei ihrer Rückübertragung auf den Tierkörper kräftiger reagiere und vollkommenere Pockenentwicklung zeitige als Vaccine bloß eines einzigen Durchganges durch den Kindeskörper, bemühte ich mich, durch mehrere Passagen rein humanisiert fortgepflanzte Vaccine zu erhalten. Die Schwierigkeiten, solche zu erlangen, sind heutzutage nicht gering. Ich erachte mich daher vom Glücke besonders begünstigt, daß es mir gelungen ist, die Beihilfe des Vorstandes der böhmischen Säuglingsklinik der Prager Findelanstalt, des Prof. Fr. Scherer, zu gewinnen, der dieser Frage ein intensives und werktätiges Interesse entgegenbrachte. Prof. Scherer unterzog sich nicht nur der Mühe, die Vaccine von Arm zu Arm durch acht Passagen fortzuzüchten und die von jeder einzelnen Passage gesondert gesammelte humanisierte Lymphe beizustellen, sondern er führte auch die genaue klinische Beobachtung (einschließlich der Blut- und Harnuntersuchung) aller auf diese Weise vaccinierten Kinder durch und fixierte protokollarisch die Untersuchungsergebnisse. Um der Publikation der Resultate dieser in Gemeinschaft mit Prof. Scherer unternommenen experimentellen Studien nicht vorzugreifen, muß ich mich vorläufig nur auf die Mitteilung beschränken, daß humanisierte Lymphe zweiter und der zunächst folgenden Deszendenzen ohne Zweifel kräftiger beim Jungrinde anschlägt als solche der ersten Deszendenz. Die Impfversuche sind derart angestellt worden, daß die Impffläche der Tiere in doppelt so viele Felder eingeteilt wurde, als Lymphesorten vorhanden waren. Je zwei solcher Parzellen (möglichst weit von einander entfernt) dienten für je eine Lymphsorte als Versuchsareale. Eine zufällige Lympheverschleppung von einer solchen Versuchsparzelle auf die andere wurde durch sofortige Fixation mittels Tegminverband verhindert. Für jede einzelne Parzelle wurden eigene frisch sterilisierte Metallspatel und vorher unberührtes Tegmin verwendet. Es ist wohl nicht bloß einem Zufalle zuzuschreiben, daß die aus der humanisierten Lymphe zweiter Deszendens aufwärts und aus dem Gemenge aller acht fortlaufenden Passagen gezüchtete Retrovaccine erster Generation eine Stammlymphe von ganz hervorragender spezifischer Virulenz lieferte und bei ihrer Weiterverwendung Resultate bei den Impftieren zeitigte, die nicht nur bezüglich der typischen Entwicklung der Schutzblattern, sondern auch bezüglich der Ausgiebigkeit der Rohstofferente jenen glichen, die ich seinerzeit mit der „Jennerschen Genitur" so regelmäßig erzielt hatte und die ich nachher öfter recht schmerzlich vermißt habe.

Schon ZÖHRER beobachtete bei Kinderimpfungen, die er direkt von der retrovaccinierten Kuh vornahm, daß sich bei erfolgter Haftung die Schutzblattern in der zweiten und dritten Deszendenz kräftiger entwickelten und erst in den weiteren Passagen eine konstant bleibende Entwicklungsform annahmen, woraus er auf eine „Bekräftigung des Impfkeimes" schloß. Diese Beobachtung ZÖHRERS findet ihre Bestätigung in der Tatsache, daß die Pockenentwicklung der zweiten Passage bei Jungrindern bei weitem kräftiger angehen und einen reichlicheren Ertrag an Rohstoff liefern als jene der ersten Passage (Retrovaccine erster Generation). In unserer Anstalt pflegt der Rohstoffertrag von den mit humanisierter Lymphe behufs Gewinnung von Stammlymphe vaccinierten Impfrindern bei identischer Impfmethodik und gleichbleibender Ausnützung des Impffeldes im Jahresmittel ungefähr 20—30 g zu geben, während jene der zweiten Passage (Retrovaccine zweiter Generation) 25—50 g erreicht. Bei den weiteren Passagen vermindert sich der Ertrag ganz erheblich. Diese Erfahrungstatsache bildete auch die Direktive für den seit Beginn des Jahres 1896 in der Wiener Staatsimpfanstalt festgehaltenen Vorgang, bei der Lympheproduktion für die Menschenimpfungen ausschließlich die Schutzblattern zweiter Generation zu verwenden und dies um so mehr, als die Konstanz der Haftung und tadelloser Pockenentwicklung bei den öffentlichen Impfungen durchweg im Einklange mit den Impfresultaten bei den Impftieren stand.

Nach den mir zugegangenen Mitteilungen Prof. SCHERERS zeigt der klinische Verlauf bei den von Arm zu Arm geimpften Kindern in den ersten Deszendenzen erhebliche Abweichungen von dem bei mit gewöhnlicher animaler Lymphe (Retrovaccine zweiter Generation) vaccinierten Impflingen. Die lokale und allgemeine Impfreaktion bei der zweiten und dritten Passage ist sehr heftig, in ihrer Intensität jedenfalls erheblich gesteigert. Auch die Pockenentwicklung zeigt überstürzten Verlauf, indem die Impfblattern bereits am fünften Tage ein Entwicklungsstadium aufweisen, das unter gewöhnlichen Verhältnissen dem achten bis neunten Tag entspricht. Impferytheme von ungewöhnlicher Ausbreitung, brettharte Infiltrate des ganzen geimpften Oberarmes bis zum Schulterblatt und über den Ellbogen reichend, waren keine Seltenheit. Auch die Intensität und Dauer des Reaktionsfiebers wies eine wesentliche Steigerung bezw. Verlängerung auf. Die meisten Kinder erschienen durch den Prozeß ziemlich hart mitgenommen, ohne daß sich indessen üble Folgen eingestellt hätten. Erst allmählich schwächt sich bei den weiteren Passagen diese gesteigerte Virulenz der humanisierten Vaccine ab, um endlich wieder ihren gewöhnlichen Charakter anzunehmen und diesen dann unverändert weiter zu behalten.

Vergleicht man nun das klinische Bild der Pockenentwicklung bei den ersten drei Deszendenzen der von Arm zu Arm geimpften Kinder mit der Pockenentwicklung der drei ersten Generationen vaccinierter Jungrinder, so ergeben sich gewisse Analogien. Hier wie dort dieselbe Steigerung der Virulenz der Vaccine in der zweiten Generation, also eine deutliche „Bekräftigung des Impfkeims" im Sinne ZÖHRERS, die jedoch nicht etwa progressiv zunimmt, sondern in den weiteren Passagen bei Kindern zur Norm zurückkehrt und ihre konstante Entwicklungshöhe und Virulenzgröße beibehält, während sie sich beim Tiere allmählich progressiv abzuschwächen scheint.

Schließlich wäre noch zu bemerken, daß humanisierte Lymphe auch bei voller Virulenz bei ihrer Übertragung auf Rinder nicht immer gleich-

wertige Resultate ergibt, daß man vielmehr bisweilen eine ganze Reihe von Tieren retrovaccinieren muß, um Impfpocken solcher Qualität zu erzielen, die sich zur Weiterimpfung in weiterer Deszendenz eignen bzw. eine erstklassige Stammlymphe liefern. Diese Ungleichmäßigkeit hängt mit der individuellen vaccinalen Empfänglichkeit der Impftiere zusammen, die sehr variabel ist. Man darf sich daher bei der Züchtung von Retrovaccinestammlymphe nicht mit einer mittelmäßigen Pockenqualität begnügen, wenn man auf Stetigkeit eines voll befriedigenden Erfolges bei der Weiterimpfung rechnen will.

Im Hinblick auf die bisherigen klinischen und experimentellen Erfahrungen der fortgeführten „Humanisierung" und der alternierenden Retrovaccination besteht durchaus kein praktisches Bedürfnis für die Anzucht neuer Variolavaccinestämme. Dieses Bedürfnis würde sich erst dann geltend machen, wenn die Resultate der Retrovaccination sowohl in Beziehung auf die Impfergebnisse beim Tiere, als auch auf jene bei Kindern eine derartige Verschlechterung und Unsicherheit erfahren würden, daß hiedurch ein ausreichender Impfschutz direkt in Frage gestellt wäre. Eine derartige Erscheinung ist jedoch bei rationellem Betriebe so gut wie ausgeschlossen und sie ist auch in der Wiener Staatsimpfanstalt, wo seit mehr als 12 Jahren die Retrovaccination ausschließlich und streng methodisch geübt wird, niemals beobachtet worden. Individuelle Schwankungen des Impferfolges kommen natürlich beim Tiere ebenso häufig, wie beim Menschen, auch bei Anwendung tadellosen Impfstoffes und bei Einhaltung identischer Impfmethoden vor. Diese Verschiedenheiten beruhen jedoch keineswegs auf einer minderen Qualität des Impfstoffes, sondern auf dem individuell variablen Grad der vaccinalen Empfänglichkeit. Die vaccinale Virulenz der frischen Retrovaccine ist nach unseren Erfahrungen im Gegenteil beinahe durchweg zu groß, so daß sie durch eine entsprechende Behandlung des Impfstoffes (Ablagerung) erst abgestumpft werden muß, um bei der Verimpfung an Kindern nicht zu unerwünscht heftigen Reaktionserscheinungen Anlaß zu geben.

Virulenzabschwächung einzelner Lympheserien aus unbekannten Gründen kommt bisweilen auch vor. In der Regel muß eine solche auf zu lange Aufbewahrung zurückgeführt werden.

3. Vorbereitung der Impftiere für die Vaccination.

Im folgenden soll der Vorbereitungsmodus geschildert werden, wie er in der Wiener Staatsimpfanstalt gehandhabt wird, da er mehr oder weniger jenem aller größeren Impfinstitute entspricht, wobei allerdings in Betracht gezogen werden muß, daß hier ausschließlich Jungrinder verwendet werden, während in den meisten Impfanstalten, so z. B. im Deutschen Reiche und in Frankreich, fast nur Schlachtkälber diesem Zwecke dienen.

Mehrfache üble Erfahrungen und Betriebsstörungen aus Anlaß einer lange währenden und ausgebreiteten Epizootie (Maul- und Klauenseuche) gaben die Veranlassung, eine sechstägige Kontumazierung der für Impfzwecke auf dem Zentralviehmarkte für unser Institut angekauften Rinder einzuführen, die sich in der Folge bestens bewährt hat. Es wurde zu diesem Zwecke ein eigener Beobachtungsstall eingerichtet und für gesonderte Wartung der daselbst eingestellten Impftiere Sorge getragen. Die Beobachtungsfrist wurde mit sechs Tagen aus dem Grunde festgesetzt, weil die Inkubationsdauer der Maul- und Klauenseuche, welche

Epizootie hier zumeist in Betracht kommt, ungefähr ebensolange währt. Diese Kontumazierung der Impftiere verteuert allerdings den Betrieb und ist nicht überall, namentlich bei Benützung von Schlachtkälbern, leicht durchzuführen, erscheint jedoch gleichwohl geboten, weil sich Maul- und Klauenseuche gleichzeitig mit den Impfpocken entwickeln und zum Ausbruch gelangen kann. Diese beiden Prozesse stören einander in ihrer Entwicklung nicht im geringsten, wie dies ein in unserer Anstalt vorgekommener Fall klar erweist, der im Jahresbericht der Impfstoffgewinnungsanstalt pro 1898 (Zeitschrift „Das österr. San.-Wes." 1900, Nr. 36—40) veröffentlicht worden ist. Der Blasenausbruch erfolgte damals am 7. Tage, an welchem auch die Schutzpocken ihr Höhestadium erreicht hatten. Bei einer allfälligen Abnahme der letzteren in einem früheren Stadium, etwa am vierten oder fünften Tage, wie dies bei Schlachtkälbern die Regel ist, die ja sofort nach der Abimpfung geschlachtet werden, wären die lokalen Symptome der Seuche noch nicht manifest gewesen, und es hätte sehr leicht der Fall eintreten können, daß bei wahrscheinlich negativem Schlachtungsbefunde ein Impfstoff in Zirkulation gesetzt worden wäre, der von einem infizierten Tiere stammte. Dieser Umstand gebietet bei der Übertragbarkeit der Maul- und Klauenseuche von Tier auf Mensch und bei den noch immer recht dunklen Wegen des Ganges dieser Infektionskrankheit so lange Vorsicht, als nicht durch einwandfreie experimentelle Untersuchungen die absolute Unmöglichkeit ihrer Übertragbarkeit durch perkutane Impfung sicher erwiesen erscheint.

Die „Tuberkulinprobe" behufs Frühdiagnose der Perlsucht, die ich vor einer Reihe von Jahren an einer Serie von Impftieren durchgeführt habe, mußte wieder aufgegeben werden, da die injizierten Tiere eine Überempfindlichkeit gegen Vaccine aufwiesen. Diese Überempfindlichkeit äußerte sich durch das Auftreten hochgradiger Ödeme der vaccinierten Bauchhaut, die auch die Beschaffenheit der Schutzblattern ungünstig beeinflußten. Die Pocken entwickelten sich zwar kräftig, waren jedoch stark von einer gummischleimähnlichen fadenziehenden Flüssigkeit imbibiert, welche die Haltbarkeit der daraus erzeugten Lymphe bedeutend beeinträchtigte, ganz abgesehen davon, daß der Rohstoff ein unappetitliches Aussehen darbot.

Als Impffeld benutzte man ursprünglich den unrasierten Milchspiegel (das Euter) der Kühe an der Ursprungsstelle der Striche (Zitzen), die Labien der Vulva, später auch den Hodensack der Stiere. Gegenwärtig dient als Impffeld die rasierte Bauchhaut einschließlich des Milchspiegels bzw. des Hodensackes bis drei Handbreiten oberhalb des Nabels (gegen das Brustbein zu), vielfach auch noch die inneren Schenkelflächen und der Damm. In Frankreich wird auch die rechte Seitenfläche des Thorax als Impffläche benutzt. Die sogenannte Rückenimpfung, von Freund empfohlen, wird gegenwärtig wohl nicht mehr geübt, weil die Rückenhaut der Rinder zu derb, stark pigmentiert und mit zu dichtem Haarwuchs versehen ist. Auch entwickeln sich dort erfahrungsgemäß, besonders bei größeren Tieren, die Pocken nicht so ansehnlich und saftreich wie auf der zarten Bauchhaut. Die Innenflächen der Schenkel eignen sich trotz der Zartheit und Geschmeidigkeit der Haut an diesen Stellen als Impffeld nur wenig. Die daselbst lebhafter erfolgende Transpiration bzw. die behinderte Schweißverdunstung durch die sich berührenden Hautflächen in der Schenkelbeuge bedingt nämlich eine Mazerierung der sich im übrigen dort sehr kräftig entwickelnden Schutzblattern, namentlich bei Impfungen in der warmen Jahreszeit, wodurch

sie eine schmierige, unappetitliche Beschaffenheit annehmen. Aus diesem Grunde wird in unserem Institut schon seit Jahren von der Impfung der inneren Schenkelflächen abgesehen. Der Damm, dessen Haut an sich der Pockenentwicklung ein günstiges Feld bietet, wird in unserem Institut deshalb nicht geimpft, weil der später zu schildernde Tegminverband dort schlecht haftet und diese Region Verunreinigungen stark ausgesetzt ist.

Die Impftiere werden bei uns zur Vaccination auf folgende Weise vorbereitet: Nach Absolvierung der sechstägigen Kontumazfrist werden die in den Impfstall überstellten Impftiere 24 Stunden vor der Impfung gründlich gereinigt und rasiert. Vor dem Rasieren des Impffeldes, das die Bauchfläche mit dem Milchspiegel (Euter) bzw. dem Hodensacke bis zwei Handbreiten vor dem Nabel (gegen das Brustbein zu) umfaßt, wird zunächst das Haar mittels einer Maschinenschere (Tondeuse) abgeschoren. Dem Rasieren unmittelbar die Vaccination folgen zu lassen empfiehlt sich nicht, weil die hiebei entstehenden zahlreichen kleinen Exkoriationen zur Entwicklung von Nebenpocken Veranlassung geben und diese eine möglichst blutfreie Abnahme (Kürettierung) der Impfpocken verhindern.

Fig. 1.

Eine entsprechende Lagerung und Fesselung der Impftiere auf einem zweckmäßig konstruierten Impftische ist eine unbedingte Notwendigkeit. Man verwendet allgemein sogenannte Klapptische nach dem Muster der holländischen Impfanstalten (Fig. 1). Die auf einem soliden Gestelle ruhende starke Tischplatte aus Eichenholz ist mittels eiserner Scharniere derartig befestigt, daß sie leicht heruntergeklappt und in eine

senkrechte Stellung gebracht werden kann. Das Tier wird im Stehen an die heruntergeklappte Tischplatte angeschnallt und mit ihr zugleich gehoben bzw. auf die linke Seite gelegt. Der Kopf, die Vorderbeine und das linke Hinterbein werden mittels passenden Schnallenriemenwerkes fixiert. Um das Fesselgelenk des rechten Hinterfußes wird eine Ledermanschette gelegt, an der ein Seil befestigt ist, mit dem das rechte Hinterbein an einer senkrecht stehenden, an der linken hinteren Tischecke befestigten Eisenstange hinaufgezogen und fixiert wird. Die Bauchfläche (das Impffeld) erscheint dadurch dem Operateur zugewendet (Fig. 2).

Für größere Jungrinder bedarf der Impftisch einer stärkeren Konstruktion und einer Vorrichtung (Zahnrades) zum Horizontalstellen der Tischplatte. Ein außerordentlich zweckmäßiger Impftisch wurde von

Fig. 2.

Widenmann in Stuttgart angegeben. Ein solcher steht seit vielen Jahren auch in unserer Anstalt in Verwendung und hat sich vorzüglich bewährt. Der nach dem Stuttgarter Modell (Fig. 3) von dem Wiener Mechaniker A. Csokor verfertigte Impftisch hat einige Verbesserungen aufzuweisen.

Für vollständig ausgewachsene Rinder (im Gewichte von 500—800 kg) genügt auch dieser Tisch nicht. Carini hat zu diesem Behufe einige

Modifikationen an dem Stuttgarter Modell vorgeschlagen, die sich in dem Impfinstitute in Bern vorzüglich bewährt haben sollen. Dieselben bestehen in einer stärkeren Konstruktion und in einer muldenförmigen Krümmung der Tischplatte, deren vordere Kante etwas höher steht als die hintere, wodurch sie etwas schräg nach hinten abfällt. Hierdurch kommt das Tier mehr auf den Rücken zu liegen und das Körpergewicht trifft dann nicht ganz die linke Hüfte, so daß infolgedessen bei wiederholter Lagerung namentlich bei unruhigen Tieren nicht so leicht tiefe Hautwunden und Quetschungen vorkommen können wie bei vollkommen horizontal gestellter und gerader Tischfläche. Carini hat auch der Eisenstange zur Fixierung des rechten Hinterbeines, die bei dem Stuttgarter Modell senkrecht steht, eine Krümmung in einem Winkel von

Fig. 3.

45 Grad und außerdem eine dem Hinterbeine entsprechende Biegung gegeben, wodurch nicht nur eine verläßlichere Fixierung ermöglicht, sondern auch die Spannung vermindert wird, die bei den ruckweisen Bewegungen, welche die Tiere häufig ausführen, um sich aus ihrer unbequemen Lage zu befreien, nicht selten zu erheblichen Suffusionen, ja selbst zu Muskelzerreissungen führen kann.

Die Fesselung und Lagerung der Impftiere muß streng methodisch geschehen und ist von einem geschulten Personal selbst bei Verwendung großer Tiere ohne Schwierigkeit und ohne Gefahr für die Beteiligten durchführbar. Der hierbei einzuhaltende Vorgang läßt sich schwer beschreiben und kann nur am Objekt selbst erlernt werden.

Unmittelbar vor der Vaccination wird das Impffeld zunächst gründlich mechanisch gereinigt. Man bedient sich hierbei der Schmierseife und Bauschen von Holzwolle, die in Verbandgaze eingehüllt sind, um Exkoriationen der Haut zu vermeiden. Nach der mechanischen Reinigung wird das Impffeld mit 2 %iger Lysollösung durch ungefähr zwei Minuten reichlich bespült und dabei gleichzeitig mit Gazebauschen abgerieben, hierauf mit lauwarmem Wasser reichlich abgeschwemmt und zuletzt mit sterilen Gazebauschen abgetrocknet. Die Lysoldesinfektion des Impffeldes wurde im Jahre 1896 von mir über Empfehlung Prof. Max Grubers in die animale Impfpraxis eingeführt und hat sich bestens bewährt. Lysol ist hier deshalb die zweckmäßigste Desinfektionsflüssigkeit weil es infolge seines Seifengehaltes die Fähigkeit besitzt, die fette Hautoberfläche der Rinder zu benetzen ohne abzurollen und dadurch den gewünschten Desinfektionseffekt herbeizuführen.

4. Vaccination der Impftiere.

Die üblichen Impfmethoden sind:

1. Der Stich (holländische Methode) wird gegenwärtig kaum mehr geübt, da die Ausbeute an Impfstoff hierbei viel zu gering ist.

2. Schmale, bandförmige Exkoriationen von ca. 5 cm Länge senkrecht auf die Längsachse des Tieres. Diese Methode, meines Wissens gegenwärtig nicht mehr geübt, hat den Nachteil, daß die zentralen Krusten zu breit werden und der eigentliche Pockenkörper nur in Form eines schmalen Saumes sich entwickelt.

3. Die Skarifikationsmethode oder die sogenannte Pfeiffersche Flächenimpfung. Dieselbe wird nach Pfeiffers Vorschrift folgendermaßen ausgeführt: Zunächst wird eine 3—4 qcm große Stelle entweder durch kleine Kreuzschnittchen oder durch sich kreuzende regelmäßige Schraffierung mittels eines dreiklingigen Bistouris skarifiziert. Das austretende Blut wird mit einem scharfen Knochenlöffel weggestrichen und auf die skarifizierte Fläche humanisierte Lymphe in einer Menge, die ungefähr zur Impfung von drei Kindern hinreichen würde, gebracht und mit einer stumpfen Lanzette und dem Rücken des Beinlöffels eingerieben. Alsdann wird mit der weiteren Anlage von gleich großen Impfflächen fortgefahren. In der unmittelbaren Umgebung der Skarifikationsflächen und in der linea alba inseriert man mittels 2 cm langer Ritzer oder Kritzelschnittchen noch eine Reihe von isolierten Impfstellen, aus deren Beschaffenheit man später die regelrechte oder abortive Entwicklung der Vaccine innerhalb der Fläche leicht und sicher abschätzen kann (vgl. Fig. 2). Die Schwäche dieser Methode liegt also darin, daß die Qualität der Vaccine nicht schon aus dem Aussehen der Skarifikationsflächen selbst verläßlich beurteilt werden kann, wie dies bei der Stichmethode oder der folgenden Impfmethode der Fall ist. Bei Verwendung von Schlachtkälbern, die nur eine kleine Impffläche bieten, mag diese Methode ihre Vorteile haben, weil der Impfstoffertrag hierdurch wesentlich gesteigert wird. Bei Jungrindern ist dieselbe nicht rationell.

4. Die sogenannte Schnittmethode ist gegenwärtig mit Recht die verbreitetste. Mit einer spitzen, nicht zu scharfen Lanzette werden

seichte Ritzer von beliebiger Länge entweder parallel der Längsachse oder senkrecht auf dieselbe gemacht, die die Epidermis durchdringenden Papillarkörper jedoch nur streifen sollen, so daß ein blutig tingierter, jedoch nicht stärker blutender Strich entsteht. Wir legen die Ritzer in einer Länge von ungefähr 10 cm, entsprechend der Längsachse des Tieres in einem Abstande von 2 bis $2^1/_2$ cm voneinander an, wobei die Ritzer in einer fortlaufenden Geraden angeordnet sind. Die schachbrettartige Anordnung der Impfritzer (die „disposition en quinquonze" der Franzosen) halte ich nicht für zweckmäßig, weil man bei der Kürettierung der Pocken den Rohstoff nicht blutfrei abnehmen kann. Wir bedienen uns zur Impfung der Chalybäusschen Impflanze (Fig. 4), die vor jedem Strich mit Lymphe armiert wird. Über eine Länge von

Fig. 4.

10 bis 12 cm pro Strich gehe ich deshalb nicht hinaus, um den Impfstrich in einem Zuge und seiner ganzen Länge nach genügend mit Lymphe imprägnieren zu können, wodurch ein nachträgliches Einstreichen der Lymphe entbehrlich wird. Die horizontale Anordnung der Impfpritzer ist der vertikalen deshalb vorzuziehen, weil die inserierte Lymphe sich gleichmäßig längs des ganzen Impfstriches verteilt, während sie sich andernfalls am unteren Ende des vertikal angelegten Impfritzers in Tropfenform ansammelt und zum größten Teile wieder ausfließt. Auch gestaltet sich die Impfstoffabnahme bei wagrechter Schnittführung weit bequemer als bei lotrechter. Die Einhaltung eines entsprechenden Abstandes zwischen den Schnittreihen (2 bis $2^1/_2$ cm) ist deshalb geboten, weil erfahrungsgemäß bei dichterer Anordnung die Impfpocken sich nicht so gut entwickeln und die blutfreie Abnahme derselben Schwierigkeiten begegnet.

Unmittelbar nach vollzogener Impfung legen wir den sogenannten Tegminverband an, der von mir im Jahre 1897 in die animale Impfpraxis eingeführt worden ist und sich bisher als einziges rationelles Deckmittel der Impfstellen bewährt hat.

Das Tegmin ist eine glatte schmiegsame Pasta aus einem Gemenge von reinstem Bienenwachs, feinstem Gummi arabicum, Wasser, Glyzerin und Zinkoxyd, die im Jahre 1882 über Anregung des Wiener Arztes S. Kohn (Krüger) von dem Wiener Apotheker B. Rothziegel erfunden und ursprünglich unter der Bezeichnung Zinkepidermin als Deckmittel bezw. Vehikel in die dermatologische Praxis eingeführt worden ist, ohne indessen eine besondere Beachtung oder vielseitige Anwendung gefunden zu haben. Krüger hatte mich seinerzeit, als ich für die Befestigung der von mir im Jahre 1896 beschriebenen, jedoch als zu umständlich bald wieder aufgegebenen Gazeverbändchen zum Schutze der Impfstellen ein reizloses Fixationsmittel suchte, auf das Epidermin aufmerksam gemacht, das ich als solches auch akzeptierte. Auch als Deckmittel für die entwickelten Schutzblattern bei Kindern habe ich das Epidermin auf Anraten Krügers einige Zeit angewendet und empfohlen, diese Empfehlung jedoch später widerrufen, weil die weiteren Erfahrungen diese Anwendungsweise des Epidermins als irrationell erscheinen ließen. Die in der Folge angestellten Versuche, das Epidermin als Deckmittel für die tieri-

schen Pocken zu verwenden, traten erst dann in ein für das weitere Schicksal dieser uns jetzt geradezu unentbehrlichen Pasta entscheidendes Stadium, als ich die Wahrnehmung machte, daß dieses Präparat eine bestimmte Menge entfetteter Watte zu binden vermöge und sich mit derselben zu einem rasch trocknenden, zähen und dabei doch elastischen Überzug vereinige, der hinreichende Fixations- und Klebekraft besitzt, die Haut absolut nicht reizt, die Entwicklung der Schutzblattern nicht beeinträchtigt und ohne Verletzung derselben durch einfaches Abziehen entfernt werden kann.

Der Erzeuger des Zinkepidermins hat in der Folge über meinen Vorschlag das für Impfzwecke unter streng aseptischen Kautelen hergestellte und verfüllte Präparat unter den Namen „Tegmin" in den Handel gebracht. Unter dem „Tegminverband" versteht man gegenwärtig in Fachkreisen allgemein die Verbindung des aufgestrichenen Tegmins mit einer dünnen Lage Brunsscher Watte. Seit März 1897 wird der Tegminverband in der Wiener Staatsimpfanstalt ausnahmslos bei allen Impftieren angewendet und hat sich nicht nur hier, sondern auch in vielen anderen Impfanstalten als souveränes Deckmittel des Impffeldes bewährt.

Da die Bedeutung des Tegminverbandes für die keimarme Gewinnung des Impfstoffes später an zuständiger Stelle noch eingehend erörtert werden muß, so soll im folgenden nur seine Applikationsmethode geschildert werden.

Das Tegmin, für animale Zwecke in Glastiegeln von 100 g Inhalt verwahrt, wird mittels eines entsprechend gebogenen Metallspatels (Fig. 5) auf das Impffeld in dicker Schicht möglichst gleichmäßig aufgestrichen, was mit einer gewissen Raschheit erfolgen muß, weil das Tegmin ziemlich rasch eintrocknet und die Watte von der trocknen Tegminoberfläche nicht aufgenommen wird. Über die noch nasse Tegminschicht werden dachziegelförmig ca. 20 cm lange und 12 cm breite Tafeln Brunsscher Watte gelegt und mit der flachen Hand angedrückt. Die überschüssige Watte wird durch Abzupfen entfernt. Es darf nur so viel Watte zurückbleiben, als das Tegmin zu binden vermag. Ein kunstgerecht angelegter Verband hält sich in der Regel zweimal 24 Stunden, zuweilen noch länger und muß nach dieser Zeit erneuert werden. Derselbe läßt sich in großen zusammenhängenden Stücken leicht abziehen. Das Impffeld soll vor der Applikation eines neuen Verbandes nicht naß behandelt, sondern an den etwa verschmutzten Stellen mit sterilen Gazebauschen trocken rein gerieben werden. Hauser in Karlsruhe empfiehlt, den Tegminverband nicht als zusammenhängende Decke, sondern in Parzellen zu applizieren, da er dann verläßlicher haften soll. Bei Schlachtkälbern, die eine faltenreiche, ziemlich dünne Bauchhaut besitzen, haftet der Tegminverband nicht so gut, wie bei größeren Jungrindern. Die Abbildung Fig. 6 zeigt einen anliegenden Tegminverband zweimal 24 Stunden nach der Applikation, Fig. 7 einen solchen, zur Hälfte abgezogen, unmittelbar vor der Abnahme der Pocken.

Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 7.

5. Entwicklungsprozeß der tierischen Schutzblattern.

Die tierischen Schutzpocken weisen sowohl bezüglich der Entwicklungsdauer als auch bezüglich der lokalen und allgemeinen Reaktionserscheinungen erhebliche Abweichungen von den menschlichen Schutzblattern auf. Schon 24 Stunden nach der Vaccination von Jungrindern (Färsen, Kalbinnen oder Bullen) umgibt sich der Ritzer im Falle erfolgter Haftung mit einem schmalen roten Saume. Nach abermals 24 Stunden hat sich der Ritzer in eine leicht erhabene, schmale Leiste von zart rosenroter Färbung verwandelt (das papulöse Stadium der Schutzpocke). Diese Leiste wächst rasch zu dem charakteristischen Vaccinebläschen aus, das je nach Klima und Jahreszeit nach Ablauf von fünf bis sechs Tagen (120—144 Stunden) den Höhepunkt seiner Reife zu erreichen pflegt. Die Abbildung Fig. 8 zeigt typisch entwickelte tierische Schutzblattern auf der Höhe ihres Reifestadiums. Die voll entwickelte Schutzpocke hat die Form einer langgestreckten Kaffeebohne, besitzt eine zentrale Depression, die „Delle", deren Ausdehnung genau dem Impfritzer entspricht. Der diese Delle umgebende Wulst, der eigentliche Pockenkörper, hat bis zum fünften Tage, oft auch noch länger, zumeist einen perlfarbenen Glanz, der auf der Höhe des Reifestadiums eine kreidige oder gelblichweise Farbe annimmt. Die Ränder typisch entwickelter Pocken sind in der Regel leicht wellig oder unregelmäßig gebuchtet. In ihrer Kontinuität unterbrochene Pocken, die ein perlschnurartiges Aussehen darbieten, deuten auf abgeschwächte Stammlymphe oder auf eine verminderte vaccinale Empfänglichkeit des betreffenden Impftieres.

Die Konsistenz der voll entwickelten Schutzpocke ist verschieden und dem Grade der individuellen Empfänglichkeit, von der Beschaffenheit der Haut, von der Jahreszeit usw. abhängig. Vollkommen geschlossene, saftstrotzende, perlfarben schimmernde Pocken von imponierender Größe, die dem tastenden Finger den Eindruck der Knorpelhärte machen, wechseln mit schmalen, saftarmen, gelblich gefärbten, zur Vertrocknung neigenden Pocken oder solchen ab, deren Gewebe so aufgelockert sein kann, daß ein Teil der Pockendecke bei der Abnahme des Tegminverbandes an diesem hängen bleibt. Dazwischen gibt es zahlreiche Übergangsformen. Es ist nicht immer ganz leicht und nur Sache längerer Erfahrung, die Eignung atypisch entwickelter Schutzpocken zur Lymphebereitung zu bestimmen. Denn der äußere Habitus der Pocke allein läßt nicht immer bestimmte Schlüsse auf die Stärke und Reinheit der spezifischen Virulenz, sowie auf die voraussichtliche Haltbarkeit der daraus bereiteten Lymphe zu. Nur deutliche Zeichen einer abortiven Entwicklung bei vorausgegangenem überstürztem Verlaufe des Entwicklungsprozesses schließen die Verwendbarkeit der Pocken aus. Auch der Gehalt an Fremdkeimen ist von der Entwicklungsform der Schutzpocke ganz unabhängig. Gelblich gefärbte, aufgelockerte, anscheinend vereiterte Pocken können eine a priori keimarme Lymphe liefern, während vollkommen geschlossene, perlartig schimmernde Pocken eine unendlich große Menge von Staphylokokken enthalten können, wie ich mich wiederholt zu überzeugen Gelegenheit hatte. Nur eine Abart, eine im übrigen ansehnliche und üppig entwickelte Pockenspecies, die eine reichliche Menge eines trüben, fadenziehenden, gummischleimähnlichen Serums enthält (ich möchte sie „Schleimpocken" nennen), kann man von vornherein als zur Lymphebereitung nur wenig geeignet bezeichnen, da ihre vaccinale Virulenz an und für sich schwach und rasch vergänglich ist.

Fig. 8. Unter Tegminverband gezüchtete tierische Impfpocken auf der Höhe ihrer Entwicklung nach 6 × 24 Stunden. (Ungefähr 1/5 der natürlichen Größe; die zentralen Depressionsstreifen erscheinen in natura nicht dunkelgefärbt, sondern lichtgelb.)

Noch eine Eigenart der tierischen Schutzpocke gegenüber der menschlichen soll erwähnt werden: während bei der menschlichen Schutzpocke das in ihren Fächern eingeschlossene Serum, die Lymphe, sofort in Form von wasserklaren Tröpfchen hervorquillt, wenn man das Bläschen ansticht, so ist dies bei der tierischen Schutzblatter nicht der Fall. Man kann letztere selbst mittels breiter Einstiche öffnen, ohne daß die geringste Menge flüssiger Lymphe hervortritt. Um dies zu erreichen, muß man erst die Pockenbasis mittels einer Klemmpinzette komprimieren, eine Methode der Gewinnung tierischer Pockenlymphe, von der noch später die Rede sein wird.

Die Reaktionszone (Areola) ist bei der Tierpocke auch auf der Höhe ihrer Entwicklung nur 1—2 mm breit. Die Cutis und Subcutis zeigt verschiedene Grade entzündlicher Infiltration (kollaterales Ödem), die sich ausnahmsweise zu recht bedeutender Schwellung der Bauchhaut steigern kann. Die früher nicht gar so selten beobachteten Schwellungen der Bauchhaut bei den geimpften Tieren sehen wir seit der im Jahre 1895 in unserem Institute von mir eingeführten energischen Desinfektion des Impffeldes vor der Impfung und vor der Pockenabnahme, sowie seit der Anwendung des Tegminverbandes nur in äußerst seltenen Ausnahmsfällen. Ich glaube daher annehmen zu dürfen, daß diese Ödeme nicht etwa die Wirkung einer rein vaccinalen Irritation bei besonders empfindlichen Tieren, sondern jene einer zufälligen Infektion mit pathogenen Fremdkeimen darstellen.

Die Rückbildung der Tierpocke erfolgt auch rascher als jene der Schutzblatter beim Menschen. Nach ungefähr 156 Stunden, bisweilen auch früher, sinkt der zentrale Teil der Pocke stärker ein und bedeckt sich zunächst mit einer gelblichen, dann sehr rasch sich verbreiternden und braun werdenden, bandartigen Borke, während der Pockenrand noch durch zwei Tage peripheres Wachstum zeigt. Nach 8—10 Tagen ist die Vertrocknung beendet und nach 14—20 Tagen fällt die dunkelbraune Borke unter Hinterlassung einer oberflächlichen glänzenden Narbe ab. Bei Saugkälbern, deren Haut viel zarter und das Gewebe offenbar weniger widerstandsfähig ist, spielt sich die Entwicklung und Rückbildung der Schutzblattern bedeutend rascher ab. Die Schutzblattern erreichen niemals die Größe jener bei Jungrindern und scheinen im allgemeinen eine nicht so konstant haltbare Lymphe zu liefern, wie diese. Die Zeit der Pockenreife schwankt bei Saugkälbern zwischen 3—5 Tagen.

Die in der älteren Literatur häufig vorkommende Angabe, man müsse die tierischen Pocken möglichst frühzeitig, jedenfalls aber noch vor dem Eintritte ihrer „Vereiterung“ und vor dem Erscheinen heftiger Reaktionserscheinungen in der Umgebung derselben abnehmen, bedarf wenigstens bezüglich des Befundes bei größeren Jungrindern einer Korrektur. Zu einer Vereiterung im vulgären Sinne kommt es bei den Tierpocken der Jungrinder überhaupt nicht, ebensowenig zu einer stärkeren Areolabildung. Das Akmestadium der Pockenentwicklung geht sehr rasch und unvermittelt in jenes der Vertrocknung über. Es handelt sich bei der Rückbildung der Schutzpocke nicht um einen fortschreitenden Eiterungsprozeß, sondern um die Folgeerscheinungen einer Koagulationsnekrose des Pockengewebes. Die Furcht, daß der aus überreifen, „vereiterten“ Schutzpocken bereitete Impfstoff heftige Impfreaktionen oder sonst welche üblen Zufälle hervorbringen könnte, ist vollständig unbegründet. Die aus überreifen, also bereits in der Rückbildung befindlichen Schutzpocken

hergestellte Lymphe zeigt im Gegenteile Abschwächung ihrer spezifischen Virulenz. Überreife Schutzblattern geben also einzig und allein aus letzterwähntem Grunde ein ungeeignetes Rohmaterial zur Lymphebereitung.

Bezüglich der allgemeinen Impfreaktion bei großen Tieren ist folgendes zu bemerken:

Die Normaltemperatur von Jungrindern schwankt zwischen 38—39° C. In den ersten drei Tagen nach der Impfung zeigen die Jungrinder gewöhnlich eine abendliche Steigerung ihrer Körperwärme um wenige Zehntelgrade. Nur am Abende des 5. Tages erhebt sich die Temperatur zu 40° und darüber, um rasch wieder abzufallen. Am 7. Tage, an welchem gewöhnlich der Höhepunkt der Pockenreife erreicht ist, pflegt die Temperatur wieder nahe zur Norm abgesunken zu sein.

Das Allgemeinbefinden der Jungrinder, insbesondere ihre Freßlust, ist während des ganzen Vaccinationsprozesses nur wenig gestört. Nur sehr empfindliche Tiere erleiden einen Gewichtsverlust, der indessen nie bedeutend ist. Die Inguinaldrüsen schwellen in der Regel zu faustgroßen Tumoren an, was man schon beim bloßen Aspekt wahrnehmen kann. Auch die Mesenterialdrüsen zeigen deutliche Vergrößerung und stärkere Sukkulenz.

6. Abnahme, Verarbeitung und Konservierung des Impfstoffes.

Die älteste Methode der Abnahme und Verwendung der tierischen Lymphe ist die Eröffnung der Tierpocke mittels der Impflanzette, darauffolgende Armierung der letzteren mit dem Inhalte der Schutzblatter und unmittelbare Überimpfung auf den Kindesarm, so wie man es bei der üblichen Impfmethode von Arm zu Arm zu tun gewohnt war. Diese direkte Übertragung nahm man in den frühesten Perioden nach der Entdeckung der Vaccination zur Auffrischung oder Regeneration der humanisierten Lymphestämme vor, deren Degeneration man befürchtete. Erst weit später wandte man sich, dem Beispiele Negris folgend, der Verwendung animaler Lymphe in konservierter Form zu und wählte zunächst jene Methoden, deren man sich auch zur Konservierung der humanisierten Lymphe bedient hatte: 1. Die flüssige Lymphe, das Pockenserum in Bretonneauschen Glasphiolen und 2. das auf Beinplättchen angetrocknete Serum oder die sogenannte Trockenlymphe.

Da jedoch die Tierpocke nur sehr wenig Serum enthält, das beim einfachen Anstechen derselben nicht hervorquillt, wie bei der menschlichen Schutzblatter, so muß man den Pockengrund beim Tiere erst einklemmen, um künstlich ein lokales Stauungsödem zu bewerkstelligen und Pockenserum zu erhalten. Lanoix führte zu diesem Zwecke die sogenannte Quetschpinzette, ein der Péanschen Schieberpinzette nachgebildetes Instrument mit langen kräftigen, an den Innenflächen gerippten Branchen ein. Mit dieser Quetschpinzette wird die Basis der Tierpocke gefaßt, durch Vorschieben der Sperrvorrichtung fixiert und so eine Kompression derselben bewirkt. Das rasch eintretende Stauungsödem führt zum Bersten des zentralen Teiles der Pocke und zum Hervorquellen des gelblichen, klebrigen Serums, das nur sehr wenig Formelemente enthält und deshalb arm an wirksamer Substanz ist. Frisch verimpft, gibt dieses Serum gute Impfresultate und Lanoix führte deshalb die Impfung „direkt vom Kalbe", die „Vaccination de pis à bras avec le vaccin

vivant" ein. Die flüssigen Konserven stellten das „vaccin liquide", die Trockenlymphe das „vaccin sec sur plaques ou pointes d'ivoir" dar.

Schon NEGRI, „der Vater der animalen Vaccination", hatte in richtiger Erkenntnis der Tatsache, daß die wirksame Substanz der Vaccine nicht an das Serum, sondern an die zelligen Bestandteile der Schutzblatter gebunden ist, die ganze mit ihrer Unterlage herausgeschnittene Tierpocke zu Impfungszwecken verwendet, die er in kleinen Fläschchen mit Korkverschluß an die Impfärzte versandte. Für ihre Verwendung gab er folgende Gebrauchsanweisung: „Man breite die ausgeschnittene Pocke so auf dem linken Daumennagel aus, daß ihre freie Oberfläche nach oben sieht, fixiere sie mit der linken Zeigefingerspitze und armiere die Impflanzette durch Abschaben der Pockensubstanz". Die Haftungsresultate mit diesem Impfstoff ließen nichts zu wünschen übrig, hingegen waren septische Infektionen damit gerade keine Seltenheiten. Die Masseninfektion in San Quirico d'Orcia im Jahre 1879, die durch Verimpfung von bereits in Fäulnis übergegangenen ausgeschnittenen Tierpocken verursacht worden war, hat in dieser Beziehung eine traurige Berühmtheit erlangt.

Was die Haltbarkeit der genannten Lymphepräparate anbelangt, die keine konservierenden Zusätze enthielten, so war nur die Trockenlymphe einigermaßen verläßlich. Die flüssige Lymphe zersetzte sich schon nach wenigen Tagen und wurde unwirksam. Die „imprägnierten Beinnadeln" beherrschten deshalb bis in die 70er Jahre des vorigen Jahrhunderts den Lymphemarkt. Die ziemlich umständliche Manipulation, um die Trockenlymphe gebrauchsfertig herzurichten (sie mußte sorgfältig mit einem Tropfen Wasser erweicht und dann in die Impfritzer eingerieben werden), sowie der relativ hohe Preis dieser Präparate waren nicht dazu angetan, die souveräne humanisierte Lymphe zu verdrängen und man verwendete die animale Trockenlymphe in der Regel nur dann zu den Impfungen der sogenannten Stammimpflinge, wenn erstere nicht zu Gebote stand. Die Unverläßlichkeit der damaligen Lymphepräparate veranlaßte ja LANOIX, die Impfung direkt vom Kalbe einzuführen, welche Methode in Frankreich und insbesondere in Paris bis in die allerjüngste Zeit die herrschende geblieben ist. Auch die bis heute beinahe allgemein in Ärzte- und Laienkreisen verbreitete Ansicht, daß man den tierischen Impfstoff „möglichst frisch" verwenden müsse, um befriedigende Impfresultate zu erzielen, ist auf diesen Umstand zurückzuführen.

Erst durch die Einführung des Glyzerins als Konservierungsmittel der Vaccine, die wir dem preußischen Impfdirektor Dr. E. MÜLLER in Berlin verdanken und durch die Verwendung des ganzen Pockengewebes zur Herstellung des Impfstoffes, die zuerst von BEZETH in Rotterdam im Jahre 1871 in Anlehnung an die alte italienische oder NEGRIsche Methode empfohlen worden ist, trat ein entscheidender Wendepunkt auf dem Gebiete der animalen Impftechnik ein, der das weitere Schicksal des tierischen Impfstoffes bestimmte. MÜLLER empfahl das Glyzerin allerdings nur als Konservierungs- und Vervielfältigungsmittel der humanisierten Vaccine, sprach jedoch schon damals die Hoffnung aus: „daß auch für die genuine Lymphe sich mit Wahrscheinlichkeit daraus würde Vorteil ziehen lassen, sowohl in bezug auf die Quantität als auch zur längeren Konservierung". BEZETH modifizierte das alte NEGRIsche Verfahren auf die Weise, daß er nicht die ganze Pocke mit der darunter liegenden Haut herausschnitt, sondern nur die Pockensubstanz vom Pockenboden abschabte und sie mit oder ohne Glyzerinzusatz zu

Impfstoff verarbeitete. Bezeth verfuhr dabei so, daß er die mit der Lanoixschen Quetschpinzette gefaßte Pocke bis auf ihren Grund, den Pockenboden, mit einem Bistouri abschabte und das Geschabsel, sofern es nicht gleich frisch verbraucht wurde, zwischen zwei dicken Glasplatten konservierte und diese luftdicht verkittete. Von Warlomont in Brüssel und seinem Nachfolger Degive wurde dieses Verfahren dann noch vervollkommnet. Warlomont verwarf die Konservierung der abgeschabten Pockensubstanz zwischen Glasplatten, weil das Trockenwerden des so verwahrten Pockendetritus nur sehr langsam erfolge und derselbe einer putriden Zersetzung verfalle, welche die wirksamen Elemente zerstöre und so das Präparat völlig unbrauchbar mache. Im Brüsseler Impfinstitut wurde anfangs der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts folgende Methode der Impfstoffgewinnung geübt:

Das Impffeld des auf dem Operationstisch gefesselten Impftieres wurde mittels eines in kaltes oder lauwarmes Wasser getauchten leinenen Tuches abgewaschen. Dann faßte man nach der Methode von Lanoix nacheinander die Basis jeder einzelnen Pocke mit der Klemmpinzette. Von den so fixierten Pocken entfernte man mit einer stumpfen Lanzette die zentralen Krusten, wischte mit einem reinen leinenen Tuche etwa aussickerndes Blut ab und schabte die ganze weiche Pulpamasse ab. Die so gewonnene Pockenpulpa (der Rohstoff, la pulpe vaccinale brute) wurde in eine kleine Porzellanschale gebracht und diente als Grundlage folgender Lymphepräparate: a) la pulpe glycerinée, b) la pulpe glycerolée, c) le vaccin liquide, d) le vaccin sec sur pointes d'ivoire ou en poudre.

Die Pulpe glycerinée wurde so hergestellt, daß man den Rohstoff zur Hälfte oder zu einem Dritteil seines Gewichtes mit chemisch reinem Glyzerin versetzte und in seiner Porzellanreibschale zu einer homogenen Paste von Sirupkonsistenz vertrieb. Diese Glyzerinpulpa wurde in kleine Glasfläschchen mit Korkverschluß gefüllt, war sehr virulent, diente ausschließlich zu Kälberimpfungen und erwies sich als ein monatelang haltbares Präparat.

Die Pulpe glycerolée bestand aus einer Mischung der oben erwähnten Glyzerinpulpa mit Glyzerinstärkepasta zu gleichen Teilen. Die Paste war ebenfalls sehr wirksam und lange haltbar, wurde zwischen Glasplatten mit einer zentralen Delle verwahrt und für Kinderimpfungen sehr häufig verwendet.

Der „Vaccin liquide“ wurde aus der Pulpe glycerinée hergestellt, die man durch ein feines Kupferdrahtnetz passierte und mit etwas destillierten Wassers bis zur leichtflüssigen Konsistenz versetzte. Versendet wurde diese Emulsion in Bretonneauschen Röhrchen, die auf kaltem Wege durch rasches Einstoßen der beiden Enden in eine erstarrte Mischung von Talg und Paraffin verschlossen wurden.

Die Imprägnierung der Elfenbeinplättchen (plaques ou pointes d'ivoire) erfolgte durch Eintauchen ihrer zugespitzten Schmalseiten in die Glyzerinpulpa. Die Trocknung geschah in der Sonnenglut oder auf einem gewöhnlichen offenen Herde, dessen Temperatur jedoch die Temperatur von 25° R nicht übersteigen durfte. Schließlich überzog man die imprägnierten Plättchenspitzen mit Gummi arabicum.

Das im Jahre 1881 von Reissner in Darmstadt eingeführte und nach ihm benannte Impfpulver (vaccin en poudre) wurde auf folgende Weise bereitet: der frische Pockendetritus wurde auf Glasplatten gestrichen und diese dann in einen Schwefelsäureexsikkator gebracht, der außerdem mit einer Wasserstrahlluftpumpe in Verbindung stand, um die Austrock-

nung zu beschleunigen. Der längstens nach Ablauf von 24 Stunden vollkommen trockene Rohstoff wurde dann zu einem feinen Pulver zerrieben und in kleine Pappschachteln verwahrt. Das Impfpulver mußte an völlig trockenem Orte aufbewahrt werden, um eine Zersetzung desselben zu verhindern.

Reissner war es auch, der das Quetschen der Pocken als umständliche, tierquälerische und dabei völlig überflüssige Prozedur verwarf und den Volkmannschen scharfen Löffel, die Kurette, zum Abschaben der Pockensubstanz empfahl.

Das vormals viel verwendete Pissinsche Glyzerinextrakt wurde durch Auslaugung des verriebenen Rohstoffes mit Glyzerinsalizylwasser und nachfolgender Dekantierung gewonnen.

Eine anscheinend unwesentliche und doch überaus wichtige Manipulation, die gründliche Verreibung des Rohstoffes mit dem Glyzerin zu einer emulsionartigen Flüssigkeit war für das Schicksal der animalen Vaccination namentlich in Deutschlaed und Österreich von ausschlaggebender Bedeutung. Das Übersehen oder wenigstens die Unterlassung des Hervorhebens der großen Wichtigkeit dieser Prozedur verhinderte die rasche Verallgemeinerung der animalen Lymphe, obgleich schon im Jahre 1874 in Mailand vom „Comitato Milanese di vaccinazione animale“ ein Präparat, die durch sorgfältige Verreibung unter Glyzerinzusatz hergestellte sogenannte Impfpasta, eingeführt und auch außerhalb Italiens vielfach mit sehr gutem Erfolge erprobt worden war.

Risel in Halle hat im Jahre 1883 in der Frühjahrsversammlung des Anhaltiner Ärztevereins zuerst die Glyzerinemulsion oder die Glyzerinlymphe, eine sorgfältige Verreibung des Rohstoffes mit wasserhaltigem Glyzerin im Verhältnisse von einem Teil Rohstoff zu zwei bis drei Teilen Glyzerin beschrieben und empfohlen. L. Pfeiffer, Wesche, Chalybäus, Hay, Heinrich, M. Bauer, Lilienfeld und viele andere haben dann weiterhin die Verreibungs- und Konservierungsmethoden der Lymphe vervollkommnet. Diese Glyzerinemulsion hat sich bis heute als herrschendes Präparat mit vollem Rechte behauptet. An Sicherheit der Haftung ist sie der humanisierten Lymphe vollkommen gleichwertig und übertrifft sie in mancher anderen Beziehung.

In der Wiener Staatsimpfanstalt wird bei der Abnahme, Verarbeitung und Verwahrung des Impfstoffes folgender Vorgang eingehalten:

Nach entferntem Tegminverband wird das Impffeld mit Schmierseife, warmem Wasser und Holzwollbauschen, die in Mull eingehüllt sind, gründlich gereinigt, wobei die an den Impfpocken noch haftenden wasserlöslichen Tegminpartikelchen mit entfernt werden. Hierauf wird die geimpfte Fläche mit $2\,^0/_0$iger Lysollösung überschwemmt und gleichzeitig mit Mullbauschen abgerieben. Nach etwa 2—3 Minuten wird das Impffeld zur Entfernung der Desinfektionsflüssigkeit mit abgekochtem, lauwarmem Wasser abgeschwemmt, jedoch nicht abgetrocknet, weil die Kurettierung der feuchten Pocken besser vonstatten geht, als jener mit trockener Oberfläche. Mit einer stark gebauten Kurette (Fig. 9) werden nun die Pocken unter kräftigem Drucke rasch und in einem Zuge abgestreift, wobei darauf Bedacht zu nehmen ist, daß der Rand des scharfen Löffels nicht den blutenden Pockengrund der bereits abgelösten Pockenreihe streift, weil dadurch der Rohstoff mit Blut verunreinigt und die daraus bereitete Lymphe mißfarbig wird. Deshalb dürfen auch die einzelnen Pockenreihen nicht allzu gedrängt angelegt werden, auch darf der Löffel der Kurette nicht zu breit sein. Das Abstreifen der Pocken

muß mit einer entsprechenden, mit Ruhe gepaarten Raschheit und unter Anwendung eines entsprechenden Druckes vorgenommen werden, damit durch die ruckweise erfolgenden Bewegungen des Impftieres, die durch die immerhin schmerzhafte Prozedur der Impfstoffabnahme bedingt sind, der Rohstoff nicht vom Löffel geschleudert wird. Es empfiehlt sich auch zur Vermeidung von Verlusten ein sterilisiertes leinenes Tuch unterhalb des Operationsfeldes auf die Tischplatte ausbreiten zu lassen, um allfällig herabgeschleuderten Rohstoff noch verwenden zu können. Zum Abstreifen des an dem Löffel haftenden Rohstoffes bedienen wir uns derselben Metallspatel, die für das Aufstreichen des Tegmins verwendet werden (vgl. Fig. 5).

Fig. 9.

Zur Aufnahme des Rohstoffes benützen wir dünnwandige, geschnäbelte Glasstutzen mit überhängendem Deckel (Fig. 10 *C*). Gefäß und Deckel tragen zum Zeichen der Zusammengehörigkeit gleiche Zahlen und das Gefäß außerdem die Tara eingeätzt, um das Nettogewicht des Rohstoffes bequem und rasch bestimmen zu können. Der Stutzen besitzt auch eine Volumeterskala.

Der Rohstoff von typisch entwickelten, saftreichen und auf der Höhe ihrer Reife abgenommenen Pocken stellt eine atherombreiartige Masse dar, die erst bei längerer Aufbewahrung in Glyzerin sich in die einzelnen bandförmigen Pockenstreifen trennt und deren ursprüngliche Gestalt erkennen läßt. Nach Bestimmung des Nettogewichts wird dem Rohstoffe die 3—5 fache Menge wasserhaltigen Glyzerins zugesetzt und der zu Klumpen geballte Rohstoff mit einem sterilisierten Metall- oder Glasspatel zerteilt, damit das Glyzerin rascher und gleichmäßiger auf ihn einwirken kann. Viele Jahre hindurch setzten wir dem Rohstoff die sein Gewicht genau dreifach übertreffende Glyzerinmenge zu, später stiegen wir auf die vierfache Verdünnung und halten gegenwärtig in der Regel bei dem Verhältnisse von 1 : 5, welches die oberste zulässige Verdünnungsgrenze zu sein scheint, bei der nicht eine zu rasche Sedimentierung der Lymphe erfolgt. Die Virulenz und Haltbarkeit der Lymphe ist auch bei 10- und 20 facher Verdünnung, tadellose Beschaffenheit des Rohstoffes vorausgesetzt, vollkommen ausreichend. Auf den Glasdeckel des Standgefäßes wird mit einem Farbstift die fortlaufende Nummer des Impftieres, das Datum der Abnahme und das Nettogewicht des Rohstoffes vermerkt, die betreffenden Daten in das Materialienjournal eingetragen und hierauf das Standgefäß samt Inhalt in den Kühlschrank gestellt, dessen Innenraum eine Temperatur von 10° R aufweist, die sich uns als das Temperaturoptimum erwiesen hat. Unser Kühlschrank ist mit Wasserkühlung versehen, die Sommer und Winter eine konstante Temperatur der erwähnten Stufe erzielen läßt.

Unsere Glyzerinwassermischung besteht aus 80 Teilen Ia Sargschen Glyzerins und 20 Teilen Wasser. Als Misch-, Aufbewahrungs- und Ausgußflasche hierfür dient uns ein Glaskolben von $1/2$ Liter Inhalt, dessen doppelt durchbohrter Kautschukpfropfen ein bis auf den Grund des

Kolbens reichendes Knierohr mit becherartigem Ansatz für die Aufnahme einer Wattevorlage und ein zweites Knierohr trägt (das Ausgußrohr), dessen unteres Ende nur in den Kolbenhals reicht. In diesem so adjustierten Kolben (Fig. 10 *A*) wird die Glyzerinwassermischung in strömendem Wasserdampf sterilisiert und unter einer Glasglocke aufbewahrt.

Ergibt die 24 Stunden nach der Impfstoffabnahme erfolgende Schlachtung der Impftiere einen pathologischen Befund an den inneren Organen, der eine Verwendung des Impfstoffes ausschließt, so wird der Rohstoff kommissionell vernichtet. Bei normalem Schlachtungsbefunde

Fig. 10.

wird der Rohstoff unter die verwendbaren Vorräte eingereiht und bleibt mindestens 4 Wochen unverrieben stehen.

Die große Wichtigkeit einer feinen Verreibung des Rohstoffes mit dem zugesetzten Glyzerin zu einer möglichst homogenen Emulsion wurde bereits früher auseinandergesetzt. Das Pockengewebe, das ja aus dem gequollenen, mit Leukocyten infiltrierten stratum corneum et mucosum der Oberhaut und außerdem aus dem zentralen mehr oder minder breiten Exsudatstreifen, dem Borkenbande, besteht, setzt namentlich in frischem Zustande einer Trennung seines Zusammenhanges ziemlich bedeutenden Widerstand entgegen und es bedarf einer recht langen Verreibung mit dem Pistill, um den Rohstoff in einen feinen Detritus zu verwandeln. Noch schwieriger gelingt dies, wenn der Rohstoff nur wenige Tage im Glyzerin sich befand oder gar wenn man es unterlassen hat, die Pockenmasse gleich nach dem Glyzerinzusatze mit einem Spatel in der Zusatzflüssigkeit zu verteilen. Das Glyzerin entzieht nämlich anfänglich dem Rohstoff Wasser und verwandelt ihn in zähe Klumpen. Erst nach längerem Verweilen in

wasserhaltigem Glyzerin imbibiert sich der Rohstoff mit der Konservierungsflüssigkeit, quillt auf, wird durchscheinend und die einzelnen Pocken lassen sich dann leicht voneinander trennen und verreiben. Ursprünglich wurde der Rohstoff in kleinen Achat-, Porzellan- oder Glasmörsern zerrieben, eine Prozedur, die erst nach mehrstündiger Dauer mühsam zum Ziele führte, ganz abgesehen davon, daß diese Art der Überführung des Rohstoffes in eine Emulsion keinen Anspruch auf Sauberkeit in hygienischem Sinne erheben durfte. Als die Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der animalen Impfinstitute sich mit der Zeit erheblich steigerten, konnte man mit dieser Art der Verreibung nicht mehr das Auslangen finden und mußte zur maschinellen Verreibung greifen.

Die gebräuchlichen Verreibungsapparate lassen sich in vier Gruppen einteilen:

1. In solche, welche die Zermalmung des Rohstoffes durch ein System von horizontal gestellten, mit ihren rauh geätzten Flächen sich berührenden Glaswalzen bewerkstelligen;

2. Bei denen derselbe Zweck durch eine Schraubenspindel ohne Ende erreicht wird, die sich um ihre Längsachse in einer derselben genau entsprechenden Hülse mit korrespondierendem Gewinde dreht;

3. Bei denen die Verreibung in einer auf einer rotierenden Scheibe fixierten Reibschale mittels eines exzentrisch sich bewegenden Pistills geschieht;

4. Nach dem Prinzipe des Kollerganges konstruierte Lymphemühlen.

ad 1. Hierher gehört die Döringsche Lymphemühle, deren mechanische Leistung wohl vorzüglich ist, die jedoch aus so vielen schon der einfachen Reinigung, geschweige denn einer exakten Sterilisierung schwer zugänglichen Bestandteilen zusammengesetzt ist, daß von einer keimfreien Verreibung des Rohstoffes nicht die Rede sein kann.

ad 2. Nach diesem Prinzip ist die vielverbreitete Chalybäussche Lymphemühle (Fig 11) konstruiert, die einen wesentlichen Fortschritt gegenüber dem Döringschen Apparat bedeutet. Sie besteht aus dem Stativ, aus dem eigentlichen Zermalmungsapparat und aus den Hilfsapparaten zum Antriebe. Das auf einer Tischplatte aus Stein befestigte Stativ ist mit einer runden Marmorplatte beschwert. Auf derselben erheben sich zwei aus Metall geformte, vertikale Standsäulen, von denen die eine nur halb so lang ist als die andere. Von der kurzen Standsäule geht horizontal gegen die Mitte der längeren eine Metallbrücke, die zur Aufnahme des Verreibungszylinders dient. Letzterer besteht aus der zerlegbaren Hülse und aus der Schraubenspindel. Erstere ist an ihrem oberen Ende mit einem Fülltrichter zur Aufnahme des glyzerinierten Rohstoffes versehen. Die Spindel, aus demselben Metall gefertigt wie die sie aufnehmende Hülse, ragt mit dem oberen Ende etwas über die längere Standsäule. Der Metallstab (Spindel) ist, soweit er von der eigentlichen Hülse umschlossen wird, mit einem Schraubengewinde versehen, dessen Windungen von oben nach abwärts immer feiner werden, so daß es an der Ausflußöffnung die Feinheit einer Mikrometerschraube erreicht. Die Hülse trägt ein korrespondierendes Schraubenmuttergewinde. Das obere Ende der Spindel besitzt eine horizontal gestellte Treibschnurscheibe; zwei ähnliche, vertikal gestellte Scheiben sind an dem oberen Ende der langen Standsäule derart angebracht, daß sie die von der Spindel herkommende Treibschnur aufnehmen und zum Schwungrad (bei Fußbetrieb mittels Trittbrett) oder zur Welle bei Antrieb mittels Wasserkraft (Turbine) oder Elektrizität leiten. Die in Bewegung befindliche

Spindel zieht die Impfstoffmasse in die Hülse des Zermalmungsapparates, die dann als Emulsion in ein am unteren Ende der Hülse angebrachtes Standgefäß oder direkt in die Eprouvette des später zu beschreibenden Füllapparates gesammelt wird (Fig. 10 *B*). Der Fülltrichter ist durch eine Glas- oder Metallplatte (mit zentraler Öffnung für die Spindel) verschließbar. In unserer Anstalt wurde seinerzeit die Chalybäussche Maschine mittels einer kleinen, nach dem Prinzip von Leur gebauten Wasserturbine getrieben.

Die Nachteile dieser Maschine bestehen im wesentlichen darin, daß der Impfstoff wiederholt durch den Apparat geschickt werden muß, weil bei der ersten Verreibung zunächst vorwiegend die Konservierungsflüssig-

Fig. 11.

keit mit einer relativ geringen Menge zermalmten Pockengewebes durchläuft und erst dann der allerdings sehr fein zerriebene Rohstoff in Form zusammengeballter Klumpen durchgedrückt wird. Auch ist man genötigt, öfter den an der Innenwand haftenden Rohstoff mit einem Spatel gegen die rotierende Spindel bzw. in die Trichterenge zu drängen. Endlich sind die metallenen Reibungsflächen als Übelstand zu bezeichnen. Die Vorteile des Apparates bestehen in der Einfachheit seiner Konstruktion, seiner großen mechanischen Leistungsfähigkeit, der Sterilisierbarkeit jener Teile, die mit dem Impfstoff unmittelbar in Berührung kommen und endlich seiner Dauerhaftigkeit.

Nach einem ähnlichen Prinzip ist der Triturateur Félix konstruiert, nur ist seine rotierende Schraube von konischer Form, welcher der Mantel (Fülltrichter und Reibeglocke von Sanduhrform) aufgesetzt ist. Der Antrieb der rotierenden Scheibe mit dem daran befestigten Reibekonus erfolgt von unten, wodurch eine Verschmutzung des Impfstoffes durch Schmieröl ausgeschlossen ist.

ad 3. L. Pfeiffer in Weimar hat einen Verreibungsapparat konstruieren lassen, der aus einem auf einer rotierenden Scheibe fixierten Porzellanmörser besteht, in den ein exzentrisch sich bewegender Stempel mittels einer kräftigen Feder niedergedrückt wird. Die Rotationsgeschwindigkeit muß in einem mäßigen Tempo gehalten werden, damit nicht eine Erhitzung der Reibeflächen bzw. des zu verreibenden Impfstoffes eintritt.

ad. 4. Der auf dem Prinzipe eines Kollerganges beruhende, nach meinen Direktiven von dem Wiener Mechaniker Csokor im Jahre 1897 konstruierte und von mir in demselben Jahre in der Zeitschrift „Das österr. Sanitätsw.“ (IX. Jahrg., Nr. 34) beschriebene Verreibungsapparat, der unter der Bezeichnung „Paul-Csokorsche Lymphemühle“ bekannt geworden ist, hat sich bis heute vollkommen bewährt und ist in puncto der Einfachheit seiner Konstruktion, der exakten Sterilisierbarkeit aller seiner Teile und der gegebenen Möglichkeit, den Verreibungsakt streng keimfrei durchführen zu können, bisher von keiner anderen Vorrichtung übertroffen worden. Der einzige Nachteil, der indessen nicht schwer in die Wage fällt, besteht gegenüber den mittels Schraubenspindeln die Zerreibung bewirkenden Maschinen in der längeren Dauer, welche die Verreibungsprozedur in Anspruch nimmt und in der Empfindlichkeit der Turbine gegen Schwankungen des Wasserleitungsdruckes. Bei elektrischem Antrieb fällt auch letzerwähnter Übelstand fort. Die Lymphemühle ist in zahlreichen Impfinstituten in Gebrauch.

Die Motive, welche mich zur Konstruktiou dieser Mühle veranlaßten und die Direktiven für den Mechaniker bestimmten, lassen sich in folgende Leitsätze zusammenfassen:

1. Die Verreibung muß von Anfang bis zu Ende in einem vor Staubeinfall gesicherten Gefäße vor sich gehen und darf weder durch Umgießen oder Nachfüllen des zu verreibenden Materials unterbrochen werden.

2. Die Überführung des glyzerinierten Rohstoffes in eine möglichst homogene Emulsion muß, ähnlich der Verreibung in einem Mörser, ohne Schädigung der spezifischen Wirksamkeit des Impfstoffes erfolgen.

3. Bei der Konstruktion des Apparates ist auf möglichste Einfachheit und auf die geringste Zahl ihrer einzelnen Teile Bedacht zu nehmen, die überdies einer leicht zu bewerkstelligenden Reinigung und exakten Sterilisierung zugänglich sein müssen.

4. Der zusammengestellte Apparat muß in toto sterilisierbar und so beschaffen sein, daß er in geschlossenem Zustande, d. i. mit aufgesetztem Deckel, mit dem Motor in Verbindung gesetzt werden kann, ohne daß man es nötig hätte, jene Teile des Apparates, die mit dem Impfstoff in Kontakt kommen, zu berühren.

5. Die Mühle muß womöglich durchwegs, jedenfalls aber in allen ihren Reibflächen aus Glas bestehen, wobei auf Dauerhaftigkeit des Materials Bedacht zu nehmen ist.

6. Der für die Aufnahme des Impfstoffes bestimmte Gefäßraum muß unbedingt vor Verschmutzung durch abgeriebene Metallteilchen oder Schmieröl gesichert sein.

7. Als Motor ist zunächst eine Turbine (Wasserkraft) gedacht, doch soll bei der Konstruktion auf eine andere Triebkraft (elektrischer Antrieb, Handbetrieb, Heißluftmotor usw.) Bedacht genommen werden.

8. Die Glasmühle darf nicht zu kostspielig sein, damit sie in mehreren Exemplaren ohne zu großen Aufwand angeschafft werden kann, um in größeren Betrieben rasches und bequemes Arbeiten zu ermöglichen.

Die Lymphemühle erfüllt in der Tat allgenannte Postulate und gibt gleichzeitig in glastechnischer Beziehung der Leistungsfähigkeit der österreichischen Glasindustrie ein glänzendes Zeugnis.

Die Abbildung (Fig. 12) zeigt den Apparat im Zusammenhange mit dem Motorzapfen der unterhalb der Marmorplatte in einem Holzkasten befindlichen, wagerecht liegenden Turbine. Die Lymphemühle selbst besteht:

Fig. 12.

1. Aus der Reibschale mit trichterförmig eingezogenem, rauh geätztem Boden, der zentral durchbrochen ist, um auf den Motorzapfen aufgesetzt werden bezw. die Turbinenachse mit jener des Rollenpaares verbinden zu können (Fig. 13 *e*);

2. aus einem Paar massiver, mühlsteinförmiger, fazettierter Glasrollen, deren rauhe Reibflächen genau der Rinne der Reibschale angepaßt sind. Die Rollen besitzen zentrale, glatt geschliffene Bohrungen zur Aufnahme der gläsernen Glasachsenenden (Fig. 13 *d*);

3. der Achse für das Rollenpaar, die aus einem abgeplatteten Mittelstück aus Metall mit einer quadratischen Lücke zur Aufnahme des Turbinenzapfens und zwei seitlich eingekitteten Glasstäben besteht. Das Mittelstück ist mit einem schräg gestellten Abstreifer (Spachtel) versehen, dessen innerer Rand dem Glaskonus der Reibschale möglichst genähert ist, und beim Rotieren den zu Beginn der Verreibungsprozedur gegen den Konus gedrängten Rohstoff abzustreifen und unter die Rollen zu schieben (Fig. 13 *b*).

Fig. 13.

4. aus dem aus einem Stück gefertigten Glasdeckel mit Knauf (Fig. 13 *a*).

Bei der Herstellung der Glasbestandteile, sowie bei der Wahl der Wandstärke der Schale samt Deckel der Lymphemühle wurde darauf Rücksicht genommen, daß sie die Sterilisierung bei trockener Hitze oder im Dampfe aushalten, ohne zu zerspringen.

Die Handhabung der Mühle ist sehr einfach. Die sorgfältig gereinigte Lymphemühle wird geschlossen in den Sterilisator gebracht, nach vollzogener Sterilisierung bzw. nach erfolgter Abkühlung geschlossen auf den Zapfen des Turbinenzapfens aufgesetzt und durch einfaches Öffnen des Wasserleitungshahnes in Gang gebracht, ohne daß es hierbei nötig wäre den Deckel der Schale zu lüften.

Von dem zu verreibenden Rohstoffe wird das überstehende Glyzerin in ein zweites sterilisiertes Standgefäß von der oben beschriebenen Form (Fig. 10 *C*) abgegossen und dieser dann in einer das Gewicht von 120 g nicht übersteigenden Menge in die Reibschale gebracht. Bevor der Deckel wieder aufgesetzt bzw. die Mühle in Bewegung gesetzt wird, müssen die Enden der Glasachsen mit einigen Tropfen der Konservierungsflüssigkeit mittels eines sterilen Glasspatels (Fig. 10 *E*) benetzt werden. Hierauf wird die Mühle in Gang gesetzt. Sollten die Rollen den Widerstand des Rohstoffes nicht sofort überwinden können, so genügt ein leichter Stoß mit dem Glasspatel gegen die Achse, um sie wieder ins Rollen zu bringen. Ist der Rohstoff grob zermahlen, was ungefähr 5 Minuten beansprucht, so wird das übrige Glyzerin hinzugegossen, die Achse samt den Rollen mit einer eigenen Rollengabel vom Motorzapfen abgehoben, das freie Ende des Abstreifers mit einem sterilisierten Glasstabe nach oben gedreht und die Achse wieder an ihre frühere Stelle gebracht. Hierauf wird die Mühle wieder in Bewegung gesetzt und so lange sich selbst überlassen, bis die Lymphe den gewünschten Verreibungsgrad erreicht hat. Die Drehgeschwindigkeit der Rollen läßt sich durch eine entsprechende Stellung des Wasserleitungshahnes sehr leicht und sicher regeln, wenn der betreffende Rohrstrang nicht noch an andere häufig und gleichzeitig mitbenutzte Auslaufsstellen angeschlossen ist. Die Drehgeschwindigkeit soll nicht mehr als 50—60 Touren in der Minute betragen, weil sonst der Impfstoff an den Schalendeckel geschleudert wird und außerdem zu stark schäumt. In ungefähr 1—2 Stunden ist die Verreibungsprozedur je nach der Menge des Rohstoffes beendet. Hierauf wird die Achse samt den Rollen mittels des Drahtbügels herausgehoben und in eine Porzellantasse beiseite gestellt, wobei man vorher dieselben eine Zeit lang über der Schale schwebend hält, bis die daran haftende Lymphe abgetropft ist. Die Emulsion wird durch eine doppelte Lage steriler Gaze, die man über ein offenes steriles Standgefäß gespannt hat, durchpassiert, um sie von den unverrieben gebliebenen Haarstümpfchen oder sonstigen gröberen Gewebspartikeln zu befreien, das Standgefäß signiert und in den Kühlschrank gebracht.

7. Fremdkeime der Vaccinelymphe.

Schulz, Straus, Chambon, Ménard haben bereits 1888—1893 gefunden, daß frische Vaccine stets unzählige Mikroorganismen enthält, die mit zunehmendem Alter der Glyzerinkonserven allmählich nahezu verschwinden. Diese auffällige Tatsache schrieben sie der direkten Einwirkung des Glyzerins zu. Leoni in Rom hat als erster auf das regelmäßige Vorkommen pathogener Mikroorganismen insbesondere des

Staphylococcus pyog. in der frischen Vaccine aufmerksam gemacht und deren Beseitigung gefordert. Es geschah dies im Jahre 1894 auf dem XI. intern. med. Kongreß in Rom, wo er einen diesbezüglichen Vortrag unter dem Titel: „Über die Faktoren der spezifischen und pathogenen Aktivität" gehalten hat. Leoni schreibt der Vaccine zweierlei Wirksamkeit zu, erstens die spezifisch vaccinale und zweitens eine pathogene, wodurch die bekannten pathologischen Begleiterscheinungen, wie Impferysipel, Drüsenschwellungen, Phlegmonen usw. erzeugt würden. Die Erreger der spezifischen Aktivität seien noch unbekannt, jene der pathogenen Aktivität jedoch die Fremdkeime der Lymphe, deren Zahl im umgekehrten Verhältnisse zum Alter der Lymphe stünde. Während sie in Unmenge in frischer Lymphe nachweisbar seien, fänden sie sich in mit Glyzerin präparierter und 1—4 Monate konservierter Vaccine nur noch in verschwindend geringer Zahl bzw. seien dann überhaupt nicht mehr vorhanden. Plattenkulturen frischer Lymphe wiesen zahlreiche Kolonien auf, unter denen neben harmlosen Saprophyten der Micrococcus pyogenes aureus und albus sich fände. Hätte man jedoch die Platten mit einige Monate alter Lymphe beschickt, wären die Resultate entweder völlig negativ, oder es käme zur Bildung nur sehr weniger Kolonien. Auch Impfungen an Kälbern, Kaninchen und Menschen hätten die bakteriologischen Befunde bestätigt. Frische Lymphe riefe stets mehr oder weniger starke Entzündungserscheinungen hervor, alte konservierte nur die typischen Schutzblattern, ohne daß etwa deren Immunisierungsfähigkeit gelitten hätte. Leoni kommt zum Schlusse seiner Ausführungen zu folgenden Thesen: „Frische Lymphe ist stets durch pathogene Mikroorganismen verunreinigt, deren Kraft durch Behandlung der Lymphe mit Glyzerin und Konservierung durch 1—4 Monate vernichtet wird; eine so behandelte Lymphe ruft reine typisch Schutzblattern mit nur spezifischer Wirkung hervor, es soll also nur solche und nicht frische Lymphe benutzt werden; die direkte Überimpfung vom Tier auf den Menschen ist zu verwerfen".

Im Jahre 1895 griff Landmann, damals Leiter der bakteriologischen Abteilung des stätdischen Krankenhauses in Frankfurt a. M., dieses aktuelle Thema wieder auf und rief mit seinem in der 67. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Lübeck gehaltenen Vortrag: „Bakteriologische Untersuchungen über den animalen Impfstoff", insbesondere wegen der heftigen Angriffe gegen die staatlichen Impfstoffgewinnungsanstalten des deutschen Reiches, großes Aufsehen hervor. Wenn auch Landmann mit seinen Deduktionen weit über das Ziel geschossen hat, so gebührt ihm doch das unbestreitbare, aber vielfach bestrittene Verdienst, das Interesse der wissenschaftlichen Kreise Deutschlands für die Impfstoffrage in energischer und erfolgreicher Weise geweckt zu haben. Man dürfte wohl auch mit der Annahme nicht fehl gehen, daß die über Erlaß des preußischen Ministers der geistlichen, Unterrichts- und Medizinal-Angelegenheiten vom Jahre 1895 (das Datum der Herausgabe dieses Erlasses ist weder aus dem Froschschen Berichte, noch aus den medizinal-statistischen Mitteilungen des kaiserlichen Gesundheitsamtes zu ersehen) erfolgte Wiederaufnahme der Tätigkeit der bereits im Jahre 1884 aktivierten Sachverständigenkommission, die seinerzeit die Frage der allgemeinen Einführung der Tierlymphe zu studieren und die hierzu erstatteten Vorschläge in Verbindung mit dem kaiserlichen Gesundheitsamte zu begutachten hatte, auf den erwähnten Vortrag Landmanns zurückzuführen ist. Auch meine eigenen, bereits im Frühjahre 1895 im Wiener hygienischen Institute unter Max Gruber begonnenen Unter-

suchungen über den Keimgehalt der in unserer Impfanstalt erzeugten Glyzerinlymphe bzw. die daraus für die Praxis der Lympheerzeugung sich ergebenden und zu ergreifenden Maßnahmen, erhielten erst durch die Mitteilungen Landmanns und Leonis eine bestimmte Richtung.

Es würde an dieser Stelle zu weit führen, über den damaligen Stand der Impfstoffrage an der Hand der Berichte der erwähnten Kommission und der einschlägigen Literatur der Jahre 1895—1897, welche Periode einen Wendepunkt in der Entwicklung dieser überaus wichtigen hygienischen Angelegenheit bedeutete, eingehend zu referieren und es muß diesbezüglich auf die Originalliteratur verwiesen werden. Nur soviel sei auszugsweise berichtet, als für das Verständnis der technischen Seite der Frage unbedingt notwendig ist.

Landmann hatte, wie vorher bereits Leoni, die Behauptung aufgestellt, daß die starken entzündlichen Reaktionen zum größten Teile durch primäre Infektion mit den in der Lymphe enthaltenen Staphylokokken und Streptokokken bedingt seien, daß das Vorkommen dieser Mikroorganismen sich vermeiden lasse, die zur Verwendung gelangende Lymphe keine pathogenen Spaltpilze enthalten dürfe und auch von anderen Bakterien möglichst frei sein müsse. Diese Forderungen schienen damals unerfüllbar.

Aus dem Resumé des Tätigkeitsberichtes, den Frosch als Referent der erwähnten Sachverständigenkommission 1896 erstattet hat, seien die wichtigsten Leitsätze hier hervorgehoben:

„Die Prüfung der Lympheproben hatte somit die bekannte Erfahrung wiederum bestätigt, daß die Bakterien der tierischen Lymphe meist harmlose Saprophyten sind, denen man schädliche Folgen für den Impfling nicht zuschreiben kann. Vereinzelt waren darin Staphylokokken von mäßiger, nur ausnahmsweise von stärkerer Tierpathogenität in geringer Zahl vorgefunden worden.

Das bloße Vorhandensein tierpathogener Mikroorganismen in der Lymphe berechtigt keineswegs, Reizerscheinungen und Impfschädigungen denselben zur Last zu legen und dem früheren oder späteren Auftreten von phlegmonösen und erysipelatösen Prozessen den Ausdruck für die verschiedene Virulenz derselben neben der ungleichen Disposition der Impflinge zu finden, wie dies von anderer Seite behauptet ist. Auch hinsichtlich des Grades der Virulenz erwiesen sich die aufgefundenen Staphylokokken nicht identisch mit den in Furunkeln, Phlegmonen, Abszessen bei Menschen vorgefundenen Staphylokokken, die erfahrungsgemäß eine erheblich höhere Virulenz besitzen."

8. Befreiung der Lymphe von ihrem Gehalte an Fremdkeimen.

Die praktischen Folgerungen für das Impfgeschäft und die Erzeugung der Tierlymphe, faßte der erwähnte Bericht in folgende Schlußsätze zusammen:

„I. Für das Impfgeschäft:

1. Eine ursächliche Beziehung zwischen den Bakterien der Lymphe und den Reiz- und Entzündungserscheinungen beim Impfling bestehen nicht. Die durch spezifische Bakterien bedingten erysipelatösen und phlegmonösen Entzündungen nach der Impfung sind als akzidentelle Schädlichkeiten und sekundäre Wundinfektionen aufzufassen, die, soweit der Impfarzt und der Impfstoff dabei in Frage kommt, vermieden werden können.

2. Die Reizerscheinungen hängen ab: a) von der Individualität des Impflings, b) von der Konzentration der Lymphe, d. i. dem Gehalte an wirksamem, bisher unbekanntem Impfagens, c) von der Operationstechnik.

II. Die Erzeugung der Tierlymphe:

1. Durch die gebräuchlichen Methoden der Impfstoffgewinnung ist auch unter Anwendung der Antiseptik, unabhängig von der Auswahl der Impffläche, eine nennenswerte Verminderung, geschweige denn eine Beseitigung der Bakterien nicht zu erreichen.

2. Eine bedeutende Verbesserung in der äußeren Beschaffenheit und Reinheit der Lymphe läßt sich durch die Methoden der blutfreien Gewinnung, Sedimentierung, Zentrifugierung und Verdünnung bewirken.

3. Die Anzüchtung reizloser Lymphestämme erweist sich als unausführbar."

Meine bereits erwähnten eigenen Untersuchungen über die Bedeutung und Beseitigung des Keimgehaltes der Glyzerinlymphe, über die ich in der 68. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Frankfurt a. M. im Jahre 1896, also zur selben Zeit referiert habe, als in der an den eben genannten Kongreß sich anschließenden Fachversammlung der Vorstände der deutschen staatlichen Impfstoffgewinnungsanstalten das Untersuchungsergebnis der preußischen Sachverständigenkommission noch vor Erscheinen des Froschschen Berichtes auszugsweise mitgeteilt worden war, führten nicht nur zu wesentlich anderen Resultaten und Schlußfolgerungen, sondern ich konnte damals bereits auf Grund eigener dreivierteljähriger Erfahrung positive Vorschläge für ein rationelles Verfahren zur Erzielung einer keimarmen, von pathogenen Mikroorganismen befreiten, dabei jedoch voll wirksamen Vaccine vorbringen. Da erst von diesem Zeitpunkte an die von mir in Übereinstimmung mit Leoni und in teilweiser Bestätigung der Befunde Landmanns vertretenen Grundsätze in größerem Umfange Eingang in die animale Impfpraxis gefunden und mit einigen, von mir später angegebenen Ergänzungen heute noch volle Geltung haben, so darf ich wohl an dieser Stelle aus dem Resumé meiner Publikation folgende wesentliche Leitsätze reproduzieren:

„Es ist trotz konsequenter Beachtung streng antiseptischer bezw. aseptischer Maßnahmen nur in äußerst seltenen Fällen möglich, von vornherein eine keimfreie, bezw. aureusfreie Lymphe zu erzielen.

Nachdem erfahrungsgemäß die Anzahl der in der Glyzerinlymphe enthaltenen pathogenen Keime in umgekehrtem Verhältnisse zu dem Alter der Lymphe steht und diese Keime nach einem Zeitraum von 4—8 Wochen in der Regel vollständig aus derselben verschwinden, so haben wir in dem „Ablagern" der Lymphe gegenwärtig das einzige rationelle Mittel, um eine untadelige, d. i. von pathogenen Mikroorganismen freie Lymphe zu erzielen.

Der in der animalen und humanisierten Lymphe als äußerst häufiger Begleiter vorkommende Staphylococcus pyogenes aureus ist entschieden pathogen, doch von wechselnder Virulenz und Widerstandsfähigkeit.

Der in der humanisierten Lymphe der sogenannten „Jennerschen Genitur" der Wiener Landesfindelanstalt von mir festgestellte und regelmäßig sich in derselben vorfindende Staphylococcus erwies sich von unvergleichlich höherer Virulenz und Widerstandsfähigkeit als der aus der Tierpocke gezüchtete Aureus.

Ob dem Staphylococcus pyogenes aureus allein oder unter gewissen anderen hinzutretenden Umständen beim Impfprozesse entzündungserregende Eigenschaften zukommen oder nicht, ist noch zweifelhaft. Merkwürdig und der Aufklärung bedürftig ist es, daß der Aureus massenhaft vorhanden sein kann, ohne Eiterungen hervorzurufen.

Auf jeden Fall ist jedoch eine Lymphe, die einen reichlichen Aureusgehalt aufweist, nicht als eine untadelige Impflymphe zu betrachten.

Der Staphylococcus pyogenes aureus ist nur als Schmarotzer der Pocke aufzufassen, da es vollkommen regulär entwickelte Impfpocken gibt, deren Inhalt steril bezw. aureusfrei ist."

Vergleicht man die Resultate der erwähnten drei Expertisen und die daran geknüpften Schlußfolgerungen, so wird man zunächst zugeben müssen, daß Landmanns Befunde über den hohen Gehalt an pyogenen Keimen der damaligen in Zirkulation befindlichen animalen Impflymphe sich nicht nur im Einklange mit den Untersuchungsergebnissen Leonis, Straus', Chambons und Ménards befanden, sondern auch durch die Resultate meiner eigenen Untersuchungen, sofern es sich um den Nachweis der Gegenwart virulenter gelber Traubenkokken handelte, volle Bestätigung erfahren haben. Landmanns aus diesen Befunden abgeleiteten Schlüsse haben sich jedoch als unrichtig erwiesen, indem die heftigen lokalen Impfreaktionen, deren Zustandekommen Landmann und Leoni auf die Anwesenheit pyogener Kokken in der Lymphe zurückführen zu müssen glauben, auch durch vollständig keimfreie Lymphe von hoher rein vaccinaler Virulenz entstehen können, weil die Reaktionsintensität hauptsächlich von der individuellen Empfänglichkeit des Impflings und von dem Gehalte der Lymphe an wirksamen vaccinalen Elementen (der Konzentration der Lymphe) direkt abhängig ist.

Der von der Sachverständigenkommission aufgestellten These, daß die in der frischen Vaccine (menschlichen oder tierischen Ursprungs) vorkommenden weißen oder gelben Traubenkokken unter die harm- und deshalb belanglosen Verunreinigungen des Impfstoffes zu rechnen seien, kann man jedoch ebensowenig beipflichten, da sich diese Mikroorganismen weder kulturell noch experimentell von jenen pyogenen Staphylokokken differenzieren lassen und dieselbe Tierpathogenität zeigen, wie die aus menschlichen Eiterungsprozessen gezüchteten.

Was die zur Verbesserung der Lymphequalität in dieser Beziehung einzuschlagenden Wege betrifft, so hat Landmann sich damals diesbezüglich gar nicht geäußert, der von der preußischen Sachverständigenkommission vorgeschlagene Weg, durch Sedimentierung, Zentrifugierung oder Verdünnung eine Verbesserung der Lymphebeschaffenheit zu erzielen, hat sich nicht gangbar erwiesen. Nur mein auf Grund der warmen Empfehlung Leonis und auf ausreichende eigene Erfahrungen gestützter Vorschlag, die Befreiung der Lymphe von ihren Schmarotzern durch mehrwöchentliche Ablagerung bewirken und **grundsätzlich nur abgelagerte** Lymphe für Menschenimpfungen in Verwendung zu ziehen bezw. in Verkehr zu setzen, hat sich als der einzige rationelle modus procedendi bis auf den heutigen Tag behauptet.

Die Tatsache, daß Glyzerinlymphe auch bei wochen- und monatelanger Aufbewahrung ihre volle vaccinale Wirksamkeit behalten kann, ohne einer fauligen oder andersartigen Zersetzung zu verfallen, und daß man sie daher unbedenklich für Menschenimpfungen verwenden könne, war schon seit Beginn der 70er Jahre des vorigen Jahrhunderts wohl bekannt.

Bis zum Jahre 1895 hat man jedoch, wenigstens in Deutschland und Österreich, der längere Zeit konservierten Glyzerinlymphe keineswegs den Vorzug vor der frischen gegeben, sondern hat im Gegenteil nur dann zu älteren Glyzerinkonserven gegriffen, wenn es die Produktionsverhältnisse oder andere Gründe lokaler Natur erheischten. Die Notwendigkeit, zu Beginn der Hauptimpfsaison große Mengen von Impfstoff bereitstellen zu müssen, zwang schon seit jeher die Leiter animaler Impfanstalten, Lymphekonserven verschiedensten Alters, ganz frische, neben wochen- und monatelang im Kühlschranke aufbewahrter Vaccine in den Verkehr zu setzen, um den zu dieser Zeit lawinenartig anschwellenden Impfstofforderungen möglichst rasch entsprechen zu können. Nach beendeter Impfsaison wurden hingegen **nur aus ökonomischen Gründen** die nicht vollständig verbrauchten Lymphevorräte zur Deckung des laufenden Bedarfes so lange verwendet, als die Wirksamkeit des Impfstoffes anhielt. Von dem Fortbestande der letzteren überzeugte man sich durch periodisch vorgenommene Probeimpfungen. Die Mehrzahl der Konsumenten, die in der allgemein verbreiteten Meinung, nur ganz frische Lymphe sei vollwertig, oft heute noch „frisch vom Kalbe abgenommenen Impfstoff“ verlangen, dürften wohl seinerzeit im Unklaren darüber gelassen worden sein, daß sie häufig genug statt „ganz frischer“ vielleicht recht lange Zeit auf Lager befindlicher Glyzerinlymphe erhielten. Die damit erzielte Haftung und der glatte Impfverlauf boten keine Veranlassung, weiter danach zu forschen, ob man diesen Erfolg frischer oder länger konservierter Lymphe verdanke. Der entscheidende Unterschied zwischen einst und jetzt besteht also darin, daß man einst die Zulässigkeit der Verwendung älterer Glyzerinkonserven in Fachkreisen als Notbehelf wohl kannte, tolerierte und solche nach jeweiligem Bedarf an Stelle frischer Lymphe in Verkehr setzte, gegenwärtig jedoch eine solche Ablagerung der Lymphe aus prinzipiellen Gründen systematisch eintreten läßt, um die Qualität des Impfstoffes zu verbessern.

Die von einer Reihe von Fachkollegen, insbesondere in Frankreich zugunsten der Verwendung frischer Lymphe vorgebrachten Argumente können nach unseren Erfahrungen nicht als stichhaltig bezeichnet werden.

So fand ich in dem jüngst erschienenen Impfhauptberichte der Académie de médecine in Paris pro 1904 die interessante Mitteilung, daß es in jüngster Zeit dort vorgeschrieben worden sei, die Vaccine in möglichst frischem Zustande zu versenden. Nach der Meinung des in der betreffenden Publikation nicht genannten Referenten schütze diese Vorsichtsmaßregel vor Mißerfolgen, die an das vorzeitige Erlöschen der Virulenz einer ursprünglich tadellosen Vaccine geknüpft seien. Heutzutage wolle man um jeden Preis die Lymphe von ihren Fremdkeimen (germes adventices) befreien, die doch in ihrer erdrückenden Mehrheit harmlos seien. In dem Impfinstitut der Akademie passe man sich deshalb der allgemein befolgten Praxis (d. i. der Verwendung frischer Lymphe) an und zwar in der Erwägung, daß bei der Strittigkeit der Vorteile des Ablagerns der Lymphe, die hierbei erfolgende Mazeration zum mindesten die Wirkung habe, jene Lympheserien (échantillons de vaccin) verwerfen zu müssen, die nur kurze Zeit ihre ursprüngliche Virulenz bewahren. Was man auch darüber denken möge, die jüngsten (frischesten) Impfstoffe scheinen stets die kräftigste Wirkung zu zeigen. Er sei daher auch durchaus nicht überrascht, daß die hervorragendsten Impfärzte Deutschlands zögern, die Praxis (sc. des Ablagerns) zum System zu erheben. Für seine Person könne er sich der aphoristischen Formel Leonis: „Frische Vaccine,

schlechte Vaccine, alte Vaccine, gute Vaccine“ trotz der Erfolge, die jener erzielt habe, nicht anschließen.

Die zitierte Kritik stützt jedoch gerade das Prinzip der Ablagerung (vieillissement), statt es zu erschüttern. Nach meiner Meinung hat als oberstes Axiom für die Beurteilung der Verwendbarkeit unter allen Umständen der Satz zu gelten, daß man nur solche Lymphe in Verkehr setzen dürfe, deren volle Virulenz, Reinheit und Haltbarkeit zweifellos erwiesen ist.

Eine Lymphe, die bereits nach wenigen Tagen ihre Virulenz zum Teil oder ganz verliert, ist a priori als abgeschwächte Lymphe zu betrachten und vom Verkehr auszuschließen, wenn sie auch, frisch verwendet, vielleicht noch positive Impferfolge gezeitigt hat. Ein Impfstoff von so labiler Virulenz rechtfertigt das größte Mißtrauen in bezug auf die damit erzielte Immunisierungsintensität. Eine von Haus aus vollkräftige Vaccine büßt ihre vaccinale Kraft auch bei einer Konservierung von wochen- und monatelanger Dauer nicht ein und wir besitzen in dem „Vieillissement“ nicht nur das rationellste Mittel, die Lymphe von pathogenen Fremdkeimen zu befreien, sondern geradezu den verläßlichsten Gradmesser ihrer spezifischen Virulenz. Nur eine vollvirulente Vaccine ist auch haltbar. Und Haltbarkeit müssen wir von einem Impfstoff verlangen, der versandt werden soll. Denn nur dann werden die Impfresultate, selbstverständlich bei rationeller Impftechnik, außerhalb der Impfanstalt jenen innerhalb derselben gleichen, und nur dann werden die Einwendungen als hinfällig betrachtet werden müssen, daß die Lymphe auf dem Transport gelitten habe, wenn sie in der Hand des Impfarztes unwirksam bleibt. Die wertvollste Garantie, die uns eine entsprechende Ablagerung der Lymphe schafft, ist die unbedingte Sicherheit einer **rein** vaccinalen Wirkung, die uns eine frische Vaccine niemals bieten kann. Vollvirulente, frische Vaccine, auch wenn sie a priori völlig frei von Fremdkeimen ist, bewirkt überdies unerwünscht heftige Impfreaktionen, die zur ausreichenden Immunisierung unnötig sind und im Interesse der Impfung als öffentlicher Institution vermieden werden sollten. Bei längerer Konservierung kommt es hingegen zur Milderung der ursprünglichen allzu heftigen vaccinalen Virulenz der Lymphe, ohne indessen ihre volle Immunisierungsfähigkeit zu beeinträchtigen. Zu einer wirklichen, die immunisierende Kraft schmälernden Abschwächung a priori kräftiger Vaccine kommt es erst nach monatelanger Aufbewahrung derselben. Als abgeschwächt kann man die Vaccine schon dann annehmen, wenn die Schutzblattern bei den Impflingen auch auf der Höhe ihrer Entwicklung, die bedeutend langsamer erfolgt als bei vollkräftiger Lymphe, unansehnlich, von ganz schmaler Areola umgeben sind und auch die allgemeine Reaktion beinahe unmerklich abläuft. Der personelle, ja selbst der Schnitterfolg kann dabei immer noch befriedigend sein. Man muß in dieser Beziehung die Erfahrungen und Anschauungen der alten Impfärzte als richtig anerkennen, die von einem befriedigenden Impferfolge nur dann sprachen, wenn kräftige Schutzpocken mit ausgiebiger lokaler und allgemeiner Reaktion erschienen.

Wenn wir auch nicht selten mit einer Glyzerinlymphe, die ein halbes Jahr und darüber alt war, tadellose Impfresultate erzielt haben, so konnten wir doch die Beobachtung machen, daß die Lymphe häufig genug bereits nach dreimonatlicher Aufbewahrung den Charakter der sogenannten „reizlosen“, also deutlich abgeschwächten Lymphe annahm. Ich möchte daher der Verwendung einer zu alten Glyzerinlymphe nicht das Wort reden,

sondern als unterste Grenze der Ablagerungsfrist 3—4 Wochen, als oberste drei Monate bezeichnen. Die erstere wäre nur in Fällen dringendster Not (plötzliches Auftreten von Blatternepidemien bei ungenügenden Vorräten), die letztere nur dann zu überschreiten, wenn fortlaufende Kontrollimpfungen den Fortbestand der vollen Virulenz einer Lagerlymphe sicher nachweisen lassen.

Die „Lagerlymphe" hat sich bereits ihr Weltbürgerrecht errungen und wird es wohl so lange behaupten, bis nicht andere Methoden gefunden sind, um einen ebenso reinen und in seinen Wirkungen ebenso einwandsfreien Impfstoff erzeugen zu können, wie ihn die abgelagerte Lymphe darstellt. Nur muß der oben zitierte aphoristische Ausspruch Leonis dahin ergänzt werden, daß man eine alte Lymphe nur dann als gut bezeichnen kann, wenn ihre spezifische Wirksamkeit noch voll erhalten geblieben ist.

Wir sind diesem, unserem Anstaltsbetriebe seit Beginn 1896 zugrunde liegenden und konsequent befolgtem Prinzipe in der Folge nicht nur deshalb treu geblieben, um „a tout prix" die Lymphe von ihrem ursprünglichen gewiß unhygienischen Gehalte an Fremdkeimen zu befreien, sondern haben auch dann daran festgehalten, als es uns gelungen war, auf Grund einer wesentlich verbesserten Impfmethodik a priori keimarme Vaccine zu erzeugen. Wir konnten nämlich den exakten Nachweis führen, daß anch eine von vorneherein von pathogenen Fremdkeimen absolut freie Vaccine in ganz frischem Zustande an Kindern verimpft, viel heftigere Impfreaktionen erzeugt als wochenlang abgelagerte, in ihrer vaccinalen Wirksamkeit ausreichend kräftige Glyzerinlymphe. Die Ablagerung der Lymphe ist also auch in diesem Falle eine notwendige und rationelle Maßregel.

Bis zum Jahre 1898 hielt ich auf Grund des damaligen Standes der animalen Impftechnik die Gewinnung einer a priori keimarmen Vaccine trotz angewandter Desinfektion des Impffeldes und trotz strenger Aseptik des Verfahrens bei der Herstellung und Verfüllung der Glyzerinemulsion für unausführbar. Denn es war mir von vornherein klar, daß bei der üblichen Impfmethode die Verschmutzung des Impffeldes und die dadurch bedingte Invasion von Fremdkeimen in die frisch gesetzten Impfverletzungen und in die sich entwickelnden Impfpocken unvermeidlich sei. Die Versuche, die Verunreinigungen des Impffeldes durch Zeugverbände zu verhindern, sind von verschiedenen Seiten unternommen worden. Dieselben fanden jedoch deshalb keinen Eingang in die allgemeine Praxis, weil die Verwendung von hydrophilen Verbandstoffen für diesen Zweck irrationell ist, indem letztere durch Imbibition mit den tierischen Exkreten geradezu Sammelstätten aller möglichen organisierten und nicht organisierten Verunreinigungen abgeben können. Wasserundurchlässige Schutzdecken oder gar Pflasterverbände bedingen wiederum Mazeration der Schutzpocken und sind deshalb allein schon unbrauchbar. Selbst durch Suspension der Impftiere versuchte man die inokulierte Bauchfläche vor Verschmutzung zu bewahren, mußte jedoch aus begreiflichen Gründen von diesem barbarischen Auskunftsmittel Abstand nehmen. Auch die Rückenimpfung hat nicht zu dem erstrebten Erfolge geführt, ganz abgesehen davon, daß die derbe, stark pigmentierte Rückenhaut namentlich älterer Tiere nur wenig als Impffeld geeignet erscheint.

Erst im Jahre 1898 ist mir nach langwierigen Vorversuchen durch methodische Anwendung des Tegmins als Schutz- und Deckmittel des Impffeldes die Lösung des Problems gelungen, den Gehalt der frischen

Vaccine an Fremdkeimen a priori auf ein Minimum herabzudrücken, was man vordem nicht für möglich gehalten hatte und das zu erreichen, auch bis heute mittels keiner anderen praktisch anwendbaren Methode gelungen ist. Durch den Tegminverband wurde nicht nur einem empfindlichen Mangel des bis dahin üblichen Impfverfahrens in bezug auf dauernde Reinerhaltung des Impffeldes abgeholfen, sondern es zeigte sich auch, daß der Tegminverband neben seinen schützenden Wirkungen die Pockenentwicklung beim Impftiere in der Richtung vorteilhaft beeinflusse, daß nicht nur die Krustenbildung beinahe vollständig ausbleibt, sondern die Impfpocken auch an jenen Stellen, die sonst kümmerliche Pockenentwicklung zu zeigen pflegen, wie z. B. die gegen das Brustbein zu gelegenen Partien des Impffeldes, sich eben so kräftig entwickeln, wie an den Vorzugsstellen. Das Tegminverfahren ist allerdings etwas mühsamer und kostspieliger als das gewöhnlich geübte ohne jeglichen Schutzverband, die damit sowohl in quantitativer als auch qualitativer Beziehung erzielten Erfolge entschädigen jedoch reichlich den Mehraufwand an Kosten, Zeit und Mühe.

Es gehört nicht zu den Seltenheiten, daß die unter Tegminverband gezüchtete Vaccine, in ganz frischem Zustande auf die üblichen Kulturböden ausgesät, sich vollkommen steril erweist, während ohne diese Maßregel kultivierte Vaccine ohne Ausnahme eine Unzahl von Fremdkeimen, vorwiegend Staphylococcus pyogenes aureus et albus, oft in Reinkultur enthält. Die vielseitig erfolgten Nachprüfungen der Methode haben die Richtigkeit unserer Befunde insbesondere in der Richtung bestätigt, daß auf keine andere Art die Herabsetzung des ursprünglichen Keimgehaltes der frischen Vaccine gelingt. Die hie und da laut gewordenen Einwände, daß der Tegminverband nicht gut hafte, beruhen entweder auf vorschriftswidriger Applikation desselben oder schlechter Qualität des angewendeten Präparates. Das Rothziegelsche Originalpräparat, das sich durch Stetigkeit seiner Zusammensetzung, vorzügliche Reinheit und Klebekraft auszeichnet, wird nämlich in minderwertigen Nachahmungen in den Handel gebracht, deren Anwendung dementsprechend zu wenig befriedigenden Resultaten führen muß.

Wenn auch die pathogene Bedeutung der Fremdkeime der Lymphe, die morphologisch, kulturell und experimentell von den bei menschlichen Eiterungsprozessen vorkommenden nicht zu unterscheiden sind, vielfach übertrieben worden sein mag, da ja die bloße Anwesenheit von pathogenen Mikroorganismen noch keineswegs berechtigt, voreilige Schlüsse auf eine abnorme Wirkung der durch sie verunreinigten Lymphe zu ziehen, wie dies Landmann getan hat, so birgt doch auch die umgekehrte Auffassung eine nicht zu unterschätzende Gefahr. Einen schlagenden Beweis hierfür bilden die vor einigen Jahren im Elsaß vorgekommenen Massenerkrankungen in unmittelbarem Anschluß an die Impfung, die in Eiterungsprozessen der verschiedensten Art bestanden und unwiderleglich auf die Verimpfung nur 24 Stunden alter, staphylokokkenhaltiger Lymphe zurückzuführen waren. Prof. Levy in Straßburg hat dieses Vorkommnis im 12. Hefte der Hygienischen Rundschau vom Jahre 1902 ausführlich beschrieben. Die umstrittenen Beziehungen der Staphylokokken der Lymphe zu Hauteiterungen im Anschluß an die unmittelbar vorangegangene Impfung erscheinen da in so unzweifelhaftem Lichte, daß es nicht mehr unklar sein kann, daß unter bestimmten Bedingungen die Beschaffenheit der Lymphe tatsächlich in ursächlichem Zusammenhange mit Impfschäden stehen kann. Für die Arteinheit der in menschlichen

und tierischen Schutzpocken schmarotzenden Staphylokokken mit jenen, die als Eiterungserreger bei den pathologisch-anatomischen oft recht ungleichartig erscheinenden purulenten Prozessen gelten, sprechen also nicht nur theoretische Erwägungen, sondern auch Erfahrungen aus der Impfpraxis.

Es ist auch nicht zu bezweifeln, daß die in der älteren Impfliteratur beschriebenen „unechten“ Kuhpocken nichts anderes sein können, als die unter dem Namen „Impetigo contagiosa“ bekannten, durch Invasion von Staphylokokken in die Haut hervorgerufenen Eiterblasen.

Der § 8 des II. Abschnittes der noch heute in Österreich gültigen Impfvorschriften vom Jahre 1836 sagt diesbezüglich wörtlich: „Unechte, nicht schützende Kuhpocken fangen schon am zweiten Tage der Impfung oder noch früher an, sich zu bilden; sie erlangen nicht die gehörige Form, haben sogleich einen breiteren Umfang und eine größere Entzündung; es mangelt ihnen die unter der Haut fühlbare Härte und der regelmäßige rote Hof, ihr Verlauf weicht überhaupt sehr von dem oben beschriebenen ab, geschieht in unverhältnismäßigen Zeiträumen; die Pusteln gehen bald in Eiterung über, werden halbkugelförmig oder gar kegelförmig usw. zugespitzt; bilden bei der Abtrocknung einen lockeren gelben Schorf. Zuweilen entsteht wohl auch die unechte Kuhpocke etwas später; aber ihr unregelmäßiger Verlauf unterscheidet sich dann genugsam von der echten. Schmerzen in den Achselhöhlen beobachtet man zuweilen auch bei unechten Kuhpocken, wie nicht minder ein Fieberchen.“

Die Kenntnis der Möglichkeit des Auftretens solcher primärer Hauteiterungen in unmittelbarem Anschluß an die Impfung ist um so wichtiger, als hierdurch eine „Haftung“ der Lymphe vorgetäuscht, die spezifische Wirkung der Vaccine also maskiert werden kann.

Es ist bezeichnend, daß seit mehr als einem Dezennium die falschen Kuhpocken in Österreich eine unbekannte Erscheinung sind. Ich selbst habe sie nach unseren Impfstoffen niemals gesehen. Hingegen habe ich in meiner amtsärztlichen Praxis im Jahre 1889 eine ausgebreitete Impetigoepidemie im Anschluß an die Impfung beobachten können, die jedoch durch Impfung von Arm zu Arm veranlaßt worden war.

Die merkwürdige Tatsache, daß die Anwesenheit einer Unzahl von hochvirulenten Staphylokokken in typisch entwickelten Vaccinebläschen bei Kindern keine konsekutiven Eiterungsprozesse, ja nicht einmal stärkere lokale Reizerscheinungen herbeiführt, wie ich dies bezüglich der alten „Jennerschen Genitur“ des Wiener Findelhauses nachgewiesen habe, während eine vaccinal schwache Lymphe mit reichlichem Keimgehalt Impetigo hervorrufen kann, läßt mit großer Wahrscheinlichkeit darauf schließen, daß ein gewisser Antagonismus zwischen den in der Schutzblatter assoziierten Mikroorganismen (dem Vaccinekeim und dem Eiterungserreger) besteht, der es bewirkt, daß der a priori stärkere Vaccinekeim wohl nicht vermag die Entwicklung und Vermehrung des Eitererregers zu hemmen, jedoch kräftig genug ist, die Entfaltung seiner pyogenen Wirkungen zu verhindern. Nur dann also kann der Eitererreger zur Geltung kommen, wenn er mit einem in seiner spezifischen Virulenz **a priori abgeschwächten** Vaccinekeim assoziiert ist. Die oben erwähnten Elsässer Vorfälle und die in der Literatur öfter beschriebenen Massenerkrankungen an Impetigo nach der Impfung, so z. B. jene des Jahres 1885 in Wittow, Sydow, mehreren Bezirken des Kreises Cleve usw. finden dadurch eine einfache und naturgemäße Erklärung.

9. Beseitigung des Keimgehaltes der Lymphe auf raschem Wege.

Die Eventualität, daß Impfinstitute bei plötzlichem Ausbruche ausgebreiteter Blatterepidemien in die Lage kommen können, bei Erschöpfung ihrer Vorräte an abgelagerter Lymphe den an sie gerichteten Massenbestellungen nur durch Lieferung von frischem Impfstoff entsprechen zu können, hat zur Anstellung mannigfacher Versuche geführt, die frische Lymphe in kurzer Zeit von ihren Schmarotzern zu befreien, ohne ihre spezifische Wirksamkeit zu schädigen. Auf drei Wegen hat man diese rasche Lymphereinigung zu erreichen versucht:

1. auf mechanischem Wege,
2. auf thermischem Wege und
3. auf chemischem Wege.

ad. 1. Die rasche Befreiung der Lymphe von ihren Fremdkeimen auf mechanischem Wege kann man bewirken: a) durch Filtration, b) durch Zentrifugierung.

Während es lange Zeit als experimentell bewiesene Tatsache feststand, daß die wirksamen Vaccineelemente weder in wässeriger Aufschwemmung, noch als Glyzerinemulsion Tonzellen passieren können, hat Negri 1905 als erster den sicheren Nachweis der Filtrierbarkeit des vaccinalen Virus erbracht. Reudinger, Nouri und Siegel haben Negris Versuche nachgeprüft und seine Befunde bestätigt. Carini kam nach negativen Resultaten erst dann zu gleichem Ziele, als er durch Negri selbst mit dessen Versuchstechnik genau vertraut gemacht worden war. Negris Technik der Vaccinefiltration ist folgende: 20 g frisch abgenommener Pockendetritus (Rohstoff) wird mit 200—250 ccm sterilen, desstillierten Wassers in einem Mörser zerrieben und in eine Flasche mit eingeriebenem Glasstöpsel gefüllt. Aufbewahrung dieser Mischung im Kühlraum während zweier Tage. Dann zerreibt man von neuem zwei bis vier Stunden lang in der Reibmaschine, wodurch eine fast homogene Mischung entsteht. Man bewahrt nun diese in der gleichen Flasche 12—16 Tage im Kühlraum auf und schüttelt sie jeden Tag durch 10—15 Minuten kräftig. Nachher filtriert man zuerst durch Watte mit Hilfe einer Luftpumpe. Das Filtrat geht dann leicht durch Filtrierpapier und schließlich relativ leicht durch Berkefeld-Kerzen V. Carini konnte nach dieser Methode mit dem Filtrat sowohl durch Berkefeld V, als auch durch Berkefeld N und Silberschmidt-Kerzen verschiedene Male typische Schutzpocken sowohl bei Rindern wie bei Kaninchen und Meerschweinchen erzeugen. Carini schreibt das Mißlingen seiner ersten Nachprüfungen dem Umstande zu, daß er frisch bereitete Aufschwemmungen von eben abgenommenem Rohstoff zu den Filtrationsversuchen verwendet hatte, was er in der Erwägung tat, daß erfahrungsgemäß die Aufbewahrung von wässerigen Lympheaufschwemmungen die Virulenz derselben rasch herabzusetzen pflegt. Die mehrwöchentliche Mazeration scheint jedoch eine notwendige Bedingung zur Erzeugung eines wirksamen Filtrates zu sein, um die Träger des vaccinalen Virus durch Zersetzung (sc. Quellung oder Sprengung) der Elemente, in denen sie eingeschlossen sind, in Freiheit zu setzen. Carini hält es auch nicht für gänzlich ausgeschlossen, daß die kleinsten filtrierbaren Formen der Erreger (Dauerformen?) sich während der Mazeration erst bilden. Unter allen Umständen ist die Zahl der durchgegangenen vaccinalen Keime sehr gering. Während 1 ccm verdünnter Lymphe vor der Filtration imstande ist, auf der Haut von Rindern oder Kaninchen (nach der Methode von Guérin) zahlreiche Pusteln hervor-

zurufen, bedarf es mehrerer Kubikzentimeter des Filtrates, um ganz vereinzelte Pusteln zu erzeugen. Für praktische Zwecke ist also die Keimbefreiung der frischen Lymphe durch Filtration nicht verwendbar.

Die einhalb- bis einstündige Zentrifugierung einer wässerigen Aufschwemmung von Pockendetritus gibt nach den Versuchen von Schulz-Berlin als Endprodukt eine wasserklare, leicht gelblich spielende Flüssigkeit, die frei von Gewebsbestandteilen und nahezu frei von Bakterien ist. Für den Gebrauch erhielt sie den üblichen Glyzerinzusatz zum Schutze vor Zersetzung und zur Erhöhung ihrer Haftbarkeit. Da durch dieses Verfahren jedoch die spezifische Wirksamkeit der Lymphe wesentlich beeinträchtigt wird, so hat dieses Verfahren keine Nachahmung gefunden. Es wird meines Wissens auch in Berlin nach wie vor die gewöhnliche Glyzerinemulsion verwendet.

ad 2. Schulz hat schon 1888—1891 nach einschlägigen Versuchen berichtet, daß der Aufenthalt frisch bereiteter Glyzerinlymphe bei Brutwärme (37 ⁰ C) während weniger Tage genügt, um die meisten darin enthaltenen Bakterien abzutöten, ohne die spezifische Wirksamkeit der Lymphe wesentlich zu beeinträchtigen. Carini, Galli-Valerio und Félix haben durch neuere Versuche demgegenüber festgestellt, daß höhere Temperaturen einen erheblich schädigenden Einfluß auf die Virulenz der Lymphe auszuüben vermögen, indem nach ihren Beobachtungen schon einige Tage Aufenthaltes im Brutschranke bei 37 ⁰ C oft genügen, selbst eine kräftige glyzerinierte Lymphe ihrer Virulenz zu berauben. Ja selbst nur wenig erhöhte Temperaturen, deren Einwirkung die Fremdkeime der Lymphe nur unbedeutend zu verringern vermögen, scheinen die vaccinale Virulenz schnell abzuschwächen. Ein praktischer Wert kommt also dieser als methodisch einzuschlagender Weg zur Reinigung der frischen Lymphe empfohlenen Methode nicht zu.

ad 3. Zusätze von keimtötenden Chemikalien zur Lymphe sind in früherer Zeit zum Zwecke ihrer Konservierung, in letzterer Zeit behufs rascher Befreiung derselben von Fremdkeimen wiederholt, jedoch ohne befriedigenden Erfolg versucht worden. Es ist ja von vornherein klar, daß schwach wirkende Desinfektionslösungen weder das eine noch das andere Ziel erreichen lassen, während sie in stärkerer Konzentration mit den Fremdkeimen auch die spezifische Wirksamkeit der Lymphe vernichten. Von der preußischen Sachverständigenkommission zur Prüfung der Impfstoffrage waren ebenfalls Versuche in dieser Richtung in Aussicht genommen, doch sind sie in größerer Zahl nicht zur Ausführung gelangt. Nur eine Versuchsreihe, durch Ozonisierung tierischer Lymphe ihre Reinigung zu bewerkstelligen ist vorgenommen worden, jedoch mit negativem Erfolge. Wenn nämlich die Ozonisierung so weit getrieben wurde, daß die Lymphe vollständig klar und bakterienfrei erschien, dann wurde auch die vaccinale Wirkung gleich Null.

Green hat 1901—1903 eine Methode beschrieben, durch Einwirkung von Chloroformdämpfen die Lymphe in sehr kurzer Zeit angeblich ohne Schädigung ihrer spezifischen Wirksamkeit bakterienfrei zu machen. Carini und beinahe gleichzeitig mit ihm Nijland haben die Greensche Methode genau nachgeprüft und im großen ganzen seine Befunde bestätigt, nur bezüglich der Haltbarkeit der chloroformierten Lymphe kamen sie zu abweichenden Resultaten. Carini schreibt darüber: „Wir haben dieses Verfahren bei einigen Lympheproben nachgeprüft und in der Tat gefunden, daß die Lymphe in einigen Stunden von nicht sporentragenden Bakterien durch sie befreit werden kann,

während ihre Virulenz nur wenig beeinflußt wird. Erst später, bei längerer Aufbewahrung im Kühlraume, macht sich allerdings gegenüber der glyzerinierten (Kontroll-) Lymphe bemerkbare Abnahme der Aktivität geltend.“ Nijland kommt zu dem Schlusse, daß die Behandlung der Lymphe mit Chloroform in sehr kurzer Zeit die in der Lymphe vorhandenen Vegetationsformen der Bakterien vernichtet, allerdings Bakteriensporen kaum schädigt, wobei die Wirksamkeit der Lymphe anfänglich unverändert zu sein scheint, sich jedoch ziemlich bald vermindert und dann hinter der üblichen Glyzerinlymphe nicht unbeträchtlich zurück bleibt. Chloroformbehandlung dürfte sonach bei einer Lymphe, die bald verbraucht wird, ohne Zweifel Vorteile bieten, allein als allgemein angewendete Maßregel namentlich bei solcher Lymphe, die längere Zeit aufbewahrt werden soll, glaubt Nijland dieselbe nicht empfehlen oder der Glyzerinbehandlung vorziehen zu sollen.

Da nach diesen Überprüfungsresultaten der Greenschen Chloroformmethode ein gewisser Wert nicht abgesprochen werden kann, so sei dieselbe nach den Angaben Nijlands, der die Methodik zweckmäßig modifiziert hat, hier eingehender beschrieben: Der frische Rohstoff wird in einem sterilen Mörser (Verreibungsapparat) fein zerrieben und mit sterilisiertem, destilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1 Gewichtsteil zu 3 Teilen Wasser vermengt. Durch diese Emulsion wird Chloroformdampf geleitet. Zu diesem Zweck wird ein konstanter Luftstrom, der zunächst durch ein mit Chlorkalk, dann durch ein mit Watte beschicktes Röhrchen geführt wird, durch eine zum Teil mit Chloroform gefüllte Gaswaschflasche und von hier aus durch die wässerige Lympheemulsion geleitet. Zur Erlangung des benötigten Luftstromes benutzte Nijland anfangs eine Wasserstrahlpumpe. Da diese jedoch einen unregelmäßigen Druck gab, wendete er später zwei große kommunizierende Flaschen von je 15 Litern Inhalt an, die $^1/_2$ m übereinandergestellt wurden, und von denen die untere durch einen gut schließenden, doppelt durchbohrten Stöpsel verschlossen war. Durch den Stöpsel waren zwei Glasröhren geschoben, welche in den Flaschenhals mündeten; die eine davon war mittels eines Gummischlauches mit einer Heberröhre aus der oberen Flasche, die andere mittels eines Gummischlauches mit dem mit Chlorkalk gefüllten Röhrchen verbunden, durch welche die Luft geführt werden sollte. Wenn die obere Flasche mit Wasser gefüllt und die Hebereinrichtung in Gang gebracht wird, fließt das Wasser in die untere Flasche, wodurch die Luft durch das andere Glasrohr hinausgetrieben wird. Auf diese Weise erhält man einen sehr gleichmäßig bleibenden Luftstrom, der durch Klemmschrauben an den beiden Gummischläuchen nach Belieben reguliert und etwa 5 Stunden lang unterhalten werden kann. Das Rohr mit Chlorkalzium dient zum Trocknen, jenes mit Watte zur Befreiung des Luftstromes von darin befindlichen Keimen. Die wässerige Lympheemulsion kommt in eine kleine Gaswaschflasche, durch die der gereinigte, getrocknete und mit Chloroform gesättigte Luftstrom hindurchgeleitet wird. Nach mehrstündiger Einwirkung des Chloroformluftstromes werden die zu- und abführenden Röhren, bezw. die daran befestigten Gummischläuche durch Klemmschrauben geschlossen. Auf diese Weise kann das Chloroform aus der Emulsion nicht entweichen, so daß man es nach Willkür länger oder kürzer einwirken lassen kann. Man muß sorgfältig darauf achten, daß kein flüssiges Chloroform mit der Emulsion in direkte Berührung kommt, weil sonst sofortige Virulenzabschwächung derselben eintritt. Das im Wasser ge-

löste Chloroform kann aus der Emulsion dadurch leicht vertrieben werden, daß man eine Stunde lang einen sterilen Luftstrom durch sie streichen läßt. GREEN rät, nur einen Teil des Chloroforms aus der Emulsion zu vertreiben und soviel darin zurückzulassen, daß eine Entwicklung der Bakteriensporen, die lebend geblieben sind, verhindert wird. NIJLAND hält jedoch eine vollständige Vertreibung des Chloroforms für notwendig, weil sonst die Emulsion auch nach Glyzerinzusatz sich längere Zeit nicht hält. Er vertreibt deshalb sofort alles Chloroform und fügt der wässerigen Lympheemulsion eine gleiche Menge Glyzerin hinzu, wodurch einer Entwicklung der in der Lymphe noch enthaltenen Dauerformen der Bakterien zuvorgekommen wird. Die Lymphe kann dann wie gewöhnliche Glyzerinlymphe aufbewahrt werden.

CARINI hat zu dem gleichen Zwecke eine andere Methode ausfindig gemacht, die vor der Chloroformmethode einige Vorteile haben soll. Er behandelt den frischen Rohstoff mit Toluol. Das Gemisch bleibt 24—48 Stunden stehen, worauf man das Toluol abgießt, die rückständige Lymphe mit Glyzerin versetzt und sie in üblicher Weise verwendet. CARINI äußert sich über sein Verfahren: „Obwohl diese Versuche noch nicht geeignet sind, die Methode der Reinigung der Lymphe mittels Toluol ohne weiteres zur Anwendung anzuraten, so haben wir doch darin ein Verfahren kennen gelernt, welches uns ermöglicht, die Bakterien des Impfstoffes in kürzester Zeit zu vernichten, unter Beibehaltung der vollen Aktivität der Lymphe“.

Diese drei Arten der Schnellreinigung der Lymphe erscheinen gegenwärtig noch nicht so weit erprobt, um sie mit sicherer Aussicht auf vollen Impf- bzw. Immunisierungserfolg, der ja insbesondere in Blatternzeiten unter keinen Umständen in Frage gestellt sein darf, in der allgemeinen Impfpraxis verwenden zu können. Im Hinblicke darauf, daß die Tegminmethode ausreichende Garantien für die Gewinnung a priori keimarmer Lymphe bietet, besteht dort, wo man sie übt, kein dringendes Bedürfnis für eine solche forcierte Keimbefreiung der Lymphe, da ein so reichlicher Keimgehalt hiebei gar nicht vorkommt, wie man ihn regelmäßig in frischer Lymphe zu sehen gewohnt ist, die ohne Tegminverband kultiviertem Pockenmaterial entstammt. Hingegen ist es angezeigt, die allzu heftige, wenn auch rein vaccinale Virulenz des a priori keimarmen Impfstoffes, die auch dieser in frischem Zustande besitzt, entsprechend abzuschwächen, um unerwünscht heftige Impfreaktionen zu vermeiden. Dies geschieht am rationellsten durch die Wahl eines höheren Verdünnungsgrades bzw. eines reichlicheren Glyzerinzusatzes, als dies gewöhnlich zu geschehen pflegt. R. KOCH selbst, der die gebräuchliche Tierlymphe für einen verhältnismäßig zu konzentrierten Impfstoff hält (vgl. FROSCH, „Prüfung der Impfstoffrage“, Berlin 1896) hat diesen Weg zur Verbesserung der Lymphequalität, bzw. zur Abschwächung der allzu heftigen spezifischen Virulenz der Lymphe vorgeschlagen. Nach meinen eigenen Erfahrungen, die sich mit jenen anderer Fachgenossen decken, verträgt eine vollvirulente frische Vaccine eine 20- bis 25 fache Verdünnung ohne Einbuße ihrer vollen vaccinalen Wirksamkeit. Ein solches Verdünnungsverhältnis kann man jedoch nur dann eintreten lassen, wenn die Lymphe sehr rasch nach ihrer Verfüllung und Abgabe aus der Impfanstalt verwendet wird. Bei der Lagerlymphe kann eine so hoch getriebene Verdünnung aus folgenden zwei Gründen nicht Platz greifen:

1. weil ein so hoher Glyzeringehalt die spezifische Virulenz der Lymphe bei längerer Lagerzeit zu erheblich schwächt und
2. weil hiebei die Sedimentierung der Lymphe viel zu rasch (in den Lympheröhrchen selbst oft schon nach 24 Stunden) eintritt. Obwohl die Sedimentierung an und für sich die Wirksamkeit der Lymphe nicht beeinträchtigt, so ist doch der klare Teil der sedimentierten Lymphe, der bekanntlich arm an wirksamen Elementen ist, weniger virulent als das Sediment. Hiedurch können bei Unkenntnis der rein mechanischen Ursachen dieser Erscheinung Mißverständnisse resultieren, indem über die Art der Impfstoffgewinnung mangelhaft oder gar nicht informierte Ärzte solche sedimentierte Lymphe in der Meinung, daß es sich um putride Zersetzungsvorgänge handle, als zum Gebrauche untauglich oder gar gefährlich zurückweisen. Andererseits kann die Verwendung des klaren Teiles allein partielle Mißerfolge bei der Impfung veranlassen.

10. Prüfung der spezifischen Wirksamkeit und des Virulenzgrades der Vaccine.

L. Pfeiffer und van der Loeff waren die ersten, die in den Pockenpusteln kleine protoplasmatische Gebilde beschrieben haben, die sie in ätiologische Beziehungen mit der Variola und Vaccine brachten. Im Jahre 1892 teilte Guarneri mit, daß es ihm gelungen sei, nach Verimpfung von Vaccinelymphe auf die Kaninchenhornhaut im Corneaepithel Zelleinschlüsse nachzuweisen, die sich auch in den Effloreszenzen von Pockenkranken fänden und die wohl mit den von van der Loeff und L. Pfeiffer beschriebenen identisch seien. Guarneri hielt diese Gebilde für die Erreger der Vaccine und nannte sie „Cytoryctes vaccinae". Ob diese Guarnerischen Körperchen tatsächlich die Vaccineerreger sind, wie dies L. und E. Pfeifefr, Wassilewski u. a. annehmen, ob sie nur für Vaccine spezifische Degenerationsprodukte der Epithelzellen (Hückel) oder der Leukocyten (Salmon) oder endlich Gebilde sind, die erst den eigentlichen Erreger einschließen, ist bis heute noch nicht entschieden. Die Tatsache steht jedoch fest, daß sie nur in Variola und Vaccinebläschen vorkommen und aus dem Grunde in ätiologischen Zusammenhang mit diesen Prozessen gebracht werden müssen, weil kein anderes, auf die Kaninchencornea geimpftes Virus die charakteristische Vaccinekeratitis mit Auftreten der Guarnerischen Körperchen erzeugt. Wir besitzen also in der Guarnerischen Corneaimpfung eine für Vaccine spezifische biologische Reaktion von großer Empfindlichkeit. Die Bedeutung eines Titres der Virulenzstärke für Zwecke der Impfpraxis besitzt die Guarnerische Probe leider nicht.

Bezüglich der hierbei einzuschlagenden Operations-, Härtungs-, Schnitt- und Färbetechnik, deren Beschreibung an dieser Stelle zu weit führen würde, sei auf die vorzügliche Arbeit Hückels: „Die Vaccinekörperchen" verwiesen.

Guérin in Lille hat 1903 zur Kontrolle der Virulenzstärke der Lymphe eine Methode angegeben, durch Auszählung der spezifisch wirksamen Keime, besser gesagt, der durch sie hervorgerufenen Einzeleffloreszenzen die Virulenzstärke abzuschätzen (Contrôle de la valeur des vaccins jennériens par la numération des élements virulents). Nach seiner Angabe beschickt man den knapp vorher rasierten Rücken eines Kaninchens mit einer genau bestimmten Lymphemenge. Erhält man nach Verlauf einiger Tage eine Eruption dicht bei einander stehender (konfluierender)

Vaccineeffloreszenzen, so ist das ein Zeichen einer vollkräftigen Vaccine. Wenn man derartige Aussaaten bei einer Reihe von Kaninchen desselben Gewichtes mit immer steigenden Verdünnungen derselben Lymphe wiederholt, erhält man entsprechend dem Verdünnungsgrade des Aussaatmateriales eine mehr oder minder reichliche Eruption von isolierten Knötchen, deren Zählung sehr leicht ist. Mit einer Glyzerinlymphe von bestimmtem Gewichte und bestimmter Zusammensetzung (ein Teil Rohstoff auf ein Teil Glyzerin) bereitet man folgende Verdünnungen in sterilisiertem Wasser:

1 g Glyzerinlymphe	+	10 ccm Wasser	=	1. Verd.	=	1 : 10
1 ccm der 1. Verdünnung	+	4 „ „	=	2. „	=	1 : 50
1 „ „ 1. „	+	9 „ „	=	3. „	=	1 : 100
1 „ „ 3. „	+	4 „ „	=	4. „	=	1 : 500
1 „ „ 3. „	+	9 „ „	=	5. „	=	1 : 1000

Ein Kubikzentimeter jeder dieser Verdünnungen, die vorher durch eine sehr feine Seide passiert werden, oder mindestens mit der Verdünnung 1 : 100 und 1 : 500, wird auf je einen frisch rasierten Kaninchenrücken aufgestrichen. Wenn die betreffende Lympheprobe von vorzüglicher Beschaffenheit war, so besteht die hervorbrechende Eruption auch noch bei einer Verdünnung der Lymphe von 1 : 500 durchwegs aus konfluierenden Knötchen. Die durch eine Verdünnung von 1 : 1000 hervorgerufene Eruption erscheint in Form von isolierten Knötchen, deren Zahl drei bis vier auf je einen Kubikzentimeter der beschickten Hautfläche beträgt. Noch höhere Verdünnungsgrade geben eine allzu beschränkte Anzahl von Knötchen, als daß daraus bestimmte Schlüsse für den Gebrauch gezogen werden könnten. Jede Lympheprobe, deren Verdünnung 1 : 100 nicht wenigstens drei oder vier Knötchen auf einen Kubikzentimeter Impffläche hervorrufe, sei von mittelmäßiger Beschaffenheit. Guérin hält diese Prüfung der spezifischen Virulenzstärke der Vaccine für so sicher und genau, daß sie eine leichte Auswahl jener Lymphestämme gestatte, die zur Weiterzucht bestimmt sind und erachtet es für wünschenswert, daß diese Methode der „Auszählung der virulenten Elemente“ von allen jenen Instituten geübt werden sollte, die entweder mit der Lympheerzeugung selbst oder mit der Überwachung des Betriebes bzw. mit der Untersuchung des Impfstoffes fremder Anstalten betraut sind.

Zur raschen Orientierung über die Haftungsfähigkeit bzw. Abschätzung der Lymphequalität für den Versand haben Calmette und Guérin die Verimpfung der Lympheproben an der inneren Ohrfläche weißer Kaninchen vorgeschlagen. Hier reife nämlich die Vaccine bereits nach drei bis vier bis fünf Tagen. Die Inspektion des geimpften Ohres erfolgt bei durchfallendem Lichte. Der eigentliche Körper der vaccinalen Eruption, die „Zone der vaccinalen Infiltration“ erscheine dunkel und sei von einer schmalen roten Zone (die „Zone der Irritation“) eingesäumt. Die Beurteilung erfolgt nach beifolgender Skala:

1 2 3 4 5 6

1 = unwirksame Lymphe; 2—4 = stark abgeschwächte Lymphe;
5 = leidlich gute Lymphe; 6 = vollvirulente Lymphe.

L. Pfiffer findet diese Kontrollmethode ganz brauchbar, jedoch nicht so klar und eindeutig wie die nachfolgende nach Chaumier.

Chaumier in Tours verfährt bei der Kontrolle der vaccinalen Virulenz an Erstimpflingen wie folgt: An dem einen Arme legt er vier Impfinsertionen mit erprobt virulenter Lymphe an, auf dem zweiten Arme verimpft er die zu erprobende Lympheserie mit ebenso vielen Impfschnittchen. Für die Beurteilung der Virulensstärke hat er folgendes Schema aufgestellt:

1 2 3 4 5 6

1 = wirkungslose Lymphe; 2—4 = stark abgeschwächte, für praktische Zwecke unbrauchbare Lymphe; 5 = eben noch für den Versand zulässige Lymphe: 6 = vollvirulente Lymphe.

Zur Beurteilung der Qualität der Versandlymphe, also jenes Impfstoffes, der aus der Impfanstalt in Verkehr gebracht wird, halte ich ihre Erprobung an Erstimpflingen geradezu für unentbehrlich. Die Impfanstalt muß zu diesem Zwecke mit einer ganzjährig geöffneten öffentlichen Impfstation mit täglichen Impfterminen (Sonn- und Feiertage ausgeschlossen) verbunden sein, um fortlaufende Erprobungen vornehmen zu können.

Nur das wohlcharakterisierte klinisch-anatomische Bild der kräftig entwickelten, typischen Schutzblatter, die von einer bestimmten Lympheprobe erzeugt worden ist, kann für die Beurteilung ihrer Eignung für öffentliche Impfzwecke einzig und allein maßgebend sein.

Die in den öffentlichen Verkehr zu setzende Lymphe muß weiter unter allen Umständen vollvirulent sein und solche von „mittelmäßiger“ Wirkung unbedingt ausgeschlossen werden. Hierzu bedarf es jedoch nicht erst einer förmlichen Virulenzskala. Eine Lympheserie, die bei der Probeverimpfung an Erstimpflingen sich nicht als vollvirulent erweist, muß eben unbedingt vom Vertriebe ausgeschlossen werden. Aus diesem Grunde halte ich die etwas umständliche Chaumiersche Lympheerprobung für überflüssig. Als vollvirulent kann nur solche Lymphe gelten, die nicht allein Schutzblattern von typischer Form und entsprechender Ansehnlichkeit, sondern auch eine kräftige Areola erzeugt. Einen Impfstoff, der nur sogenannte reizlose Schutzblattern von unansehnlicher, wenn auch charakteristischer Form, mit ganz schmaler Reaktionszone und deutlich verlangsamter Entwicklung hervorbringt, also Zeichen einer zweifellos abgeschwächten Wirksamkeit darbietet, schließen wir vom Vertriebe unbedingt aus. Wiederholte Erfahrung hat uns nämlich belehrt, daß, ganz abgesehen von der mit großer Wahrscheinlichkeit solcher Lymphe innewohnenden schwächeren Immunisierungsfähigkeit, die von den Impfärzten mit solcher reizlosen Lymphe erzielten Haftungsergebnisse weit unter die Norm zu sinken pflegen, trotzdem vielleicht das Prozentverhältnis der personellen und Schnitterfolge bei der Probeimpfung in der Impfanstalt 1 : 100 betragen haben mochte.

Was die Guérinsche Auszählungsmethode betrifft, so ist sie aus den eben vorgebrachten Gründen vom Standpunkte des Lympheerzeugers für praktische Zwecke überflüssig, wenn man in der Lage ist, Probeimpfungen an Kindern vornehmen zu können. Bei bestehendem Mangel

eines entsprechenden Impflingsmateriales hingegen oder wenn die Lympheproduktion in jenen Anstalten, die mit frischer Lymphe arbeiten, mit dem Verbrauche nicht gleichen Schritt zu halten vermag, dann kann allerdings diese Probe gewisse Anhaltspunkte für die Beurteilung der Qualität des Impfstoffes bieten. In letzterwähnte Lage können jedoch Institute, die für die regulären öffentlichen Impfungen ausschließlich Lagerlymphe verwenden, nicht so leicht geraten, da man ja in den meisten Anstalten den voraussichtlichen Gesamtbedarf für die Hauptimpfsaison kennt und danach die bereit zu stellenden Lymphevorräte mit ziemlicher Genauigkeit vorausbestimmen kann. Nur ganz unerwartete Ereignisse, wie das plötzliche Auftreten von Blattern, den regelmäßigen, rechtzeitig begonnenen Betrieb plötzlich und durch lange Zeit unterbrechende Epizootien (Maul- und Klauenseuche usw.) könnten in dieser Beziehung Störungen hervorrufen und die fortlaufende Erprobung der Lymphe an Kindern erschweren. In solchen Fällen kann man jedoch den Termin der Probeimpfung um 8 oder 14 Tage früher ansetzen, da ja die Erfahrung gelehrt hat, daß schon nach 8—14tägigem Aufenthalt des Rohstoffes in Glyzerin die Zahl der darin befindlichen pathogenen Keime bedeutend vermindert erscheint und die übrigbleibenden zwar noch vermehrungsfähig sind, jedoch avirulent werden, so daß gegen die Verimpfung eines solchen Impfstoffes am Menschen kein Bedenken obwaltet. Um in der Hauptimpfsaison mit den Lympheerprobungen an Kindern nicht ins Gedränge zu kommen, greifen wir zu dem Auskunftsmittel, die an ein und demselben Tage abgenommenen Lympheernten mehrerer Tiere zu einer einzigen Lympheserie zu vereinigen und erst diese an Kindern zu erproben. Selbstverständlich muß jede einzelne Lympheserie durch den Schlachtungs- und bakteriologischen Befund gedeckt sein. Nur unter ganz ungewöhnlichen Umständen und Verhältnissen, z. B. wenn bei plötzlichem Ausbruche von Blatternepidemien in volkreichen Städten oder ganzen Ländergebieten oder infolge langwährender Epizootien während der Hauptimpfsaison usf. die vorhandenen Lymphevorräte nicht so lange ausreichen, bis man mit der neuen Lympheproduktion so weit nachrücken kann, daß der Lymphezufluß den Abfluß übersteigt, also nur unter dem Drucke einer force majeure halte ich Ausnahmen von dieser Regel für zulässig.

In zwei Fällen wäre die Guérinsche Probe — ihre Verläßlichkeit und Beweiskraft vorausgesetzt, worüber mir eigene Erfahrungen fehlen — als eine wertvolle Ergänzung der üblichen Prüfungsmethoden zu bezeichnen: 1. bei Überprüfungen von Lympheproben, die behufs Feststellung ihrer Reinheit und Wirksamkeit über behördliche Weisung von fremden Impfinstituten eingesendet werden; 2. bei der Wahl der zur Fortzucht bestimmten Vaccine, der sogenannten Stammlymphe (lymphe sémence, souche).

In ersterwähntem Falle ist es ja mit der Konstatierung der bakteriologischen Reinheit allein nicht abgetan, sondern es muß die Existenz der vollen vaccinalen Virulenz festgestellt werden, wenn man ein abschließendes Urteil fällen soll. Nun hat es gewiß etwas Mißliches, Impfstoff fremder Provenienz, also eine in ihren Wirkungen ganz unbekannte Materie, an dem eigenen Impflingsmateriale „erproben“ zu sollen. Ich für meinen Teil habe derartige Probeverimpfungen fremder Impfstoffe an Kindern in der eigenen Anstalt stets perhorresziert. Eine Ergänzung derartiger Untersuchungen durch eine verläßliche Virulenzprobe am Kaninchen wäre deshalb von unbestreitbarem Werte.

11. Prüfung der Reinheit der Glyzerinlymphe.

Die regelmäßige bakteriologische Prüfung der in Vertrieb zu setzenden Glyzerinkonserven auf ihren Keimgehalt halte ich nach dem gegenwärtigen Stande der Impfstoffrage für unbedingt notwendig. Ich habe sie deshalb auch als obligate Einrichtung anfangs 1896, dem Zeitpunkte des Beginnes der ausschließlichen Verwendung der Lagerlymphe in unserer Anstalt, ebendaselbst eingeführt und seither ununterbrochen beibehalten. Bakteriologische Untersuchungen der Glyzerinlymphe aus rein wissenschaftlichen Gründen wurden vordem selbstverständlich auch anderwärts in großer Zahl angestellt; als ständige Einrichtung aus praktischen Rücksichten jedoch dürfte sie unsere Anstalt als erste besessen haben. Wir halten für die fortlaufenden, jede einzelne zum Versandt bestimmte Lympheserie betreffenden Untersuchungen folgenden Gang ein:

Die erste Untersuchungsprobe wird unmittelbar nach der Verreibung des Rohstoffes, die erst ca. 14 Tage vor ihrer in Aussicht genommenen Verwendung, in der Regel jedoch frühestens drei Wochen nach ihrer Abnahme vom Impftiere erfolgt, vorgenommen. Als Aussaatmaterial für jede einzelne Probe gelangt der vorher genau gewichtsmäßig bestimmte Inhalt eines Lympheröhrchens, der zunächst in 10 ccm Nährbouillon eingetragen wird. Von dieser Aufschwemmung wird je 1 ccm auf je eine Kulturschale verwendet. Bei der Zählung der aufgegangenen Kolonien wird die Keimzahl auf die Einheitsmenge von 0,01 ccm Lymphe reduziert bzw. resolviert. Es werden Agarstrich- und Agargußplatten, sowie Gelatinegußplatten von jeder einzelnen Lympheprobe angefertigt. Die aufgegangenen Kolonien werden zunächst gezählt, wobei sich uns als überaus bequemes Hilfsmittel die Pakessche Zählscheibe seit mehr als einem Dezennium vorzüglich bewährt hat. Kulturelle Differenzierung der aufgegangenen Kolonien durch Reinzüchtung wird in der Regel als überflüssig und zeitraubend nicht geübt, weil ja die gewöhnlichen Lympheschmarotzer durch ihre Wuchsformen genügend charakterisiert sind, um sie bei entsprechender Übung auch in den Mischkulturen ohne weiteres erkennen zu können. Ebenso wird auch nur in zweifelhaften Fällen zu Infektionsproben gegriffen. Aus der Artarmut der aufgegangenen Kolonien, der Abwesenheit von Schimmel- und Sproßpilzen kann man allein schon, abgesehen von der Keimzahl, auf die Reinlichkeit des Verfahrens bei der Lympheerzeugung einigermaßen bestimmte Rückschlüsse ziehen. Eine Glyzerinlymphe, die in 0,01 ccm weniger als 30 Keime zählt, muß bereits als eine keimarme bezeichnet werden. Wenn auch erfahrungsgemäß selbst die in frischem Zustande keimreichste Glyzerinlymphe nach mehrwöchentlicher Ablagerung ihren Keimgehalt bis auf die sporenbildenden Bakterien nahezu gänzlich verlieren kann und demgemäß die regelmäßige bakteriologische Untersuchung jeder einzelnen zum Versandt bestimmten, durch mindestens vier Wochen abgelagerten Lympheserie, manchem überflüssig erscheinen mag, so können doch jene Impfanstalten, die auf die Abgabe eines keimarmen, von pathogenen Mikroorganismen freien Impfstoffes Wert legen, diese Kontrolle nicht entbehren, weil resistente Keime auch nach dieser Frist sich erhalten können und weil andererseits aus oben angedeuteten Gründen nur durch ihre Vornahme ganz bestimmte Anhaltspunkte für die Beurteilung der Lymphereinheit, bzw. für die Reinlichkeit des Verfahrens bei der Lympheerzeugung zu gewinnen sind. Die in jüngster Zeit von einer Reihe Wiener Forscher mit Glyzerinlymphe aus unserem Institute in großer Zahl an Kindern vorgenommenen

Immunisierungsversuche durch subkutane Injektion von diluierter Vaccine, die ausnahmslos ohne Spur von Gewebseiterungen oder sonstigen accidentellen Komplikationen glatt verlaufen sind und die gewiß nicht unternommen worden wären, wenn irgend welche Zweifel an ihrer bakteriellen Reinheit bestanden hätten, sind ein sprechender Beweis für die Notwendigkeit einer ständigen bakteriologischen Kontrolle der Lymphe-produktion.

Die regelmäßige bakteriologische Untersuchung der in frischem Zustande in Verkehr zu setzenden Vaccine hat hingegen nur dann Sinn und Zweck, wenn man den bakteriologischen Befund als maßgebende Grundlage für die Entscheidung der Zulässigkeit bzw. die Anwesenheit pathogener Bakterien als Ausschließungsgrund für ihre Verwendbarkeit unbedingt anerkennt. Da aber der Keimgehalt der frischen Lymphe in jenen Impfanstalten, die keine besonderen Maßregeln wie Deckverband usf. zu seiner Behebung treffen, regelmäßig sehr hoch zu sein pflegt, so würde diese Anerkennung geradezu einen förmlichen Verzicht auf die Verwendung frischer Lymphe überhaupt involvieren. Zu diesem radikalen Schritte, dem bedingungslosen Verzicht auf Versendung frischer Vaccine, können sich jedoch noch zahlreiche Impfanstalten trotz der vorliegenden langjährigen, durchwegs günstigen Erfahrungen, die man an vielen Orten mit der konsequenten Verwendung von Lagerlymphe gemacht hat, nicht entschließen, was offenbar nur in Beweggründen lokaler Natur gelegen sein kann. Hauptsächlich scheinen es die Schwierigkeiten der Beschaffung von Impftieren entsprechenden Alters zu sein, die hier eine ausschlaggebende Rolle spielen, da erfahrungsgemäß die von größeren Jungrindern gezüchtete Vaccine von ungleich höherer Haltbarkeit und Virulenz ist als die von Saugkälbern gewonnene. Schlachttiere solchen Alters sind jedoch nicht überall leicht zu haben.

Nach wie vor vertrete ich den unverrückbaren Standpunkt, daß die für Menschenimpfungen bestimmte Lymphe keimarm und frei von allen verdächtigen Mikroorganismen sein müsse und dies umsomehr, als diese Forderung nach dem gegenwärtigen Stande der Technik der animalen Impfung und Impfstoffgewinnung als erfüllbar zu betrachten ist. Nur in den früher erwähnten Ausnahmefällen kann von diesem Grundsatze abgewichen werden. Aber auch da muß, in der selbstverständlichen Voraussetzung, daß alle modernen, auf die Verhinderung der Keiminvasion abzielenden Errungenschaften in Anwendung gezogen worden sind, die bakteriologische Untersuchung bzw. der Tierversuch die nötigen Direktiven für den modus procedendi liefern.

Bis zum Jahre 1905 haben wir uns mit der oben beschriebenen bakteriologischen Prüfung der in Verkehr gebrachten Lympheserien begnügt. Die Publikation Carinis im Jahre 1904 über die Beziehungen der Kuhpocken zum Tetanus, die in dem Ausspruche gipfelte: „. . . Aus diesem Befunde geht hervor, daß Tetanusbazillen zur normalen Bakterienflora der Lymphe zu rechnen sind, daß sie aber nur selten und bloß in geringer Zahl in der Lymphe vorkommen", hat mich jedoch veranlaßt, die von uns erzeugte Lymphe regelmäßig auch nach dieser Richtung einer Prüfung zu unterziehen. Auszugsweise sei hier das wichtigste mitgeteilt, was Carini hierüber schreibt:

Tetanusfälle im Gefolge der Impfung sind in Europa nur dreimal beobachtet worden. Dagegen sind in einigen Orten der Vereinigten Staaten von Nordamerika in den letzten Jahren, speziell im Herbste 1901, mehrere Fälle von Tetanus nach Vaccination aufgetreten

und teilweise veröffentlicht worden. Mac Farland hat im Jahre 1902 eine Zusammenstellung aller bis dahin in der Literatur beschriebenen Fälle publiziert und fand 14 derartige Beobachtungen in der Literatur niedergelegt und konnte selbst noch weitere 81 unbeschriebene Fälle hinzufügen. Es wurde eine eigene Kommission zum Studium dieser Angelegenheit eingesetzt, die jedoch im Hinblick darauf, daß es ihr nicht gelungen war, in der inkriminierten Lymphe weder auf kulturellem Wege noch vermittels des Tierexperimentes Tetanuskeime nachzuweisen, erklärte, daß die Lymphe in diesen Fällen nicht als Infektionsquelle angesehen werden dürfe, sondern daß die Erkrankungen auf zufällige sekundäre Infektionen infolge Staubverunreinigung der Impfverletzungen zurückzuführen seien. Eine vollständige Widerlegung dieses Gutachtens der Kommission erfolgte durch die Untersuchungen Wilsons, dem es angeblich nachträglich gelungen sein soll, Tetanusbazillen nachzuweisen. Carini hat durch ein sinnreiches Anreicherungsverfahren, dessen Einzelheiten im Original nachgelesen werden müssen, eine Anzahl von Lympheproben unter Luftabschluß auf Tetanusbazillen untersucht und in 400 Einzeluntersuchungen mit 50 verschiedenen, sowohl eigenen als auch auswärtigen Lympheproben, tatsächlich fünfmal Tetanusbazillen nachweisen können.

Da das Carinische Untersuchungsverfahren nicht nur mühsam und zeitraubend ist, sondern 14 Tage und darüber beansprucht, um zu einem abschließenden Ergebnis zu führen, sind in der Hauptimpfsaison regelmäßige Untersuchungen aller Lympheserien vor ihrer Versendung nach dieser Methode nicht ausführbar und auch nicht notwendig.

Bei der großen Empfindlichkeit weißer Mäuse gegen Tetanus dürfte wohl die subkutane Einverleibung einer relativ großen Lymphemenge als eine Vorprobe von hinreichender Feinheit auf die An- oder Abwesenheit von Tetanusbazillen angesehen werden können, an die erst im positiven Falle das Carinische Anreicherungsverfahren anzuschließen wäre. Weiße Mäuse vertragen bei entsprechender Zartheit des Operationsvorganges recht bedeutende Mengen subkutan beigebrachter Glyzerinlymphe, ohne Schaden zu nehmen. Von vielen Hunderten dieser Versuchstiere ist uns hierbei nur eine einzige Maus eingegangen und auch da war nur die allzu grob vorgenommene Injektion die Ursache ihres plötzlichen, unmittelbar nach vollzogener Einverleibung an Luftembolie erfolgten Todes. Wir verfahren bei diesen Versuchen folgendermaßen: ein Glasröhrchen von ungefähr 0,01 ccm Inhalt (unsere Phiole für 1—5 Impfungen) wird mit einem Ende in die Flamme eines Bunsenbrenners solange vorsichtig gehalten, bis der scharfe Rand desselben glatt abgerundet erscheint. Diese Vorsichtsmaßregel ist notwendig, weil die Unterlassung desselben den glatten Ablauf des Versuches zu stören vermag und in dem oben erwähnten Falle den Tod des Versuchstieres zur Folge hatte. Sodann wird das Röhrchen etwa zur Hälfte mit Glyzerinlymphe gefüllt, das freie Ende des Röhrchens mittels Stichflamme zugeschmolzen und unterhalb der Schmelzstelle mit dem Glasmesser eingeritzt. Hierauf wird das Bruttogewicht des Röhrchens genau bestimmt, dasselbe darnach in ein Stück signiertes sterilisiertes Filtrierpapier eingeschlagen. Als Injektionsstelle dient, wie gewöhnlich, die kurzgeschorene und desinfizierte Schwanzwurzel der Maus. Nachdem man die mittels Cooperscher Schere eingezwickte Haut mit der Spitze der Scheerenbranche ein wenig unterminiert hat, wird das Glasröhrchen mit dem offenen Ende in die Hauttasche gesteckt und bis zum Nacken vorgeschoben. Hierauf wird das

zugeschmolzene Röhrchenende an der Feilmarke abgebrochen, sodann mit einem kleinen Gummibällchen, das in einen 2—3 cm langen, der Röhrchendicke entsprechend kalibrierten Gummischlauch ausläuft, armiert und der Inhalt unter sanftem Drucke damit ausgeblasen. Die Hautwunde wird mittels Tegminverband (wie bei Kinderimpfungen) geschlossen, um Verunreinigungen derselben zu vermeiden und das Heraussickern der injizierten Lymphe zu verhindern. Die Bruchstücke des Röhrchens werden behufs Bestimmung des Nettogewichtes der inkorporierten Lymphe wieder abgewogen.

Bei keinem einzigen Versuchstiere hat sich eine Folgeerkrankung, geschweige denn Tetanus eingestellt.

12. Maschinelle Verfüllung der versandtfähigen Lymphe.

Die Verfüllung der Lympheröhrchen mittels Ansaugung mit dem Munde oder durch Vermittlung eines Saugschlauches dürfte gegenwärtig wohl allgemein verlassen sein, obwohl die Zeit noch nicht allzuweit zurückliegt, zu der diese Art der Verfüllung die allgemein übliche gewesen ist.

Ein gründlicher Wandel wurde in dieser Beziehung erst im Jahre 1895 durch die über Anregung des Wiener Impfarztes M. Hay erfolgte Einführung des von dem Wiener Mechaniker A. Csokor ersonnenen und konstruierten Füllapparates geschaffen, der unter der Bezeichnung: „Hay-Csokorscher Füllaparat“ große Verbreitung gefunden hat und für alle derartigen Apparate vorbildlich geworden, von keinem jedoch an Handlichkeit, Leistungsfähigkeit und Dauerhaftigkeit erreicht, geschweige denn übertroffen worden ist.

Der Füllapparat (Fig. 14) ist nach dem Prinzipe eines Heronsballes oder einer Spritzflasche gebaut. Eine kurze, breite und dickwandige Glaseprouvette, in einem Metallständer eingefügt, dient zur Aufnahme der Lympheemulsion. Die Mündung der Eprouvette wird mit einem Metallaufsatz abgeschlossen, der von zwei Metallröhrchen durchbrochen erscheint, wovon das eine und zwar das vertikale bis auf den Boden des Glasgefäßes reicht und etwas über den Deckel des Aufsatzes hinausragt, während das andere, bei weitem kürzere, horizontal gestellt und seitlich in die Deckelwand eingefügt ist, um die Verbindung des Innenraumes der Eprouvette mit einem Gebläse zu vermitteln. Das obere Ende des langen Röhrchens, des Steigrohres, besitzt eine kappenartige Stellschraube (Fig. 15 *a*), mittels welcher ein im Röhrchenende eingefügter, durchlochter Gummipfropfen (Fig. 15 *c*) zur Anpassung an die verschieden kalibrierten Lympheröhrchen beliebig verengert oder erweitert werden kann. Darunter befindet sich ein Sperrhahn zum Öffnen und Schließen des Steigrohres (Fig. 15 *d*). An das freie Ende des horizontalen Röhrchens wird der Verbindungsschlauch irgend eines Luftdruckapparates angeschlossen. Zur Erzeugung der nötigen Druckluft können verschiedene Vorrichtungen dienen: der bekannte Heringsche Injektionsapparat, ein Kautschukballongebläse, kommunizierende Wassergefäße usw. Wo eine Wasserleitung zur Verfügung steht, eignet sich zu diesem Zweck am besten eine Wasserstrahlluftpumpe. Nachdem der Eprouvetteninnenraum mit Druckluft erfüllt ist, die vorher eine Wattevorlage behufs Staubbefreiung passiert haben muß, werden die sterilisierten Lympheröhrchen, eines nach dem anderen, in die Öffnung des erwähnten perforierten Gummipfröpfchens eingesenkt, der Sperrhahn geöffnet und so lange offen gelassen, bis das Röhrchen sich bis zum gewünschten Grade mit der

darin aufsteigenden Lymphe gefüllt hat. Das halbgefüllte Röhrchen wird auf einem rechteckigen mit Kerben versehenen Metallrahmen horizontal gelagert, um das Ausfließen der Lymphe zu verhindern. Ein geübter Manipulant kann 1000—1500 Röhrchen pro Tag auf diese Weise füllen. Ist noch Hilfspersonal vorhanden, das die Verlötung der Glasröhrchen übernimmt, so kann diese Zahl bedeutend erhöht werden. Der Füll-

Fig. 14.

Fig. 15.

apparat kann auch zum Füllen von Fläschchen, die übrigens aus hygienischen Gründen in unserer Anstalt seit Jahr und Tag außer Gebrauch gesetzt worden sind, in folgender, von mir vorgeschlagenen und im Jahresberichte der Wiener Impfstoffgewinnungsanstalt vom Jahre 1896 beschriebenen Weise verwendet werden: ein sterilisiertes, vorsichtig über der Gasflamme heberförmig gebogenes Lympheröhrchen größeren Kalibers (unser Röhrchen für zehn Lympheportionen) wird mit einem Ende in die Öffnung des Gummipfropfens eingepaßt, das nun ein nach unten gekrümmtes Ausflußrohr des Füllapparates bildet und die genaue Füllung der Fläschchen mit Lymphe ohne die geringste Materialverschwendung gestattet (Fig. 14). Nach dem Gebrauche wird das Röhrchen weggeworfen.

In der Folge wurden über meine Veranlassung an dem ursprünglichen Modelle einige zweckmäßige Änderungen vorgenommen. So fehlt bei dem neuen Modell die umständliche Verschraubung des Metallauf-

satzes und ist durch einen Bajonettverschluß ersetzt. Ferner wird durch eine, am Fußende des Gestelles angebrachte und mit einer napfförmigen Vertiefung zur Aufnahme des Eprouvettenbodens versehene Stellschraube das Anpressen des Eprouvettenrandes gegen die an der nach unten sehenden Fläche des Aufsatzdeckels angebrachte Gummidichtung bewerkstelligt, wodurch ein luftdichter Abschluß rasch und sicher erzielt wird. Die Klemmvorrichtung für den Gummipfropfen an der Ausflußstelle, die vordem eine exakte Reinigung und leichte Auswechselung desselben nur mit großer Schwierigkeit gestattete, ist durch eine einfache Verschraubung ersetzt. Endlich wurde das obere Ende des vergoldeten Steigrohres mit einer abnehmbaren Glaskappe versehen, um eine Verstaubung der Ausflußöffnung zu verhindern.

Der Füllapparat bildet gleichzeitig ein überaus bequemes Standgefäß für die gerade im Gebrauche befindliche Versandtlymphe, die sog. laufende Lympheserie, dem selbst kleine Einzeldosen von Lymphe entnommen werden können, ohne das Gefäß selbst öffnen zu müssen.

Den Füllapparat vervollständigte ich dadurch, daß ich die Wasserstrahlluftpumpe auch für Zwecke der Verlötung der Lympheröhrchen, die vordem durch eine Harzwachsmasse verschlossen wurden, heranzog. Ich ließ einen, der Druckkraft der Pumpe entsprechend angepaßten Bunsenbrenner mit regulierbarer Gas- und Luftzuströmung (wie ihn die Glasbläser benützen) konstruieren und erhielt so ein einfaches und handliches Gasgebläse mit ruhig brennender, feiner Stichflamme, vermittels dessen das Verlöten der Glasröhrchen rasch und ohne viel Mühe gelingt. Vor dem Verlöten der gefüllten Phiolen muß man durch schräge Haltung derselben die Lymphe gegen das leere Röhrchenende fließen lassen, bis der Impfstoff beiderseits mindestens 2 cm von den Mündungen absteht, damit derselbe nicht mit erhitzt und dadurch unwirksam wird. Die verlöteten Phiolen erhalten beiderseits mittels eines sogenannten Glasmessers, dessen Verwendung zu dem genannten Zwecke ich dem Rate des Kollegen CHALYBÄUS verdanke, je eine Feilmarke, um sie ohne Splitterung durch Abbrechen ihrer Enden öffnen zu können. Fig. 16 *l* zeigt diese Lötvorrichtung, zu der noch der zweite, zum Gashahn führende Gummischlauch hinzuzudenken ist.

In zweckmäßiger Anordnung und praktischer Raumausnützung sind die beschriebenen Apparate und zwar: die Lymphemühle, der Füll- und Lötapparat samt Wasserstrahlluftpumpe von dem Mechaniker Csokor auf einer einzigen Stehkonsole mit Marmorplatte vereinigt worden (Fig. 16), die sich an jede Druckwasserleitung von mindestens $1^1/_2$ Atmosphären leicht anschließen läßt. An Orten, wo weder Gas- noch Wasserleitungsanlagen vorhanden sind, kann der Apparat mit elektrischem oder mechanischem Antrieb, bzw. mittels eines Heißluftmotors in Bewegung gesetzt und der Lötapparat mit einem Gasselbsterzeuger in Verbindung gebracht werden.

Beschreibung der einzelnen Teile der Apparatkonsole an der Hand der Abbildung Fig. 16:

a Windkessel der Wasserstralluftpumpe.

b Sperrhahn für die Druckluft, die bei Linksstellung desselben in den Schläuchen *h* und *h I* zum Füllapparate (*k*), bei Rechtsstellung zum Lötrohr (*l*) gelangen kann.

c Sperrhahn für das Ablaufwasser des Windkessels (*a*). Durch Drosselung des Wasserablaufes kann eine bedeutende Druckerhöhung

im Windkessel erzielt werden. Da die Öffnungen für den Wasserzu- und Abfluß genau kalibriert sind, um eine stetige Funktionierung der Luftpumpe zu gewährleisten, so wird natürlich bei Drosselung des Abflusses das Wasser im Windkessel steigen. Um dieses genau kontrollieren zu können, ist an der linken Seite des Kessels ein Wasserstandsrohr (*d*) angebracht. Dasselbe darf sich nicht vollständig füllen, weil sonst das Wasser, sobald es die Höhe des Sperrhahnes (*b*) erreicht hat, sich aus dem Windkessel in den Luftschlauch (*h I*) zum Füllapparat bzw. in jenen (*h*) zum Lötapparat ergießt. Man muß deshalb bei hohem Wasserstande im Windkessel durch Öffnung des Sperrhahnes (*c*) dem Ablaufwasser sofort freien Abfluß verschaffen.

e Vorlagsgefäß zum Auffangen des durch Rückstoß bei plötzlichem Abstellen der Tätigkeit der Luftpumpe herausgeschleuderten Wassers. Das Gefäß ist mit einem Gummipfropfen mit doppelter Bohrung versehen, wovon die eine das Luftsaugrohr, die andere ein Knierohr mit becherförmigem Ansatz (*p*) für einen Wattefilter aufnimmt.

f Wasserzuflußrohr zur Luftpumpe mit Sperrhahn (*g*).

Fig. 16.

h Schlauch für die Druckluft zum Lötapparat. *h I* Schlauch für die Druckluft zum Füllapparat.

i Sperrhahn für das Wasserzuflußrohr zur Turbine, welche die Lymphemühle (*o*) in Bewegung zu setzen hat.

k Füllapparat.

l Lötvorrichtung.

m Verbindungsrohr mit der Wasserleitung.

n Abflußrohr für das vom Windkessel und von der Turbine ablaufende Wasser.

13. Aseptische Impftechnik bei der Vaccination von Menschen.

Es dürfte wohl nicht überflüssig sein, der Impftechnik beim Menschen die Schilderung der Entwicklung der menschlichen Schutzpocke vorauszuschicken. BOHN bezeichnet mit Recht die Schutzpocken als das „regelmäßigste Exanthem", dessen absichtlich herbeigeführte Lokalisation auf der Außenseite des Oberarmes es geradezu zu einem stereotypen stempelt. Bei der beinahe ausnahmslos vorhandenen hohen Empfänglichkeit des Menschen für Vaccine ist das lokale Krankheitsbild so typisch und charakteristisch, daß keine der auf der menschlichen Haut vorkommenden Effloreszenzen mit dem „JENNERschen Bläschen" verglichen oder verwechselt werden kann. Bei Erstimpflingen betreffen die Abweichungen vom Typus (die Verwendung vollvirulenter Vaccine vorausgesetzt) nur Intensitätsschwankungen der lokalen Reaktion.

Mit Rücksicht darauf, daß gegenwärtig zu Menschenimpfungen ausschließlich Tierlymphe verwendet und nicht mehr wie früher bei der Impfung von Arm zu Arm mittels Stichen, sondern mittels kurzer Ritzer geimpft wird, folge ich bei der Schilderung der lokalen Erscheinungen bei der typischen Entwicklung der menschlichen Impfblattern den Bildern, wie sie sich bei der jetzt allgemein üblichen Impfmethode unter Verwendung vollkräftiger, jedoch nicht allzuheftig wirkender Tierlymphe (d. i. entsprechend abgelagerter, von größeren Jungrindern gewonnener Retrovaccine) zu zeigen pflegen.

Unmittelbar nach erfolgter Impfung umgeben sich die Impfritzer mit einem roten Hofe, der je nach der Empfindlichkeit des Impflings von verschiedener Intensität ist. Bisweilen kommt es zum Auftreten deutlicher Quaddeln an den Impfstellen. Quaddelbildung kann man auch bei vielen Impftieren, besonders solchen mit zarter Haut beobachten. Diese „traumatische Reaktion" verschwindet sehr bald bis auf einen schmalen Saum, der wie bei jedem anderen Kratzer nach Ablauf von 24 Stunden auch verschwunden zu sein pflegt. Die Impfritzer sind dann nur durch das lineare Blutkrüstchen markiert: Es hat an diesem Tage den Anschein, als wäre keine „Haftung" erfolgt oder die Impfung „erfolglos" geblieben. Gegen Schluß des dritten oder zu Beginn des vierten Tages kommt neues Leben in die Impfstellen; die „spezifische Reaktion" beginnt. Die Inkubationsdauer oder die Latenzperiode dauert also drei Tage. Nach dieser wandeln sich die Impfritzer in längliche, rosenrote, leistenartige Papeln um, die rasch wachsen und am sechsten Tage in ein bläschenartiges, perlartig schimmerndes, leicht transparentes Gebilde sich umwandeln: das JENNERsche Bläschen oder die Schutzpocke (Synonyma: Kuhpocke, Schutzblatter, Impfblatter, Impfpocke, Vaccinebläschen, Impfpustel, pustule vaccinale, bouton vaccinal, Vaccinia [engl.]). Das nunmehr deutlich charakterisierte Schutzblätterchen ist von einem schmalen roten Saume, dem Reaktionshofe (Areola, Halo) umgeben, dessen periphere Ausbreitung zunächst mit dem Wachs-

tum der Pocke gleichen Schritt hält. Die Schutzblatter erreicht am achten bis neunten Tage den Höhepunkt ihrer Entwicklung. Sie stellt zu dieser Zeit ein kaffeebohnenartiges Gebilde dar mit steil aufsteigenden Wänden und abgeplatteter Kuppe, das durch die zentrale, genau der Länge des Impfritzers entsprechenden Einziehung (den Pockennabel, die Delle, umbo), welche von einem wallartigen, prall gespannten, etwas drusig gekörnten Wulste umgeben ist, ein charakteristisches Gepräge erhält (Fig. 17). Der Körper der Schutzpocke ist perlfarbig, alabasterartig, blau- oder gelblichweiß, von mattem Glanz — alles Modifikationen, die von der Dicke und Transparenz der Epidermis abhängig sind. Sticht man die Schutzblatter an, so fällt sie nicht zusammen wie eine einkammerige Blase, sondern bleibt prall, was in dem fächerigen Bau derselben begründet ist. Die (primäre) Areola, deren Färbung alle Abstufungen von zartem Rosa bis zum dunklen Rot aufweisen kann, besitzt einen sternförmig zackigen Rand und mißt am achten Tage (bei Impfungen mittels einfacher Ritzer von $^1/_2$ cm Länge) in der Regel $^1/_2$—$1^1/_2$ cm in der Breite. Am Übergange vom achten zum neunten Tage nimmt die Reaktionszone wie mit einem Schlage einen anderen Charakter an. Während sie bis dahin als der Ausdruck einer entzündlichen Reizung der unmittelbaren Umgebung der Schutzblatter gelten konnte, tritt sie plötzlich, eruptiv in Form eines echten toxischen, exsudativen Erythems in Erscheinung und verbreitert sich von Stunde zu Stunde. Dabei kann man an dem Reaktionshofe zwei deutlich differenzierte Zonen unterscheiden, eine innere aus der ursprünglichen (primären) Areola hervorgegangene, die etwas über das Hautniveau erhaben, dunkler gerötet und mit papillären Erhebungen versehen ist, die ihr ein körnig-warziges Aussehen verleihen und eine äußere, in die sie ohne scharfe Begrenzung allmählich übergeht. Die äußere Zone ist bei weitem breiter, lichter rot, die Hautzeichnung innerhalb derselben unverändert, ihre periphere Begrenzung entweder verlaufend oder scharf, bisweilen, besonders bei Revaccinanden, mit einem wallartig aufgeworfenen Saum. Die Breite der voll entwickelten Reaktionszone (innere und äußere) zusammengenommen ist sehr variabel, sie schwankt von 2—5 cm und darüber. Auf der Höhe der Entwicklung des areolaren Erythems fließen die Reaktionszonen der einzelnen Impfblattern zusammen, die darunter liegende und angrenzende Haut schwillt an, wird heiß und glänzend, erscheint oft bretthart infiltriert und das kollaterale Ödem betrifft zuweilen den ganzen Oberarm. Das Impffeld bildet dann „ein einziges, feurig- oder düsterrotes Plateau, welches die Bläschen trägt", wie Bohn sich so treffend ausdrückt.

Fig. 17.

Den erwähnten papillären Erhebungen innerhalb der inneren Areolarzone kommt möglicherweise die Bedeutung von regionären vaccinalen Metastasen zu, da man sehr häufig diese Papillen einzeln oder gruppenweise zu kleinen Bläschen, sogenannten Nebenpocken (vaccinolae) sich umwandeln sieht, die stets rudimentär bleiben und rasch vertrocknen.

Es ist jedoch auch nicht ausgeschlossen, daß es sich lediglich um eine Steigerung der exsudativen Vorgänge im Papillarkörper rein erythematösen Charakters handelt, wie bei den allgemeinen vaccinalen Erythemen, die man relativ häufig innerhalb des 9. bis 14. Tages nach der Impfung zu sehen bekommt und die alle Charaktere des Pleomorphismus aufweisen. Man kann allen Abstufungen des polymorphen exsudativen Erythems begegnen: von vereinzelten Roseolaflecken angefangen zu klein- oder großfleckigen, masern- und scharlachartigen, papulösen, papulomakulösen, urticariaartigen und bläschenförmigen Erythemen. Ich habe einige Male selbst großblasige, pemphigusartige Erytheme beobachten können.

Indessen kommen auch echte Nebenpocken vor, d. h. solche, denen zweifellos alle Attribute echter Vaccinebläschen, also auch Überimpfbarkeit zukommt, welch letztere Eigenschaft man meines Wissens von den früher erwähnten rudimentären Nebenpocken experimentell noch nicht festgestellt hat. Dem Auftreten derartiger echter Nebenpocken geht die Konfluenz der Impfpocken voraus, die Nebenpocken treten wohl auch in der unmittelbaren Umgebung der letzteren und zwar gruppenweise auf, konfluieren jedoch mit den Impfblattern, so daß es schließlich zu einem Blasenkonglomerate, einer förmlichen Pockendruse kommt, nach deren vollständiger Ausbildung erst das areolare Erythem auftritt. Diese Form der Nebenpocken ist also als eine Anomalie des Vaccinationsprozesses aufzufassen und wahrscheinlich auf einen retardierten Immunisierungsvorgang, bzw. auf eine verzögerte Bildung von Antikörpern infolge von Konstitutionsanomalien zurückzuführen. Ich habe diese verhältnismäßig selten vorkommende Anomalie als vaccina serpiginosa beschrieben, um diese Art von Nebenpocken von den rudimentären, innerhalb der bereits vollständig ausgebildeten inneren Reaktionszone aufschießenden Vaccinolae zu trennen.

Die Rückbildung der Impfblattern beginnt mit dem Zeitpunkte der vollständigen Ausbildung der Reaktionszone. Der Pockeninhalt trübt sich, die Pocke wird gelb, die zentrale Delle vertieft und verbreitert sich und sehr rasch tritt von da aus die Eintrocknung des Pockenkörpers zu einer harten, anfangs braungelben, später schwarzbraunen, festhaftenden Borke ein, die in der vierten Woche unter Hinterlassung einer rötlichen, später strahlig werdenden Narbe, der charakteristischen Impfnarbe, abfällt.

Die Entwicklung der Schutzblattern ist von fieberhaften Erscheinungen, dem sogenannten „Vaccinefieber", begleitet. Schon nach Ablauf des dreitägigen Prodromalstadiums pflegen sich leichte abendliche Temperatursteigerungen einzustellen, die sich jedoch erst am siebenten Tage zu einem regelrechten Fieber entwickeln. Die Fieberkurve zeigt treppenartig aufsteigenden, remittierenden Typus mit kritischem Abfall. Die Fieberakme schwankt zwischen 38,2—40,5° C, pflegt jedoch bei größeren Kindern (über zwei Monaten) in der Regel nicht viel unter 39° C zu betragen. Die Höhe pflegt bei Verwendung unseren Impfstoffes am Ende des achten oder anfangs des neunten Tages erreicht zu sein. Mit dem Eintritte des Vaccinefiebers am achten Tage, bildet sich auch das charakteristische areolare Erythem mit Doppelzone, dessen periphere Ausbreitung bis zu seiner vollständigen Ausbildung, bzw. Abgrenzung, jedoch nicht mehr mit dem Fieber parallel geht, sondern auffallenderweise erst nach dem kritischen Fieberabfall rapid weiterwächst und sich endlich begrenzt. Der Eintritt der Reaktionszone markiert also die Beendigung des Entwicklungsprozesses der Schutzblattern, bzw. den Abschluß der Immunisierungsaktion, was ja

aus der zu diesem Zeitpunkt einsetzenden und rapid fortschreitenden Rückbildung des lokalen Prozesses klar hervorgeht. Nach den sorgfältigen Untersuchungen von Jaksch und Sobotka über die Stoffwechselvorgänge vor und während der Impfung, zeigt sich eine erhebliche Veränderung der Stickstoffausscheidung, deren Maximum durchgehends auf den 10. Tag fällt; sie beginnt ein oder zwei Tage vor dem Maximum und überdauert dasselbe um einen Tag. Der vermehrten Stickstoffausscheidung geht jedesmal eine erhebliche Leukocytose voran, die am häufigsten am dritten oder vierten Tage nach der Impfung einsetzt und drei bis vier Tage dauert. Hierauf kommt es zu einem plötzlichen Sinken der Leukocytenzahl unter die Norm, also zu einer Leukopenie von zwei- bis dreitägiger Dauer, der wiederum eine zwei bis sechs Tage andauernde Leukocytose, jedoch mäßigeren Grades wie das erste Mal, folgt. Die Akme der ersten Leukocytenvermehrung fällt also nicht mit der Fieberakme zusammen, sondern geht ihr voran, während der größte Tiefstand der Leukocytenzahl auf den Tag des kritischen Abfalles der Fiebertemperatur trifft, bzw. mit der vollen Entwicklung des areolaren Erythems zusammenfällt.

Zu einer einwandsfreien Impftechnik gehört außer der Beobachtung streng aseptischer Maßregeln die genaue Einhaltung einer bestimmten Art, Form, Größe, Zahl, Verteilung der Impfverletzungen und eines entsprechenden Abstandes derselben von einander unter Benutzung eines zweckmäßigen Impfinstrumentariums. Letzteres muß in kompendiöser und handlicher Form alle Behelfe zur Vornahme einer streng aseptischen Impfung enthalten und insbesondere so eingerichtet sein, um die Sterilisierung der Impflanzetten bequem und sicher bewerstelligen zu können. Von nicht untergeordneter Wichtigkeit ist die Form der Impflanzette. Wenn auch zugegeben werden mag, daß ein geübter Arzt mit einem beliebigen spitzen Werkzeuge den erwünschten Impfeffekt erzielen wird, so ist doch anderseits nicht zu leugnen, daß gerade für diesen Zweck das Instrument so beschaffen sein soll, daß es auch in der Hand eines minder geübten oder weniger geschickten Impfarztes eine kunstgerechte Ausführung der Impfung gewährleistet. Auch darauf muß bei der Konstruktion desselben Bedacht genommen sein, daß eine große Zahl von Impfungen damit ausgeführt werden können, ohne Auge und Hand des Operateurs allzu sehr zu ermüden. Letzteres erzielt man dadurch, daß man die Lanzette mit einer entsprechend langen Handhabe versieht, damit dieselbe einem Federstiele gleich gehalten werden bzw. wie dieser am Mittelhandknochen des rechten Zeigefingers eine Stütze finden kann. Durch Verwendung von Lanzetten mit breitem Blatte vermeidet man die Ermüdung des Auges. Die Lanzettenspitze muß scharf genug sein, um mit ihr leicht und sicher die Haut einritzen zu können, sie darf jedoch nicht zu scharf sein, damit sie nicht zu tief in die Kutis eindringt und zu stark blutende Impfverletzungen setzt. Bei der vormals üblichen Impfung von Arm zu Arm bediente man sich schmaler, spitziger und kannelierter Impfnadeln, die man in schräger Richtung unter die Epidermis einstach. Erst seit der Einführung der Tierlymphe, welche die Anlegung größerer Kontaktflächen verlangt, wurden Impfinstrumente mit lanzettförmiger Spitze, die „Impflanzetten“, allgemein angewendet, weil sie gestatteten, eine größere Menge von Impfstoff aufzuladen. Um allen erwähnten Bedingungen zu entsprechen und die Impflanzette auch als ein für die später zu schildernde Tegminapplikation geeignetes Hilfsinstrument erscheinen zu lassen, habe ich ein Impfinstrument ersonnen,

das in seiner Form von allen bisher üblichen Impflanzetten bedeutend abweicht. Es ist aus einem Stück vernickelten Stahles verfertigt, besitzt eine halbkegelförmige Spitze, welche dem ziemlich breiten und stumpfen Blatte aufsitzt, das die Depotstelle für das aufzuladende Tegmin und zugleich den Spatel für das Aufstreichen desselben auf die Impfritzer bildet (Fig. 18). Diese Lanzette hat eine gewisse Ähnlichkeit mit einem Gravierstichel. Die Form des Lanzettenblattes zwingt den Operateur beim Impfen zu einer steilen Haltung des Instrumentes, also zu der zweckmäßigsten Stellung für die Handhabung desselben. Die Flachseite der Lanzettenspitze ist für die Aufnahme der für drei Impfritzer ausreichenden Lymphemenge genau berechnet, so wie das eigentliche Lanzettenblatt die zu ihrer Bedeckung entsprechende Tegminmenge aufzunehmen vermag.

Fig. 18.

Nachdem die Impfung als ein kleiner chirurgischer Eingriff zu betrachten ist, der mit voller Anwendung aller Vorsichtsmaßregeln ausgeführt werden muß, die geeignet sind, Wundinfektionskrankheiten zu verhüten, so muß vor allem für die sterile Beschaffenheit des Impfinstrumentes Sorge getragen werden. Die Entscheidung der Frage, auf welche Art die Sterilität (ob durch die Einwirkung der offenen Flamme oder des siedenden Wassers) herbeigeführt werden soll, ist maßgebend einerseits für die Wahl des Materials zur Anfertigung der Lanzettenspitzen, andererseits für die Vorrichtung zu ihrer Sterilisierung. Als Impfinstrument mit ausglühbarer Lanzettenspitze hat die Lindenbornsche Platiniridiumlanzette weite Verbreitung gefunden. Die Sterilisierung geht sehr bequem vonstatten, indem das Platiniridiumplättchen rasch zum Glühen gebracht werden kann und ebenso rasch abkühlt. Wenn ich trotzdem den ganz aus Stahl gefertigten Instrumenten, die nur durch Auskochen rasch und genau sterilisierbar sind, den Vorzug gebe und dementsprechend mich seinerzeit dafür entschied, dem von mir zusammengestellten und im nachfolgenden noch zu schildernden Impfinstrumentarium dieses Prinzip zugrunde zu legen, so waren hierfür folgende Erwägungen maßgebend:

1. Rücksichten auf eine möglichst vollkommene Konstruktion des Impfinstrumentes in chirurgischer Beziehung.

Nur bei Stahllanzetten kann man ohne Rücksicht auf das Herstellungsmaterial allen Forderungen bezüglich der chirurgischen Zweckmäßigkeit (Form, Schärfe und Dauerhaftigkeit der Spitze usw.) vollkommen gerecht werden. So besteht der Nachteil der sonst sehr handlichen Lindenbornschen Platiniridiumlanzette darin, daß das Platiniridiumplättchen, das den schneidenden Teil der Lanzette bildet, zu dünn ist, sich zu leicht verbiegt und zu stark blutende Impfverletzungen setzt, weil das zumeist in abgerundeter Form hergestellte Plättchen die Haut durchschneidet, statt sie nur zu ritzen. Das Hauptmotiv zu ihrer Konstruktion war eben die Absicht, ein durch Rotglut rasch sterilisierbares

und ebenso rasch wieder erkaltendes Impfinstrument zu schaffen, um es bei Massenimpfungen mit entsprechender Raschheit handhaben zu können. Diese Eigenschaften konnten der Lanzette jedoch nur auf Kosten ihrer Vollkommenheit, bzw. unter Einbuße ihrer chirurgisch exakten Beschaffenheit verliehen werden.

2. Rücksichten auf die Erhaltung des keimfreien Zustandes der Lanzettenspitze des bereits sterilisierten Impfinstrumentes.

Wenn man von dem Grundsatze ausgeht, für jeden Impfling ein eigenes Impfinstrument zu benutzen, so muß bei Massenimpfungen eine große Anzahl von Impflanzetten auf einmal sterilisiert werden. Geschieht dies, wie es geschehen soll, unmittelbar vor dem Impfakte durch Auskochen, so kann das den Lanzetten anhaftende Wasser zum Zwischenträger von Verunreinigungen werden. Ich habe deshalb bei meinem Impfinstrumentarium die Anzahl Lanzetten auf drei beschränkt, die in einem bestimmten Turnus in Verwendung kommen, wobei die Spitzen derselben frei gelagert werden. Auch soll man bei unmittelbar vor der Impfung sterilisierten Lanzetten schon beim Anfassen des Lanzettengriffes die Überzeugung gewinnen, daß die Lanzettenspitze hinlänglich ausgekühlt ist, um sie mit Impfstoff armieren zu können. Im Gegenfalle ist es nicht ausgeschlossen, daß man im Eifer der Impftätigkeit (bei ausglühbaren Lanzetten) sich durch Berühren der Lanzettenspitze zu überzeugen sucht, ob diese bereits ausgekühlt sei.

3. Rücksichten auf den Impfakt als abgeschlossenes Ganze, um diesen möglichst expeditiv und einheitlich gestalten zu können.

Für einen überaus wichtigen und unbedingt notwendigen Teil einer streng aseptischen, mit Vorsicht gepaarten Impfung halte ich im Gegensatze zu vielen meiner engeren Fachkollegen die Applikation eines Deckverbändchens zum Schutze der Impfstellen. Ein solches soll nicht nur Primärinfektionen verhüten, sondern vor allem in verläßlicher und einfacher Weise die überschüssige Impflymphe am Orte ihrer Applikation fixieren, um Verschleppung derselben auf entfernt von den Impfstellen gelegene exkoriierte oder ekzematöse Hautpartien zu verhindern. Seit mehr als einem Dezennium erhebe ich immer von neuem diese Forderung, der ich in praxi nicht nur für meine Person ebensolange konsequent nachgekommen bin, sondern in einigen Kronländern*) meines Vaterlandes auch bei den öffentlichen Impfungen zum Durchbruche und allgemeiner Befolgung verholfen habe. Wenn die genannte Schutzmaßregel noch nicht im ganzen Reiche allgemeine Übung gefunden hat, so ist dies nicht etwa im Wesen der Sache, sondern nur in Umständen rein äußerer Natur begründet. Für die Kosten der Impfung haben nämlich in Österreich die autonomen Landesstellen (die Landesausschüsse) aufzukommen und es hängt nur von der Einsicht und dem guten Willen der genannten Landesvertretungen ab, aus diesem Titel erwachsende Mehrkosten zu bewilligen, bezw. diesbezüglichen Anregungen der staatlichen Landessanitätsverwaltung, der nur ein Überwachungsrecht der öffentlichen Impfung zusteht, Folge zu geben. Durch die Einführung des noch zu beschreibenden sogenannten Tegminverbändchens, das ich im Jahre 1897 in die Impfpraxis eingeführt habe, erscheint die vordem als undurchführbar angesehene obligate Be-

*) Ober- und Niederösterreich (mit Einschluß von Wien), Steiermark, Schlesien, Tirol und Vorarlberg, Bukowina.

deckung der Impfstellen durch ein Deck- und Fixationsverbändchen als eine ohne besondere Mühe und Kosten durchführbare Maßregel, die sich seit mehr als einem Dezennium durchaus bewährt hat. Ein ähnliches, eben so einfaches wie verläßliches Verfahren ist bis jetzt nicht bekannt geworden.

Im Jahre 1904 war ich in der Versammlung der Vorstände der Deutschen staatlichen Impfstoffgewinnungsanstalten in Weimar neuerlich in der Lage, mich für diese Maßregel einsetzen zu müssen, als infolge eines bedauerlichen Unfalles bei einer Impfung in der Familie des Tübinger Professors Blochmann die bekannte Publikation dieses Gelehrten: „Ist die Schutzpockenimpfung mit allen notwendigen Kautelen umgeben?“ den Gegenstand eingehender Beratungen bildete. Meine Einwände gegen die Zulänglichkeit der von den Referenten gestellten und zum Beschlusse erhobenen Anträge zur Verhütung derartiger Unfälle und der Hinweis darauf, daß sich die Hauptgefahr der Verschleppung von Impfstoff durch entsprechende Fixation der überschüssigen Lymphe an der Applikationsstelle selbst sicher und leicht mittels der so überaus bequemen Tegminverbändchen vermeiden lasse, blieben wiederum unbeachtet. Die seither alljährlich in nicht zu geringer Zahl in der Literatur vorkommenden Impfkomplikationen, die auf Verschleppung von überschüssiger Lymphe zurückgeführt werden müssen, beweisen, daß diese Frage schon allzulange eine offene geblieben ist.

Von den erwähnten Gesichtspunkten ausgehend und in der Überzeugung, daß nur dann der für die öffentliche Impfpraxis so überaus wünschenswerte einheitliche Impfungsvorgang zu erzielen ist, wenn das Impfinstrumentarium den angedeuteten Bedürfnissen vollständig und in wirklich praktischer Weise Rechnung trägt, habe ich von dem Wiener Instrumentenmacher Fritz Leiter (Firma Josef Leiter) ein aseptisches Impfbesteck herstellen lassen, das allen billigen Forderungen entspricht und tatsächlich auch große Verbreitung gefunden hat. Dasselbe besteht aus einem Etui aus Neusilber von 14 cm Länge, 4 cm Breite und 4 cm Höhe, in welchem drei Lanzetten, eine Flachpinzette, eine Spirituslampe aus Metall und ein verschraubbarer Behälter für Schwefeläther mit Tropfvorrichtung untergebracht sind. Das Material für die Tegminverbände und sterile Gazestreifen oder ein Päckchen mit sterilisierter Verbandwatte können in einem Seitenfache der Umhüllungstasche Platz finden. Das Etui dient gleichzeitig als Kochsterilisator und ist deshalb hartgelötet.

Fig. 19 zeigt das Impfbesteck in geschlossenem Zustande. Die beweglichen Seitenteile dienen als Befestigungsklammern für den Etui-

Fig. 19.

deckel und zugleich als Fußgestell für den Behälter. Zu letzterem Zwecke muß man sie durch einfaches Wegziehen aus ihrer Lage bringen und in die am Boden des Behälters angebrachten Bügel einfügen.

Fig. 20 zeigt das Besteck zu seiner Verwendung bereit aufgestellt und zwar in dem Zeitpunkte, in welchem eine Lanzette nach eben vollzogener Impfung bereits wiederum ins siedende Wasser geworfen worden ist, während die zwei anderen, auf dieselbe Weise sterilisierten Lanzetten auf dem vor dem Kochapparate liegenden Deckel des Etuis so gelagert erscheinen, daß der Hals jeder Lanzette in die dazu bestimmte Einkerbung zu liegen kommt, wodurch ein Freiliegen der Lanzettenspitze gewährleistet ist.

Fig. 20.

Zwei kleine Einkerbungen an der Breitseite des Deckels (fehlen auf der Abblg.) dienen zur bequemen horizontalen Lagerung des Lympheröhrchens, das in geöffnetem Zustande mit seinen Bruchenden ebenfalls vollkommen frei liegt. Bei der weiteren Handhabung verfährt man nun so, daß man für die zweite Impfung eine der beiden auf dem Deckel liegenden Lanzetten verwendet, sie hernach zu der bereits im siedenden Wasser befindlichen wirft, während man letztere gleich darauf mit der Pinzette faßt und sie neben die noch auf dem Deckel liegende, bereits ausgekühlte Lanzette lagert, die man für den dritten Impfling verwendet usf. Durch diesen auch für die folgenden Impfungen einzuhaltenden Turnus ist man in der Lage, für eine unbeschränkte Zahl hintereinander vorzunehmender Impflinge ein vor den Augen der Partei sicher sterilisiertes Instrument benutzen zu können. Der Zeitraum, den man zur mechanischen Reinigung des Impffeldes mittels eines mit Äther befeuchteten Gaze- oder Wattebäuschchens, zur Impfoperation und zur Applikation des Tegminverbändchens benötigt (un-

gefähr 1—1½ Minute) genügt vollauf zur Abkühlung der an die Reihe kommenden Impflanzette. Die Verwendung eines noch nicht hinreichend abgekühlten Instrumentes ist schon dadurch ausgeschlossen, daß man schon durch das Anfassen des Lanzettengriffes allein die Überzeugung gewinnen kann, ob es genügend ausgekühlt ist oder nicht.

Unter Benützung des beschriebenen Instrumentariums spielt sich der Impfvorgang in der öffentlichen Impfstation der Wiener Staatsimpfanstalt folgendermaßen ab:

Die Kinder werden dem Impfarzte mit entkleidetem Oberkörper vorgestellt. Der reingewaschene rechte Oberarm des Impflings wird an der Stelle der vorzunehmenden Impfung (dem Impffelde) in entsprechender Ausdehnung mit einem mit Schwefeläther befeuchteten sterilen Gaze- oder Wattebäuschchen sorgfältig abgerieben. Als Aufbewahrungsgefäß für den Äther wird ein gut schließender Behälter mit Tropfvorrichtung benutzt. Die Impfung erfolgt mittels dreier, je kaum ½ cm langer, 3 cm von einander abstehender der Längsachse des Armes parallel verlaufender, seichter Ritzerchen. Hierbei wird der Oberarm von unten mit der linken Hand umfaßt und die Haut des Impffeldes gespannt. Die Impfinsertionen werden mit der schreibfederartig und zwar steil gehaltenen Lanzette gesetzt, wobei das Nagelglied des rechten kleinen Fingers mit seiner Außenseite einen Stützpunkt an dem zu impfenden Kinderarme findet. Bei Erstimpflingen impfen wir den rechten, bei Revaccinanden den linken Arm, um Narbenhäufung zu vermeiden. Zur Revaccination ist der linke Arm deshalb vorzuziehen, weil er, als der weniger in Anspruch genommene, mehr geschont werden kann. Die Lanzettenspitze wird unmittelbar vor der Schnittführung mit so viel Impfstoff beladen, als auf ihrer Flachseite Platz findet, was am einfachsten so geschieht, daß man dieselbe mit einem Ende des an beiden Seiten geöffneten und etwas schräg gehaltenen Lympheröhrchens in Berührung bringt. Die Ritzer werden also mit der bereits mit Impfstoff armierten Lanzette angelegt und zwar so seicht, daß dieselben wohl blutig tingiert erscheinen, jedoch nicht bluten dürfen. Die blutige Tinktion ist ein Beweis, daß die Epidermis bis zum Papillarkörper durchtrennt wurde, was für die sichere Haftung von Wichtigkeit ist. Es ist nicht rationell, Kreuz- oder Kritzelschnittchen anzulegen, weil dadurch zu große Impfblattern mit unerwünscht heftigen Reaktionen entstehen und häßliche Narben zurückbleiben. Ein nachträgliches Einreiben des Impfstoffes ist unnötig, doch muß sorgfältig darauf geachtet werden, daß in die gesetzte Impffurche tatsächlich Lymphe gelangt, was sich durch den feuchten Glanz derselben offenbart.

Unmittelbar nach vollzogener Impfung wird das T e g m i n v e r b ä n d c h e n auf folgende Art angelegt: durch leichten Druck auf die geöffnete, sterilisiertes Tegmin (von derselben Zusammensetzung, wie es zum Schutze des Impffeldes bei Impftieren angewendet wird) enthaltende Zinntube wird ein großer, für die Bedeckung von drei Impfritzern ausreichender Tropfen dieser halbflüssigen Paste auf den breiten Teil des Lanzettenblattes gebracht und damit die Impfritzer der Reihe nach bestrichen. Sodann wird mit dem Lanzettenblatte, dem noch ein Rest von Tegmin anhaftet, ein zusammenhängendes Päckchen der in einem Papierschächtelchen in Lagen geordneten Zellstoffwattescheibchen aufgenommen, das daran kleben bleibt. Nun fixiert man das an dem Lanzettenblatte nur lose klebende Wattescheibchen durch Anpressen an die von Impfritzern umschlossene Hautpartie noch fester an das Lanzettenblatt und gewinnt dadurch gleichzeitig einen Maßstab, ob man die Impfritzer in

der entsprechenden Distanz von einander angelegt hat. Wenn diese richtig eingehalten worden ist, so dürfen die bestrichenen Impfritzer den Scheibchenrand nicht berühren. Hierauf werden durch rasches, ruckweise und mit leichter Hand erfolgendes Antupfen mit der Unterseite des Scheibenpäckchens die mit Tegmin bestrichenen Impfritzer nach einander mit je einer Zellstofflamelle versehen. Der so geschaffene Deckverband trocknet sehr rasch und ermöglicht es, daß die Impflinge sehr bald nach vollzogener Impfung angekleidet werden können, wodurch sich der Impfakt viel expeditiver gestalten läßt als ohne Tegminverband. Die sonst übliche Weisung an die Begleitpersonen der Impflinge: „die Kinder so lange unbekleidet zu lassen, bis die Lymphe eingetrocknet ist“ wird dadurch überflüssig, ganz abgesehen davon, daß der Impfstoff für sich allein infolge seines Glyzeringehaltes überhaupt nicht vollständig eintrocknen kann, sondern von dem Hemdstoffe aufgenommen bzw. weggewischt wird. Ein lege artis angelegtes Tegminverbändchen hält sicher wenigstens solange, bis die Impfverletzung geschlossen und ein Eindringen von Fremdkeimen

Fig. 21.

Fig. 22.

nicht mehr möglich ist. Häufig genug kann man noch am Revisionstage die Schutzblattern von den Tegminplättchen bedeckt finden, ohne daß dieselben im geringsten die Entwicklung der Schutzblattern ungünstig beeinflußt hätten. Auch die Austrocknung der letzteren wird nicht behindert, ganz abgesehen davon, daß man die Plättchen von den Blattern durch einfaches Abheben mit den Fingerspitzen ohne Verletzung der Pusteldecke ablösen kann. Die verläßliche Fixation der Glyzerinlymphe am Orte ihrer Applikation wird durch das Tegminverbändchen in einfachster Weise erreicht und dadurch ihre Verschleppung sicher verhütet. Bei einiger Übung ist man imstande, 30—40 Impflinge in einer Stunde auf die geschilderte Art unter allen Verhältnissen in streng aseptischer Weise zu impfen.

Fig. 21 zeigt einen eben geimpften Kindesarm und die Hand des Impfarztes in jenem Zeitpunkte und in jener Stellung, um mit der mit Tegmin beladenen Lanzette den ersten Impfritzer zu bestreichen. Auf der Fig. 22 erscheinen die oberen Impfritzer bereits mit den Zellstoffscheibchen*) versehen, während der letzte einer solchen Bedeckung noch harrt.

Obwohl im allgemeinen bei entsprechender Reinhaltung der Impflinge eine besondere Nachbehandlung der bereits entwickelten Schutzblattern nicht notwendig ist, so ist doch bei der Undurchführbarkeit, ja Unzweckmäßigkeit eines Dauerverbandes die Ersprießlichkeit eines die Austrocknung der Schutzblattern befördernden Verfahrens nicht zu leugnen. Auch verhindert man dadurch die Anwendung von unzweckmäßigen, ja oft geradezu schädlichen Hausmitteln seitens der Pflegepersonen der Impflinge.

Wir verwenden zu diesem Zwecke unter Zugrundelegung des alten Erfahrungssatzes, daß ein möglichst exspectatives Verhalten, d. h. eine „trockene“ Behandlung am zweckmäßigsten ist, ein Streupulver von folgender Zusammensetzung: Dermatoli, Zinci oxyd. aa 10 g, amyli, talci aa 40 g. Ich lasse seit dem Jahre 1898 in unserer Impfstation an die Impfparteien dieses Pulver in Streusäckchen aus Gaze, die in Pappschächtelchen verwahrt sind, verabreichen, um eine reinliche Anwendung desselben möglichst zu sichern. Diese Dermatolpudersäckchen haben sich durchaus bewährt und erfreuen sich bei den Müttern großer Beliebtheit. Eine Annehmlichkeit des Streupulvers rein äußerer Natur ist es, daß die Reaktionszonen dadurch maskiert werden, was bei ängstlichen Müttern ein großes Beruhigungsmittel ist.

Fig. 23.

Abbildung Fig. 23 stellt den Vorgang dar, wie der Impfarzt ein solches Streupulversäckchen handhabt.

*) Die Tegminverbändchen werden von dem Apotheker B. Rothziegel in Wien in zwei zweckmäßigen Packungen hergestellt und zwar: a) für Massenimpfungen und b) für Einzelimpfungen. Für ersteren Zweck sind die Zellstoffscheibchen in kleinen viereckigen Papierschachteln in Lagen geordnet und für 25 Impflinge berechnet. Für Einzelimpfungen sind je 2 Zellstoffscheibchen in 10 kleinen Papierkapseln mit perforierten Rändern untergebracht. In jedem Päckchen befindet sich je eine Zinntube mit der entsprechenden Tegminmenge. In der Packung a) eine solche für 25 Impflinge, in der Packung b) für 10 Impflinge.

Literatur.

In dem vorliegenden Verzeichnisse sind nur die zitierten oder gegenständlichen Werke aufgenommen.

Vollständige Literaturverzeichnisse über Vaccination finden sich bei L. Pfeiffer, Jennerliteratur, Petersburg, C. Ricker, 1891; bei Huguenin in Lubarsch-Ostertag (1899) und in den Voigtschen Jahresberichten im Archiv für Kinderheilkunde.

Badcock, J., The production of vaccine. Brighton (ohne Angabe der Jahreszahl).

Bauer, M., Über Antiseptik beim Impfen. Mitt. des Wiener mediz. Doktorenkolleg. 1885, Bd. XI.

Bauer, M., Die Schutzpockenimpfung und ihre Technik. Stuttgart 1890.
Benoit et Roussel, De la vaccine jennérienne chez le cobaye. Compt. rend. de Biol. 1901, pag. 903.
Blass, C., Die Impfung und ihre Technik. Leipzig 1894.
Blezinger, Über die Fortzüchtung des Impfstoffes von Tier zu Tier. Versammlung d. Vorst. d. staatl. Impfstoffgew.-Anst. in Düsseldorf 1898. Allgem. med. Central-Ztg. 1899, Nr. 30 u. 31.
Blochmann, F., Ist die Schutzpockenimpfung mit allen notwendigen Kautelen umgeben? Tübingen 1904.
Bohn, H., Handbuch der Vaccination. Leipzig 1875.
Boisson, Des effets du vieillissement sur la pulpe vaccinale glycerinée. Revue d'hygiène 1900. Tome XXII, pag. 809.
Bollinger, O., Über Menschen- und Tierpocken. Leipzig 1877.
Ders., Über animale Vaccination. Leipzig 1879.
Bondesen, Kasuistisches zur Frage der Immunität bei Kindern nach erfolglosen Impfungen. Allgem. med. Zentral-Ztg. 1899, Nr. 28.
Bouley, M. et Reynal, Nouveau dictonnaire pratique de médecine etc. Paris 1881. Artikel Horsepox.
Bousquet, J. B., Sur le cow-pox découvert à Passy le 22 Mars 1836. Paris 1836.
Ders., Nouveau traité de la vaccine etc. Paris 1848.
Bremer, J. J., Nachricht von den zu Berlin mit dem Stoffe der Mauke oder Grease angestellten Impfungsversuchen. Hufelands Journal 1804. 1. Stück.
Ders., Die Kuhpocken, 3. Aufl. Berlin 1810.
Brinkerhoff, Tyzzer und Councilman, Studies upon experimental variola and vaccinia in quadrumana. Studies from the Rockefeller Institute for medical research. Vol. V, 1905.
Brisset, Reflexions sur la vaccine et variole etc. Mémoire, la le 28. 5. 1818 dans la Société de med. de Paris.
Bulmerincq, M. E. v., Die Verbreitung des Schutzpockenstoffes aus Findelanstalten, mit besonderem Bezug auf das Hauptschutzpocken-Impfstitut zu Wien, Leipzig 1862.
Ders., Über Findelhäuser als Quelle der Schutzimpfung etc., Leipzig 1865.
Calmette et Guérin, Recherches sur la vaccine expérimentale. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1902.
Carini, A., Il controlle obligatorio dello stato sui sieri e sui vaccini. Turin 1901.
Ders., Kuhpockenlymphe und Tuberkulose. Centralbl. f. Bakt. etc. 1904, Heft 2.
Ders., Impftisch für Rinder, ebend. XXXVII.
Ders., Kuhpockenlymphe und Tetanus, ebend. Heft 1.
Ders., Su alcuni metodi di depurazione rapida del vaccino Ienneriano. Rivista d'Igiene e Sanita pubblica 1905, Vol. XVI.
Ders., Beitrag zur Kenntnis der Filtrierbarkeit des Vaccinevirus. Centralbl. f. Bakt., Parasitenkunde u. Infektionskrankh. 1906, Bd. XLII, Heft 4.
Carro, J. de, Observations et expériences sur l'inoculation de la vaccine. Vienne 1801.
Ders., Anweisung, mit der Kuhpockenmaterie zu impfen. Reichsanzeiger 1801, No. 23.
Carsten, B., La vaccination animale dans les Pais-Bas. La Haye 1877.
Ders., Resultats des vaccinations animales 1868—1878. La Haye 1879.
Ceely, R., Beobachtungen über die Kuhpocken, die Vaccination, Retrovaccination und Variolation der Kühe. Stuttgart 1841.
Chalybäus, Th., Die animale Vaccination im Kgl. Impfinstitut zu Dresden. Deutsche med. Ztg. 1888.
Ders., Bericht über die Tätigkeit des Impfinstitutes zu Dresden im Jahre 1889. Manuskript.
Ders., Zur Technik der Gewinnung und Zubereitung des tierischen Impfstoffes. Sächs. Corresp.-Blatt 1890, Nr. 4.
Ders., Über die Ergebnisse der Lympheuntersuchungen in bezug auf ihren Keimgehalt (Einfluß des Tegminverbandes). Ref. in der Versammlung der Vorst. der deutschen Impfstoffgew.-Anst. Aachen 1900. Allgem. med. Central-Ztg. 1901, Nr. 16 u. ff.
Ders., Zur Impfstofffrage. Deutsche med. Wochenschr. 1896, Nr. 11.
Ders., Über Vaccine und Vaccination. Jahrb. der Ges. für Natur- und Heilkunde zu Dresden 1896/97.
Chambon et St. Ives Menard, Epuration de la pulpe vaccinale glycerinée. Annal. d'Hyg., Tome XXIX.
Chaumier, E., Antisepsis in den Impfanstalten. Ref. Münchner med. Wochenschrift 1895, pag. 99.

Chaumier, E., A propos du rapport de la commission de the Lancet sur la pulpe vaccinale glycerinée. Lancet 1900, Tome I, pag. 1831 und Gazette des hôpit. 1900, pag. 89.

Ders., Transformation de la variole en Vaccine. Gazette méd. du centre 1903, Nr. 3.

Ders., Le Vaccin Z. etc. Tours 1905.

Chaumier, E. und Rehns, J., Notes expérimentales sur la vaccine. Ebenda, Nr. 5 und Compt. rend. de la soc. de Biol. 1903.

Chauveau, A., Viennois, A. et Mejnet, Vaccine et variole, nouvelle étude expérimentale sur la question de l'identité de ces deux affections. Paris 1865.

Dies., Nature du virus vaccin. Compt. rend. hebd. de soc. de l'Acad. des sc. 1868, Tome LXVI, Nr. 7.

Cohn, F., Organismen der Pockenlymphe. Virchows Archiv, Bd. LV, pag. 229.

Cohn, M., Variola etc. Eulenburgs Real-Encyklopädie 1901. Dritte Auflage.

Czaplewski, Über bakteriologische Untersuchung von Pockenlymphe. (Ref. in der Versamml. der Vorst. der staatl. Impfstoffgew.-Anst. in Düsseldorf 1898.) Allgem. med. Central-Ztg. 1899, Nr. 30 und 31.

Ders., Zur Bakteriologie der Lymphe. Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 45.

Degive, A., Notice sur l'office vaccinogène central de l'état. Bruxelles 1884.

Deelemann, M., Über den Bakteriengehalt der Schutzpockenlymphe. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 1897, Bd. XIV.

Depaul, M., Nouvelles recherches sur la véritable origine des virus vaccin 1863.

Ders., De l'origine réelle du virus vaccin. Réponse aux objections etc. Paris 1864.

Ders., Expériences faites à l'Academie Impériale de Médecine avec le cow-pox ou vaccin etc. Paris 1867.

Ders, Sur la vaccination animale. Paris 1867.

Deutl, J., Die Impfung mit animaler Lymphe. Monatsschr. der Ver. der Tierärzte in Österreich 1887, Nr. 7.

Ders., Beiträge zur animalen Impfung. Linz 1888.

Dezoteux, F. et Valentin, L., Traité historique et pratique de l'inoculation. Paris 1802.

Doering, Apparat zur Bereitung emulsionierter Impf-Lymphe. Illustr. Monatsschr. der ärztl. Technik 1890, Heft 2.

Dornseiffen, G., Der Kuhpockenimpfstoff und seine Bereitung. Amsterdam 1904.

Eilerts de Haan, L. J., Vaccine et retrovaccine à Batavia. Ann de l'Inst. Pasteur 1905, Tome X.

Felix, E., Contribution à l'étude de l'identité de la variole et de la vaccine. Bull. de la soc. Vaudoise des sciences naturelles, Tome XXXIX.

Félix et Flück, Le triturateur Félix, Institut vaccinogène Suisse. Circulair. Lausanne 1905.

Fischer, Über Variola und Vaccine und Züchtung der Variola-Vaccinelymphe. Karlsruhe 1892.

Freund, M. B., Bericht über die Leistungen auf dem Gebiete der Vaccinationslehre. Vierteljahrsschr. für Derm. u. Syph. 1887.

Ders., Die animale Vaccination etc. Breslau 1887.

Freyer, M., Über den heutigen Stand der Variolavaccinefrage. Zeitschr. für Hyg. und Infektionskrankh. 1896, Bd. XXIII.

Ders., Die Übertragung von Variola auf Kälber behufs Erzeugung von Vaccine. Ebenda, 1896, pag. 277.

Ders., Impfanstalten in Italien. Vierteljahrsschr. für gerichtl. Med. etc. Bd. XXIV, pag. 2.

Friedinger, C., Über die Einführung einer neuen Genitur der Kuhpockenlymphe, sowie über den Wert und die Geschichte der Regenerierung. Wien 1859.

Ders., Über die Hauptaufgabe des Schutzpocken-Impfungs-Institutes in Wien etc. Österr. Zeitschr. für prakt. Heilkunde 1861, Nr. 21.

Ders., Antwort über Dr. Bulmerincqs Mitteilung etc. Wiener med. Wochenschr. 1868, Nr. 104.

Fröhlich, Th., Versuche über Retrovaccination. Württemberg. med. Korr.-Bl. 1867.

Ders., Die Vermischung der Schutzblatternlymphe mit Glyzerin. Ebenda 1869.

Frosch, P., Bericht über die Tätigkeit der von dem Minist. der geistl., Unterr.- und Mediz.-Angelegenh. eingesetzten Kommission zur Prüfung der Impfstofffrage. Berlin 1896.

Fürbringer, Impfung. Eulenburgs Real-Encyklopädie d. g. H. Bd. X. 2. Aufl.

Fürst, L., Der gegenwärtige Stand der animalen Vaccination. Klinische Vortr. 1891, Nr. 30. N. F.

Ders., Bericht über die Tätigkeit der Anstalt für animale Impfung zu Leipzig. Korresp.-Blatt der ärztl. Kreis- und Bezirks-Vereine im Königr. Sachsen 1882, Nr. 7 und 8.

Galbiati, G., Memoria sulla inculazione vaccina. Napoli 1810.
Garré, C., Über Vaccine und Variola, Bakteriol. Untersuchungen. Deutsche med. Wochenschr. 1887 vom 24. und 31. März.
Gorini, C. H., Controlle del vaccino mediante le inoculazioni corneali. Rom 1899.
Green, A. B., Preliminary note on the use of Chloroform in the Preparation of vaccine lymph. Lancet 1903, pag. 1738.
Guarneri, G., Recherches sur la pathogénèse et l'étiologie de l'infection vaccinique et varioleuse. Arch. ital. de Biol. 1893, Vol. XIX.
Guérin, Controle de la valeur des vaccins Jenneriens par la numération des éléments virulents. Ann. de l'inst. Pasteur 1905.
Haccius, Ch., Variolo-Vaccine. Genf 1892.
Haccius, Ch. und Éternod, Contribution a l'étude de la variolo-vaccine. Revue médicale de la Suisse romande 1892, Nr. 7 und 8.
Hay, M., Erfahrungen über die Impfung mit Kuhlymphe. Wien 1878.
Ders., Die Technik der Vaccination mit animalischer Lymphe. Wien 1881.
Ders., Anstalts-Jahresbericht pro 1882. Wien 1883.
Ders., Die animale Vaccination. Wien 1886.
Ders., Die Kuhpockenimpfung in Deutschland, Holland, Belgien und Österreich. Wien 1890.
Ders., Neue Behelfe bei der Bereitung des Kuhpockenimpfstoffes und der Verfüllung desselben. Österr. Sanitätswesen 1895, Nr. 29.
Heinrich, J. N. v., Die Kultur der animalen Vaccination etc. Wien 1887.
Hering, E., Über Kuhpocken an Kühen. Stuttgart 1839.
Hervieux, Causes de l'affaiblissement de la virulence du vaccin dans les colonies et moyens d'y remédier. Gaz. des hôpit. 1900.
Huguenin, G., Die Pocken. Ergebnisse der allgem. Pathologie etc. In Lubarsch-Ostertag. Wiesbaden 1899.
Hückel, A., Die Vaccinekörperchen. Jena 1898.
Jaksch, R. v., Über den klinischen Verlauf der Schutzpocken. Jahrb. für Kinderheilkunde 1888.
Jenner, Edw., Untersuchung über die Ursachen und Wirkungen der Kuhpocken. Aus dem Englischen übersetzt von G. F. Ballhorn, Hannover 1799.
Ders., Fortgesetzte Beobachtungen über die Kuhpocken. Mit Anmerkungen aus dem Englischen übersetzt, ebenda 1800.
Juncker, J. C. W., Archiv der Ärzte und Seelsorger wider die Pockennot. Leipzig 1796—1798.
Kitt, Th., Wert und Unwert der Schutzimpfungen gegen Tierseuchen. Berlin 1886.
Kübler, P., Geschichte der Pocken und der Impfung. Bibliothek von Coler, Bd. I. Berlin 1901.
Landmann, Bakteriologische Untersuchungen über den vaccinalen Impfstoff. Hyg. Rundschau 1895, pag. 975.
Lanoix, Étude sur la vaccination animale. Paris 1866.
Layet, A., Traité pratique de la vaccination animale. Paris 1889.
Ders., Expérience sur l'unicité de la variole et de la vaccine. Bull. de l'acad. de méd. de Paris, Gaz. des hôpit. 1897.
Leoni, O., Sur les agents specifiques et pathogènes du vaccin. Rev. d'hyg. et de police, Paris 1894. Ref. Hyg. Rundschau 1895, Nr. 21.
Ders., Sulla scoperta del modo di rendere bacteriologicamente puro il vaccino animale etc. Rom 1896.
Lovy, M., Über Vaccination, Revaccination und Retrovaccination. Beilage zu Nr. 13 der Wiener med. Wochenschr. 1859.
Meder, E., Übertragung von Variola auf Kälber. Versamml. d. Vorst. der staatl. Impfstoffgew.-Anstalt in Düsseldorf 1898. Allgem. med. Zentral-Ztg. 1899, Nr. 30 und 31.
Medizinal-statistische Mitteilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. (Die Tätigkeit der im Deutschen Reiche errichteten staatlichen Anstalten zur Gewinnung von Tierlymphe.) 1888—1904.
Migula, Der Keimgehalt und die Widerstandsfähigkeit der Bakterien der animalen Lymphe. Arbeiten aus dem bakt. Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe 1901.
Monckton-Copeman, C., The bacteriology of vaccine Lymphe with special reference to an improved method for its storage. Brit med. journ. 1893.
Ders., The interrelationship of variola and vaccinia. Zentralbl. für Bakt. usw. 1903, Nr. 23.
Müller, E., Über Pockenimpfung und über die Bedeutung der Glyzerinlymphe. Berliner klin. Wochenschr. 1866, Nr. 13.

NEGRI, Filtrierbarkeit des Vaccinevirus. Gaz. med. ital. 1905, Nr. 13.
NEIDHART, Über die Wahl des Impffeldes für die Lymphegewinnung am Kalbe. Ref. in der Versamml. d. Vorst. der staatl. Impfstoffgew.-Anst. in Düsseldorf 1898. Allgem. med. Zentral-Ztg. 1899, Nr. 30 und 31.
Ders., Über Fortschritte in der Erreichung der Keimfreiheit der Lymphe. Erfahrungen mit Deckverbänden mit Ablagerung der Lymphe vor dem Verbrauche. Ref. in der Versamml. der Vorst. der staatl. Impfstoffgew.-Anst. in Aachen 1900. Allgem. med. Zentral-Ztg. 1901, Nr. 16 u. ff.
Ders., Wissenschaftliche Mitteilungen über keimfreie Lymphe. Ref. in der Versamml. d. Vorst. der staatl. Impfstoffgew.-Anst. in Frankfurt 1896. Allgem. med. Zentral-Ztg. 1896. Dezember.
NIJLAND, A. H., Die Abtötung von Bakterien in der Impflymphe mittelst Chloroform. Arch. für Hygiene 1906, Bd. LVI.
OSIANDER, F. B., Ausführliche Abhandlung über die Kuhpocken. Göttingen 1801.
PAUL, G., Jahresbericht der K. K. Impfstoffgew.-Anst. in Wien über das Betriebsjahr 1896. Österr. Sanitätswesen 1897, Nr. 39—41.
Ders., Dasselbe, Betriebsjahr 1897; ebenda 1898, Nr. 37—39.
Ders., Dasselbe, Betriebsjahr 1898; ebenda 1899, Nr. 41—44.
Ders., Dasselbe, Betriebsjahr 1899; ebenda 1900, Nr. 36—40.
Ders., Dasselbe, Betriebsjahr 1900; ebenda 1901, Nr. 39—42.
Ders., Über Impfung, ihren Nutzen und ihre Durchführung in Österreich. Monatsschrift für Gesundheitspflege. Wien 1896, Nr. 11.
Ders., Studie über aseptische Methoden der Schutzpockenimpfung usw. Österr. Sanitätswesen 1896, Nr. 23.
Ders., Über rationelle Gewinnung eines reinen (keimarmen) animalischen Impfstoffes. Ebenda 1896, Beilage zu Nr. 43.
Ders., Ein neuer Behelf zur aseptischen Verreibung des Impfstoffes. Ebenda 1897, Nr. 34.
Ders., Über eine verlässliche Methode zur Erzeugung einer von vornherein keimarmen animalen Vaccine. Ebenda 1898, Nr. 52.
Ders., Über einige Fortschritte in der Gewinnung tierischen Impfstoffes und der Aseptik der Schutzpockenimpfung. Wiener med. Presse 1898, Nr. 4 u. ff.
Ders., Erfahrungen bei der Verwendung abgelagerter Lymphe. Ref. in der Versamml. d. Vorst. der staatl. Impfstoffgew.-Anst. in Düsseldorf 1898. Allgem. med. Zentral-Ztg. 1899, Nr. 30 und 31.
Ders., Studie über die Ätiologie und Pathogenese der sog. generalisierten Vaccine bei Individuen mit vorher gesunder oder kranker Haut. Arch. für. Dermat. und Syph. 1900, Bd. LII, Heft 1.
Ders., Die Entwickelung der Schutzpockenimpfung in Österreich. Jubiläumswerk: Österreichische Wohlfahrtseinrichtungen 1848—1898. Wien 1901.
Ders., Über den gegenwärtigen Stand der aseptischen Impftechnik. Österr. Sanitätswesen 1901, Nr. 46 und 47.
Ders., Zur Frage der Beurteilung der Revaccinationserfolge. Ebenda 1903, Nr. 6.
Ders., Über Impfschäden. Ebenda 1904, Nr. 8—16.
Ders., Kritische Bemerkungen zur Impfung unter Rotlicht. Ref. in der Versamml. des Vereines der Sanitätsbeamten in Niederösterreich. Mitteil. dies. Ver. 1905, Nr. 1.
Ders., Über drei Fälle von Vaccina serpiginosa. (Vorläufige Mitteilung.) Versamml. d. Vorst. der staatl. Impfstoffgew.-Anst. in München 1906. Hygien. Rundschau Nr. 23 und 24.
Ders., Promemoria über den derzeitigen Stand der Impffrage. Ref. des K. K. niederösterr. Landes-Sanitätsrates. Österr. Sanitätswesen 1906. Beilage zu Nr. 52.
PEARSON, G., Untersuchungen über die Geschichte der Kuhpocken. Aus dem Engl. von Küttlinger. Nürnberg 1800.
PEIPER, E., Über das Vaccinefieber. Zeitschr. für klin. Medizin 1890.
Ders., Die Schutzpockenimpfung. Berlin-Wien 1901. 3. Aufl.
PFEIFFER, E., Über die Züchtung des Vaccineerregers in dem Korneaepithel des Kaninchens usw. Centralbl. für Bakt. 1895, Bd. XXV.
PFEIFFER, L., Die Rückimpfung auf Kühe. Deutsche Vierteljahrsschrift für öffentl. Gesundheitspflege 1879, Bd. XI, Heft 4.
Ders., Über die Rückimpfung auf Kühe und Kälber und die Technik dieser Methode. Jahrb. für Kinderheilkunde 1882.
Ders., Die Herstellung von animaler Lymphe zu Massenimpfungen usw. Korresp.-Bl. des allgem. ärztl. Ver. von Thüringen 1882, Nr. 5.
Ders., Beiträge zur Würdigung der Retrovaccine und der Flächenimpfung. Weimar 1883. Korresp.-Bl. des allgem. ärztl. Ver. von Thüringen 1883, Nr. 9.

Pfeiffer, L., Die Vaccination usw. Tübingen 1884.
Ders., Über die Züchtung des Vaccineerregers im Kornealepithel des Kaninchens, Meerschweinchens und Kalbes. Jena 1885 und Centralbl. für Bakt. u. Parasitenkunde, Bd. XVIII, Nr. 25.
Ders., Über Sproßpilze in der Kälberlymphe. Ebenda 1886, Nr. 10.
Ders., Über die Notwendigkeit einer tierärztlichen Untersuchung der Impfkälber. Ebenda.
Ders., Die bisherigen Versuche zur Reinzüchtung des Vaccinekontagiums und die Antiseptik der Kuhpockenimpfung. Zeitschr. für Hygiene 1887.
Ders., Die Schutzpockenimpfung. Tübingen 1888.
Ders., Die neueren, seit 1887 vorgenommenen Versuche zur Reinzüchtung des Vaccinekontagiums. Münchener med. Wochenschr. 1892, Nr. 51.
Ders., Bericht über die Tätigkeit des Großherzogl. sächischen Impfinstitutes in Weimar 1888.
Ders., Behandlung und Prophylaxe der Blattern. Pentzold und Stinzing Bd. I. Jena 1902.
Pissin, Reform der Schutzpockenimpfung durch die Vaccination direkt von Kühen. Berlin 1868.
Ders., Die beste Methode der Schutzpockenimpfung. Berlin 1874.
Ders., Bericht über die 14jährige Wirksamkeit des Impfinstitutes für animale Vaccination. Berlin 1879.
Ders., Über den jetzigen Standpunkt der animalen Vaccination in Deutschland. Deutsche med. Wochenschr. 1886, Nr. 44 und 45.
Piza, M., Kurze Anleitung zur Züchtung, Konservierung und Verwendung animaler Lymphe. Centralbl. für allg. Gesundheitspflege 1884.
Pöppelmann, Aseptische Schutzpockenimpfung. Deutsche med. Wochenschr. 1899, Nr. 10.
Pourquier, P., Preuve expérimentale de la dégénérescence du vaccin etc. Montpellier 1887.
Ders., Un parasite du cow-pox. Montpellier 1888. Extr. de la gaz. hebdom. des sciences méd., Mars.
Ders., Des accidents cutanés qu'on observe parfois après la vaccination animale etc. Paris 1889.
Prinz, C. G., Praktische Abhandlung über die Wiedererzeugung der Kuhpockenlymphe etc. Dresden 1839.
Rapport général sur les vaccinations et revaccinations en France et aux colonies pendant l'année 1904. Melun 1906.
Rehns, J., Quelques experiences sur la vaccine. Compt. rend. de la soc. de Biol. 1903.
Reissner-Darmstadt, Über eine einfache Methode zur Aufbewahrung tierischen Impfstoffes. Deutsche med. Wochenschr. 1881, Nr. 30.
Reiter, M., Kurze Anleitung der Regeneration der Schutzpockenlymphe. Kgl. bayer. Intelligenzblatt für den Isarkreis 1836.
Ders., Über die Impfung der Kühe mit Menschenblatternstoff. Jahrb. d. ärztl. Ver. in München 1841.
Ders., Beiträge zur richtigen Beurteilung der erfolgreichen Impfung. München 1846.
Ders., Studien über Ansteckungsfähigkeit des Kuhpockenstoffes. Ärzt. Intelligenzbl., Bd. IV. München 1872.
Ders., Beobachtungen über originäre Kuhpocken. Ärztl. Intelligenzbl. München 1874.
Risel, Über die Fortschritte in der Erzeugung und Konservierung animaler Lymphe. Halle 1883.
Ders., Über die Eigentümlichkeiten der animalen Vaccination. Ärztl. Vereinsbl. 1884, Nr. 4. Halle.
Ders., Zur Frage der animalen Impfung. Deutsche med. Wochenschr. 1886, Nr. 19.
Ders., Zur animalen Vaccination. Vierteljahrsschr. für gerichtl. Medizin 1886.
Rossi-Doria, T., Sulla scoperta del modo di rendere batteriologicamente puro il vaccino animale. Rom 1900.
Rybak, J., Die Privatanstalt für Gewinnung animalen Impfstoffes in Neuhaus. Österr. Sanitätswesen 1893, Nr. 27 und 28.
Sacco, L., Trattato di vaccinazione con osservazione sul giovardo e vajuolo pecorino. Milano 1809. Neue Entdeckungen über die Kuhpocken, die Mauke und die Schafpocken. Aus dem Italienischen übersetzt von W. Sprengel. Leipzig 1812.
Schulz, M., Impfung, Impfgeschäft und Impftechnik. Berlin 1891. 2. Aufl.
Seaton, E., A handbook of vaccination. London 1868.
Senfft, A., Mitteilungen von Versuchen über den gegenseitigen Ausschluß von Kuh- und Menschenpocken usw. Berliner klin. Wochenschr. 1872, Nr. 17.
Simpson, J. J., Proposal to stamp out small-pox. Edinburgh 1868.

SOBOTKA, J., Zur Kenntnis des Vaccineprozesses. Zeitschr. für Heilkunde 1893.
STEINBRENNER, CH., Traité sur la vaccine etc. Paris 1845.
STUMPF, L., Über Züchtung von Tierlymphe. Münchener med. Wochenschr. 1898, Nr. 5.
Ders., Beitrag zur Variola-Vaccine. Ref. in der Versamml. der Vorst. der staatl. Impfstoffgew.-Anst. in Aachen 1900. Allgem. med. Central-Ztg. 1901, Nr. 16 u. ff.
Ders., Über Variolavaccine. Münchener med. Wochenschr. 1901.
Ders., Über Variola-Vaccine. Versamml. der Vorst. der deutschen staatl. Impfstoffgew.-Anst. in München. Hyg. Rundschau 1906, Nr. 23 und 24.
Ders., Über die Ergebnisse von Züchtungsversuchen. Versamml. der Vorst. der deutschen staatl. Impfstoffgew.-Anst. in Karlsbad 1902. Ebenda 1903, Nr. 22 und 23.
SÜPFLE, K., Beiträge zur Kenntnis der Vaccinekörperchen. Heidelberg 1905.
SUNDERLAND-BARMEN in Hufelands Journal 1830.
THIELE, B., Die Menschen- und Kuhpocken in ihrer Identität mit Rückbildung ersterer zu Vaccine usw. Henkes Zeitschr. für Staatsarzneikunde, 1. Vierteljahrsheft. Erlangen 1839.
UNGER, F., Geschichte der Kuhpocken-Regenerierungs-Anstalt zu St. Florian in Steiermark. Wochenbl. der K. K. steierm. Landwirtschaftsgesellsch. 1858, Nr. 13.
Ders., Regenerierung der Kuhpockenlymphe. Verhandl. der deutschen Forst- und Landwirte in Graz 1846.
VALENTIN, L., siehe DEZOTEUX.
VANSELOW-FREYER, Zur Prüfung der Impfstofffrage. 2. Bericht. Berlin 1899.
VANSELOW und CZAPLEWSKI, Beitrag zur Lehre von den Staphylokokken der Lymphe. Centralbl. für Bakt. und Paras. 1898, Bd. XXV.
VIOLI, B., Lo stabilimento vaccinogeno in Pera. Konstantinopel 1887.
VOIGT, L., Der Erfolg mit der animalen Vaccine in der Hamburger Impfanstalt. Leipzig 1879.
Ders., Vaccine und Variola. Deutsche Vierteljahrsschr. für öffentl. Gesundheitspfl. 1882.
Ders., Die Technik der Impfung. P. Börners Reichs-med. Kalender 1883.
Ders., Erfahrungen bei Verimpfung animaler Vaccine in der Form der Glyzerinemulsion. Deutsche med. Wochenschr. 1886, Nr. 31.
Ders., Über zentrifugierte Lymphe. Allgem. med. Central-Ztg. 1897, Nr. 1.
Ders., Impfschutz und Variolavaccine. Deutsche med. Wochenschr. 1898.
Ders., Impfung und Variolavaccine. Versamml. deutscher Naturforscher und Ärzte in Düsseldorf. Leipzig 1899.
Ders., Der Schutzwert verschiedener Impfstoffe. Ref. in der Versamml. der Vorst. der staatl. Impfstoffgew.-Anst. in Aachen 1900. Allgem. med. Central-Ztg. 1901, Nr. 16 u. ff.
Ders., Über die Nachbehandlung der Impfpocken. Versamml. der Vorst. der deutschen Impfstoffgew.-Anst. in Karlsbad. Ebenda 1903, Nr. 22 und 23.
Ders., Beitrag zur Gewinnung von Variolavaccine. Monatsh. für prakt. Dermat. 1905, Bd. XL
Ders., Über die Brauchbarkeit des aus Kaninchen gezüchteten Kuhpockenimpfstoffes. Versamml. der Vorst. der deutschen Impfstoffgew.-Anst. in München. Hyg. Rundschau 1906, Nr. 23 und 24.
Ders., Über die Versorgung der Tropen mit Kuhpockenimpfstoff. Ebenda.
WARLOMONT, Nouvelle communication sur la vaccination animale. Bull. de l'acad. rend. de méd. de Belgique. Bruxelles 1865.
Ders., Vaccination animale. Bruxelles 1876.
Ders., Traité de la vaccine et de la vaccination humaine et animale. Paris 1883.
Ders., Nouvelles recherches sur les origines de la vaccine. Bull. de l'acad. royale de méd. de Belgique. Bruxelles 1883.
WESCHE, Die animale Vaccination im Herzogtum Anhalt. Leipzig 1898.
WOODVILLE, W., Geschichte einer Reihe von Kuhpockenimpfungen. Im Auszug aus dem Englischen übersetzt von Ballhorn. Hannover 1866.
ZÖHRER, A. F., Der Vaccineprozeß und seine Krisen. Wien 1846. 2. Auflage.

XVIII.

Subkutane Anwendung von Pockenvaccine.

Von

W. Knoepfelmacher

in Wien.

Die Frage, ob es möglich sei, auch von anderen Stellen als der Cutis aus Immunität gegen Vaccine zu erzielen, ist zum ersten Male von CHAUVEAU (1866—1877) in großem Stile in Angriff genommen worden. Seine Untersuchungen erstreckten sich auf verschiedene Tiergattungen, das Pferd, das Rind und den Menschen. Bei den 1877 ausführlich veröffentlichten Experimenten hat CHAUVEAU wichtige Experimente zu verzeichnen. Die subkutane Injektion von Vaccine ist beim Pferde ebenso wie die intravenöse und die Injektion in die Lymphbahn von Immunität gegen eine subepidermoidale Revaccination gefolgt. Die subkutane Vaccineinjektion ist beim Pferde vor einer Tumorbildung an der Injektionsstelle gefolgt, welche nach einigen Tagen verschwindet. In manchen Fällen ist die Injektion in das subkutane Zellgewebe (ebenso wie eine Injektion in die Blutbahn oder die Lymphgefäße) von einem Exanthem gefolgt, welches CHAUVEAU wegen seiner Beschaffenheit und seiner typischen Lokalnatur als vaccinales Exanthem auffaßt. In anderen Fällen fehlt dieses Exanthem und doch besteht auch in diesem volle Immunität gegen Revaccination, er bezeichnet dies darum als „vaccine sans exanthème“.

Auch beim Rinde gelingt es durch subkutane Injektion von Vaccine Immunität zu erzeugen; auch hier tritt Tumorbildung an der Injektionsstelle auf, auch hier ist die Immunität eine volle. Zum Unterschiede vom Pferde ist beim Rinde die subkutane Injektion von Vaccine niemals von einem Exanthem gefolgt.

Beim Menschen (Kinde) hat CHAUVEAU sechs Versuche ausgeführt; es wurden 2—4 Zentigramm Lymphe subktan injiziert. Drei Kinder hatten keine lokale Tumorbildung, die Revaccination hatte ein positives Ergebnis; die drei anderen Kinder hatten einen lokalen Tumor, nur zwei von diesen wurden revacciniert und zwar eines zweimal, jedes Mal ohne Erfolg. Auch beim Menschen war die subkutane Injektion niemals von einem Allgemeinexanthem gefolgt. Versuche, die TEDESCHI 1901 am Menschen mit Kuhpocken- und humanisierter Lymphe anstellte, sind negativ verlaufen.

Ungefähr zu gleicher Zeit wie Chauveau hat Fröhlich (1867) einer Kuh subkutan Lymphe injiziert und dabei volle Immunität gegen Nachimpfung erzielt, während Senfft (1872) in sieben Versuchen nach subkutaner Injektion von Kuhpocken- und von humanisierter Lymphe keine Immunität auftreten sah, abgesehen von zwei Versuchen, in welchen an der Injektionsstelle Impfpusteln aufgetreten waren.

Untersuchungen von Straus, Chambon und Ménard (1890), dann von Béclère, Chambon und Ménard (1898) haben die Resultate Chauveaus für das Rind bestätigt und erweitert, letztere haben auch für das Schwein den konstanten Immunisierungseffekt der subkutanen Injektionen von Vaccine festgestellt. Positive Befunde am Kalbe hat auch Tedeschi zu verzeichnen.

Dazu kommen noch Untersuchungen von Calmette und Guerin, welche auch beim Kaninchen durch subkutane Vaccineinjektion Immunität erzielt haben.

Am Affen (Macaccus) haben R. Kraus und Volk Immunität gegen Vaccine durch subkutane Injektion erzeugt.

Während aber bisher stets nur konzentrierte oder wenig verdünnte Lymphe zur Injektion angewandt worden war, haben Kraus und Volk gezeigt, daß man nicht nur äußerst geringe Mengen von Lymphe zur Anwendung bringen kann, worauf auch schon Straus, Chambon und Ménard hinwiesen, sondern daß man auch eine äußerst verdünnte Lymphe anwenden kann und doch einen positiven Erfolg erzielt. Hierdurch ist es auch möglich, die Infektion des Stichkanals bei subkutaner Injektion zu vermeiden. In ihren Versuchen am Affen haben Kraus und Volk die Lymphe in einer Verdünnung von 1 : 500 und 1 : 1000 physiologischer Kochsalzlösung verwendet.

Daß die Verwendung so stark verdünnter Lymphe zur subkutanen Injektion auch beim Menschen Immunität erzeugt, haben Nobl und Knoepfelmacher in größeren Versuchsreihen gezeigt. Ersterer hat die Lymphe mit 10—100, letzterer mit 1000 Teilen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt*).

Auch die Versuche von Casagrandi möchte ich hierher zählen. Casagrandi hat die Lymphe durch Chamberland-Kerzen filtriert; das Filtrat erwies sich als avirulent bei subepidermoidaler Impfung, als immunisierend bei subkutaner Injektion. Ich möchte im Gegensatze zu der Anschauung Casagrandis daraus schließen, daß bei der Filtration nur eine geringe Menge des lebenden Virus durch das Filter gegangen ist; hierdurch war die Verdünnung so stark, daß die Hautimpfung nicht mehr von positivem Erfolge begleitet war; bei subkutaner Injektion ist aber noch eine wesentlich stärkere Verdünnung wirksam.

Die positiven Resultate, welche de Waele und Sugg (1905) bei ihren Untersuchungen zu verzeichnen haben, sind wahrscheinlich jenen bei der subkutanen Injektion von Vaccine gewonnenen gleichzusetzen. Diese Autoren haben Schilfsäckchen mit Vaccine gefüllt und in

---

*) Die Vaccine muß bakterienfrei sein und daraufhin geprüft werden. Bei der Verdünnung muß die Lymphe mit der Kochsalzlösung gleichmäßig verrieben werden; es scheiden sich hierbei rasch Flocken aus welche sich zu Boden senken; darum muß die Flüssigkeit vor dem Gebrauche neuerlich verrieben oder tüchtig geschüttelt werden.

Die Menge von verdünnter Vaccine, welche zur Injektion gelangt, soll nicht mehr als 1 ccm betragen, nach neueren Versuchen ist die Vaccine, welche mit 3 Teilen Glyzerin versetzt und in den Handel gelangt, mit 200 Teilen physiologischer Kochsalzlösung zu verdünnen; diese Verdünnung reicht hin, um Impferfolg zu erzielen.

Hauttaschen von Kälbern eingenäht. Zwischen dem dritten und siebenten Tage wurden die Impfsäckchen entfernt. Kontrollimpfung am achten bis zehnten Tage vorgenommen, verlief negativ. Bei allen immun gewordenen Tieren traten Tumorbildung, Eiterung, Fieber auf.

Die Erscheinungen, unter welchen die Immunität bei subkutaner Injektion eintritt, sind nicht für alle Tierarten gleich. Während Chauveau die Tumorbildung an der Injektionsstelle zum Eintritt der Immunität für wesentlich hält, haben Béclère, Chambon und Ménard in jenen Fällen keine Tumorbildung bei ihren Versuchen an der Färse auftreten gesehen, wenn die angewandte Lymphe von bakteriellen Verunreinigungen frei, also „steril" war; darnach wäre die Tumorbildung bei subkutaner Injektion nicht etwa eine spezifische Reaktion, sondern etwas Accidentelles.

Diese Behauptung von Béclère, Chambon und Ménard kann jedoch nicht richtig sein, denn in Versuchen am Menschen hat Knoepfelmacher bei nachgewiesener Sterilität der Lymphe (geprüft auf den üblichen Nährböden) doch stets Tumorbildung auftreten gesehen. Es handelt sich hierbei wohl um eine spezifische Reaktion des Organismus. Sie ist nach meinen Untersuchungen der Area bei der subepidermoidalen Vaccination gleichzusetzen. In beiden Prozessen handelt es sich um den gleichen klinischen und wahrscheinlich auch pathologischen Vorgang. Aber nicht alle Tierarten reagieren in solcher Weise auf die Vaccineinjektion.

So haben R. Kraus und Volk am Affen niemals Tumorbildung beobachtet und auch am Kaninchen tritt niemals Tumorbildung auf.

Beim Menschen tritt die Tumorbildung an der Injektionsstelle ganz plötzlich und nach bestimmtem Intervall auf, gewöhnlich zwischen dem 8. und 12. Tage, bei stark verdünnter Lymphe auch später (Knoepfelmacher), und besteht in einem erbsen- bis pflaumengroßen derben Infiltrat, das kutan und subkutan seinen Sitz hat und meist von einer etwas stärker ausgedehnten Rötung begleitet ist; die Rötung verschwindet nach wenigen Tagen, die Infiltration nach Wochen.

Für das Rind hat Chauveau uachgewiesen, daß die Gewebsflüssigkeit, welche beim Einschneiden des Tumors heraussickert, auf das Tier übertragen, keine Vaccinepustel zu setzen vermag.

Daß übrigens das Eintreten der Immunität nicht, wie das Chauveau glaubte, von einer lokalen Reaktion des Gewebes abhängig ist, wird durch zwei Versuche bewiesen, in welchen Knoepfelmacher am Affen (Macaccus) 24 Stunden nach subkutaner Injektion verdünnter Lymphe die Injektionsstellen herausschnitt; dennoch war in beiden Versuchen volle Vaccine-Immunität eingetreten; überdies hat Chauveau selbst am Pferde die Injektionsstelle 24 bis 48 Stunden später excudiert und darnach ein spezifisches Allgemeinexanthem auftreten gesehen.

Von Interesse ist es, daß Kraus und Volk gezeigt haben, daß ebenso wie bei subepidermoidaler, auch bei subkutaner Injektion von verdünnter Lymphe beim Kaninchen trotz Hautimmunität keine Immunität der Cornea eintritt. Beim Affen (Macaccus) jedoch kann es (unter sieben Versuchen einmal) zu Herabsetzung der Reaktionsfähigkeit oder zu voller Immunität kommen (Kraus und Volk).

Da bei subepidermoider Sukzessivimpfung, bei welcher täglich eine Impfstelle frisch gesetzt wird, die Erfahrung gemacht wird, daß alle Impfstellen, gleichgültig an welchem Tage sie gesetzt wurden, bis zum sechsten Tage, zu gleicher Zeit Pustel- oder Papelbildung zeigen, hat

Knoepfelmacher an zwei Kindern durch eine Reihe von Tagen täglich subkutane Injektionen von Lymphe (1 : 1000 und 1 : 400 verdünnt) gemacht. Die spezifische Reaktion (Tumorbildung) ist ungefähr zu gleicher Zeit an allen Injektionsstellen aufgetreten.

Die Frage, ob sich die Immunität nach subkutaner Vaccineinjektion allmählich oder plötzlich entwickelt, muß nach den Untersuchungen von Béclère, Chambon und Ménard im ersteren Sinne entschieden werden. An Färsen haben diese Autoren subkutane Injektionen von Lymphe erprobter Virulenz gemacht. In Intervallen von 24 Stunden wurden dann an den verschiedenen Kälbern subepidermoidale Impfungen in größeren Reihen ausgeführt. Dabei zeigte sich, daß die Immunität nach subkutaner Vaccineinjektion vom vierten bis achten Tage graduell zunimmt; sie geht einher mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Hemmung in der Entwicklung der Impfpusteln, deren Inhalt eine mehr oder weniger komplette Abnahme der Virulenz zeigt. Die Immunität ist beim Kalbe am achten Tage komplett.

Beim Kaninchen tritt nach Calmette und Guérin nach subkutaner ebenso wie nach subepidermoidaler Impfung Immunität am sechsten Tage ein.

Beim Menschen tritt nach Nobl nach subkutanen Vaccineinjektionen am zehnten Tage volle Immunität gegen Nachimpfung auf. Am sechsten, siebenten, achten und neunten Tage nach der subkutanen Injektion war die Hautimpfung stets positiv und ganz typisch verlaufen. Da bei gewöhnlicher Hautimpfung beim Menschen die Immunität schon am sechsten Tage einsetzt oder beginnt, so ist nach subkutaner Injektion der Eintritt der Immunität vertpätet.

Über die Dauer der Immunität nach subkutanen Vaccineinjektionen liegen Erfahrungen noch nicht in genügender Menge vor; Kraus und Volk haben am Affen, Knoepfelmacher am Menschen die Immunität sechs Monate nach der Injektion noch bestehend gefunden. Ob sie so lange anhält, wie bei subepidermoidaler Impfung, ist noch nicht erwiesen.

Die bisherige Darstellung beschäftigt sich mit Injektion von virulenter Lymphe. Aus verschiedenen Gründen mußte es in wissenschaftlicher und praktischer Beziehung wichtig sein, Versuche mit avirulenter, impfsteriler Pockenvaccine anzustellen.

Die ersten solcher Versuche sind am Menschen von Janson angestellt worden. Injektion von Vaccine, welche verdünnt und sterilisiert worden war, wurde Kälbern und Kindern subkutan injiziert; erstere wurden ein bis drei Tage später, letztere ein bis sieben Tage später mit Erfolg subepidermoidal vacciniert. Bei seinen Versuchen an Kindern scheint ihm aber doch ein gewisser Einfluß im Sinne einer etwas beschleunigten Reaktion vorhanden gewesen zu sein.

Am Affen haben solche Versuche Kraus und Volk angestellt und zwar mit Vaccine, welche auf 58° erwärmt worden und so avirulent geworden war (konnte keine Pusteln erzeugen). Sechs Affen, welchen 2 ccm einer solchen 50- bis 200fach verdünnten avirulenten Lymphe injiziert wurden, erwiesen sich bei der subepidermoiden Nachimpfung, 10 bis 11 Tage nach der subkutanen Injektion vorgenommen, als immun.

Am Menschen hat Knoepfelmacher eine größere Versuchsreihe angestellt und Kindern bis zu 4,5 ccm avirulenter auf 70° durch eine halbe Stunde erhitzter Lymphe injiziert, in der Regel ohne Immunität erzeugen zu können. Doch zeigte sich, daß ein geringer immuni-

sierender Einfluß vorhanden war, manchmal verlief die Nachimpfung unter dem Bilde einer etwas beschleunigten Reaktion, selten unter abnorm starken krankhaften Symptomen (hyperergische Reakton, v. Pirquets). Nur in einem Falle hat Knoepfelmacher durch Injektion einer geringen Menge avirulenter Vaccine sichere Immunität erzeugt.

Versuche über Revaccination mittels subkutaner Injektion wurden auch am Menschen von Knoepfelmacher angestellt. Sie haben als Resultat ergeben, daß der einmal Vaccinierte sowohl kurz nach der Vaccination als wie noch nach Jahren auf die subkutane Injektion von Pockenvaccine innerhalb 24 Stunden mit der Bildung eines Ödems und Erythems an der Injektionsstelle reagiert (allergische Reaktion v. Pirquets). Die Reaktion tritt nur beim Geimpften und Variolisierten ein. Bei einzelnen Menschen bleibt die Reaktion aus. Die Ursache hierfür ist noch nicht bekannt. Sie wird auch dann noch erzeugt, wenn die Lymphe stark verdünnt wird (bis 1 : 1000, in seltenen Fällen sogar noch in der Verdünnung 1 : 50000 sogar 1 : 100000 physiologischer Kochsalzlösung). Die Reaktion tritt auch dann ein, wenn man anstatt virulenter Pockenvaccine eine auf 70° erhitzte, abgetötete Vaccine nimmt, oder eine solche, welche nach dem Vorgange von Sternberg durch Zusatz von Serumvaccine immuner Menschen avirulent geworden ist.

Von diesen Erfahrungen ausgehend wird die subkutane Injektion einer verdünnten und durch Erhitzen auf 58—70° avirulent gemachten Vaccine von Knoepfelmacher als Diagnostikum auf eine bestandene Vaccine- oder Variolaerkrankung empfohlen.

Literatur.

Béclère, Chambon et Ménard, Annales de l'Inst. Pasteur 1896, 1898, 1899.

Calmette et Guerin, Ibidem, Tome XV, 1901.

Casagrandi, O., Riforma medica 1903, Tome XIX.

Chauveau, M., Bulletin de l'Academie de méd. 1865/1866, Tome XXXI. Revue mens. de méd. et chir. 1877.

Woele, de und Sugg, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVI.

Fröhlich, Württemberg. med. Correspondenzblatt 1867.

Janson, C., Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. X.

Kraus, R. und Volk, R., Wiener klin. Wochenschr. 1906. Sitzungsberichte der Wiener Akademie der Wissensch., mathem.-naturwiss. Klasse 1907, Bd. CXVI, Abt. III.

Knoepfelmacher, W., Wiener med. Wochenschr. 1906. Ibid. 1907, Verhandlungen der Gesellschaft für Kinderheilkunde, Dresden 1907.

Nobl, G., Wiener klin. Wochenschr. 1906.

Pirquet, C. v., Klinische Studien über Vaccination. Wien 1907.

Senfft, A., Berliner klin. Wochenschr. 1872.

Sternberg, G. U., Centralbl. für Bakt. 1896, Bd. XIX.

Straus, Chambon et Ménard, Société de Biologie 1890. Decembre.

Tedeschi, V., La immunisazione del vaccino. Triest 1901. Ref. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXI.

XIX.

Über Methoden der Schutzimpfung gegen Lyssa.

Von

R. Kraus

in Wien.

Einleitung.

Pasteurs Entdeckung, daß Lyssavirus bei der Hundswut sich im Zentralnervensystem lokalisiere, daß virushaltiges Gewebe, ins Gehirn oder Nerven gesunder Tiere eingebracht, Lyssa erzeuge, haben die Grundlage zur weiteren Erforschung der Pathogenese und Ätiologie dieser Krankheit geschaffen.

Pasteur selbst konnte in fortgesetzten Arbeiten die Fruchtbarkeit der experimentell biologischen Reinkultivierung des Lyssavirus erweisen, indem es ihm gelang, mittels Passage durch verschiedene Tierarten das Virus methodisch abzuschwächen oder zu verstärken und mit derart verändertem Virus eine aktive Immunisierung zu erzeugen.

Die späteren Arbeiten, welche sich mit dem Studium des Lyssavirus beschäftigen, bedienen sich der von Pasteur geschaffenen Methodik.

Man kann allgemein behaupten, daß diese zum Studium des Lyssavirus planmäßig ersonnene Methodik, die allerdings die empirischen Versuche Jenners über Vaccine als Vorläufer hat, die Methodik derjenigen Forschung geworden ist, welche sich zurzeit mit dem Studium des nicht züchtbaren Virus beschäftigt.

Im folgenden wird es sich nicht darum handeln, eine monographische Darstellung über Lyssavirus und Immunität wiederzugeben. Diesbezüglich sei auf die Zusammenfassungen von Babes, Högyes, Marie, Marx, Heller, Frosch hingewiesen.

Ausführliche Literaturangaben finden sich bei:

Högyes, A., Lyssa. Nothnagels Handbuch, Hölder, Wien 1897.
Marie, A., La Rage. Masson & Cie., Paris.
Marx, E., Lyssaimmunität. Handbuch von Kolle und Wassermann. G. Fischer, Jena 1904.
Heller, C., Die Schutzimpfung gegen Lyssa. G. Fischer, Jena 1906.
Frosch, P., Lyssa. Handbuch von Kolle und Wassermann. G. Fischer, Jena 1907.

Die grunlegenden Arbeiten Pasteurs sind niedergelegt in:

Compt. rend. de l'Acad. des Sciences, 24. Januar 1881.
Ebenda, 30. Mai 1881.
Ebenda, Dezember 1882.
Ebenda, 25. Februar 1884.
Ebenda, 19. Mai 1884.
Ebenda, 11. August 1884.
Ebenda, 26. Oktober 1885.
Ebenda, 1. März 1886.
Ebenda, 11. April, 31. Oktober 1886.
Annales de l'Inst. Pasteur 1887, 1888.

Nachweis des Lyssavirus.

Eigenschaften des Virus.

Der Erreger der Lyssa ist mikroskopisch nicht sichtbar und in vitro nicht züchtbar.

Seit Gibier, Pasteur und später Babes*) hat man sich bemüht, das Lyssavirus mikroskopisch zu sehen und zu züchten. Alle diesbezüglichen Versuche haben bis heute negative Resultate ergeben. Auch die angeblich gelungenen Züchtungsversuche (Bruschetini, Sormani u. a.) der letzten Jahre haben, sowie die früheren einer Prüfung und Kritik nicht Stand gehalten. Züchtungsversuche, die ich in Gemeinschaft mit E. Keller vor einigen Jahren angestellt hatte, bei welchen wir die von Nocard und Roux angegebene Methode der Kollodiumsäckchen**) benützt haben, sind ebenfalls negativ ausgefallen. Auch Centanni hat gleiche Versuche angestellt, indem er Virus fixe mit Kaninchenserum, Humor aqueus, Cerebrospinalflüssigkeit, Martinscher Bouillon gemischt hatte und verschiedene Zeit im Tierkörper hielt. Nach 7 bis 12 Tagen erwies sich das im Peritoneum gehaltene Virus unwirksam. Auf einem indirekten Wege kamen wir (Kraus, Keller und Clairmont) dazu, das Virus der Lyssa als nicht züchtbar hinzustellen. Wir konnten nachweisen, daß das ins Gehirn eben getöteter gesunder Kaninchen eingebrachte Lyssavirus sich daselbst nicht vermehre; das ins Vorderhirn gesunder Kaninchen eingebrachte Lyssavirus (Virus fixe) pflanzt sich in gesetzmäßiger Weise fort, so daß gewöhnlich nach einigen Tagen die Medulla, später Rückenmark (Lumbalmark) infektiös wird. Virus, welches ins Gehirn getöteter Tiere injiziert wurde, ließ sich selbst nach einigen Tagen nicht in der Medulla nachweisen. Aus diesen Versuchen wurde geschlossen, daß die Vermehrungsfähigkeit des Lyssavirus an die Vitalität der lebenden Zelle geknüpft sein dürfte. Trotzdem also Gehirn lebender Kaninchen der optimale Nährboden das Lyssavirus ist, vermag dasselbe Virus im toten Tiere auf demselben Nährboden sich nicht zu vermehren.

---

*) In der Arbeit von Babes (Virch. Arch., Bd. CX, pag. 570) findet sich die Literatur über ältere Züchtungsversuche, sowie seine eigenen Versuche über Mikrokokken, die Babes aus der Medulla wutkranker Tiere auf Agar züchten konnte.

**) Die Methode der Kollodiumsäckchen wurde zuerst von Metschnikoff, Roux und Salimbeni zur Gewinnung der Choleratoxine angegeben. Später wurde diese Methode von Roux und Nocard zur Züchtung des Virus der Peripneumonie verwendet. (Ausführliches darüber s. Nocard: Die Peripneumonie im Handbuche von Kolle-Wassermann, Bd. III, pag. 696.)

Außerdem hat das Lyssavirus mit den anderen invisiblen Mikroorganismen noch die gemeinschaftliche Eigenschaft, daß es bestimmte Bakterienfilter zu passieren vermag. Wenn auch vereinzelte Angaben bereits bekannt sind, daß für gewisse Flagellaten (Micromonas mesnili) und auch begeißelte Bakterien (Spirillum parvum ESMARCH) Bakterienfilter durchgängig sind, so kann man doch allgemein den Satz aufstellen, daß Bakterien und Protozoen Bakterienfilter (CHAMBERLAND, BERKEFELD, PUKALL, REICHEL usw.) nicht passieren; dem gegenüber vermögen es fast alle invisiblen Mikroorganismen. Wir wissen, daß das Virus der Peripneumonie der Rinder, Maul- und Klauenseuche, Hühnerpest, Rinderpest, gelbes Fieber, Variolavaccine etc. Bakterienfilter passiert und daß die Filtrate infektiös sein können.

Für das Lyssavirus wurde der Nachweis zuerst von REMLINGER und RIFFAT BEY und gleichzeitig von CELLI und BLASI erbracht. Weitere Arbeiten von DI VESTEA, SCHÜDER, BERTARELLI und VOLPINO bringen Bestätigungen für die Filtrierbarkeit des Virus. Bemerkenswert ist, daß nach den Angaben der Autoren die Resultate inkonstant sind. Diese Inkonstanz hängt zunächst, wie aus den Untersuchungen REMLINGERS hervorgeht, von der Art der angewendeten Filter ab. REMLINGER und RIFFAT BEY fanden Durchlässigkeit der Berkefeldkerzen V, weniger durchlässig BERKEFELD W und U und der CHAMBERLAND F. Eigene Untersuchungen, die ich vor den Veröffentlichungen REMLINGERS und CELLIS bereits angestellt hatte, haben wahrscheinlich wegen der verschiedenen Durchlässigkeit der Filter negative Resultate geliefert. Zu diesen Versuchen benutzte ich CHAMBERLAND F, Reichel- und Berkefeldkerzen. Aber selbst als ich nach Veröffentlichung der Arbeit REMLINGERS BERKEFELD V verwendete, sind die Resultate zum großen Teil negativ geblieben.

Auch die Versuche REMLINGERS ergeben trotz Nachweises der Filtrierbarkeit inkonstante Ergebnisse. Von 29 Kaninchen starben bloß 11 an Lyssa nach einem verlängerten Inkubationsstadium.

CELLI und DE BLASI berichten ebenfalls über inkonstante Resultate, Verlängerung des Inkubationsstadiums und Zugrundegehen der Tiere ohne Erscheinungen. Es scheint nach alledem das Virus der Lyssa in seiner Infektiosität abgeschwächt zu sein, was sich am besten dadurch erklären ließe, daß wenig Virus durchgelassen wird.

Daß CELLI bessere Resultate verzeichnet als andere Autoren, dürfte an der angewandten Technik gelegen sein, die hier wiedergegeben wird:

Hirn und Rückenmark werden zerkleinert, mit Sand gemischt und dem Druck von 500 Atmosphären der BUCHNERschen Presse ausgesetzt. Der ausgepreßte Saft wird mit Wasser verdünnt und durch kleine Berkefeldkerzen bei einem Druck von — 570 mm filtriert. —

Neben der Filtrierbarkeit kommt dem Lyssavirus eine weitere Eigenschaft zu, die es mit den angeführten invisiblen Mikroorganismen teilt, und zwar die, in bestimmten Geweben spezifische Gebilde (Zelleinschlüsse), deren Natur bisher strittig ist, zu produzieren.

Das Lyssavirus erzeugt im Gehirne wutkranker Organismen Gebilde (NEGRIsche Körperchen), die wir ebenso als spezifisch anerkennen müssen, sowie die GUARNIERIschen Körperchen, die Hühnerpestkörperchen (KLEINE, SCHIFFMANN) usw.

Nach dem Angeführten kann der Nachweis des Lyssavirus nicht kulturell erfolgen, sondern bloß experimentell und histologisch. Der experimentelle Nachweis, den PASTEUR als Erster eingeführt hat,

beruht darauf, daß Virus enthaltende Gewebe, in entsprechender Weise in den empfänglichen Organismus einverleibt, das typische Bild der Lyssa hervorzurufen imstande ist. Der histologische Nachweis, der erst in den letzten Jahren durch die Entdeckung Negris ermöglicht wurde, beruht auf dem Nachweis von bestimmten charakteristischen, bestimmt färbbaren Gebilden in bestimmten Gehirnabschnitten wutkranker Organismen.

Die Infektion mit Lyssavirus.

Die Untersuchungen Pasteurs (1882) und seiner Mitarbeiter Chamberland und Roux haben gezeigt, daß sich das Lyssavirus hauptsächlich im Zentralnervensystem lokalisiere. Wenn auch noch andere Organe wutkranker Organismen, wie Speicheldrüsen (Hertwig, Galtier, Bardach), Nebennieren, Tränendrüsen (Bombici), Lymphdrüsen, periphere Nerven (Roux) Lyssavirus enthalten können, so empfiehlt es sich, doch stets womöglich Gehirn oder Medulla oblongata zum Nachweis des Lyssavirus zu benutzen, da erfahrungsgemäß daselbst Lyssavirus konstant und in größter Konzentration enthalten ist (Fermi, Nitsch).

(Das Gehirn oder Medulla, womöglich frisch*), wird mit physiologischer Kochsalzlösung in kleinen sterilisierten Glasschalen mit einem Glaspistill zu einer milchigen Emulsion verrieben.)

Die sicherste Art der Einverleibung ist die ins Gehirn oder periphere Nerven. Wie nämlich Vestea und Zagari in einwandfreien Versuchen bewiesen haben, gelangt das Lyssavirus sowohl bei der natürlichen als auch künstlichen Infektion hauptsächlich auf dem Wege der Nerven ins Zentralnervensystem. Daß außerdem auch die Lymph- oder Blutbahn Virus transportieren kann, ist nach Versuchen von Högyes und Remlinger zuzugeben; nur dürfte diese Art der Infektion auch nach unseren Versuchen die seltene sein**). Die besten Methoden zur experimentellen Erzeugung der Lyssa sind diejenigen, bei welchen Virus auf dem direkten Wege ins Gehirn, Rückenmark oder auf indirektem durch Injektion in Nerven ins Zentralnervensystem gelangt.

(Die weitaus beste und sicherste Art ist die der subduralen oder cerebralen Einverleibung des Virus. Die Tiere werden zu diesem Zwecke auf die gebräuchlichen Tierbretter gebracht, der Kopf mittels Kopfhalter fixiert. Die Kopfhaut wird (nachdem sie rasiert wurde [Hunde]) in der Medianlinie getrennt (ca. 3 cm) und die Wundränder mit scharfen Haken auseinander gehalten. Im unteren Winkel, zwischen der Sagittal- und Koronarnaht, wird das Periost mit einem Raspatorium abgeschabt und daselbst dann die Trepanation vorgenommen. Zur Trepanation bedient man sich eines gewöhnlichen Trepans (kleine ca. 3 mm für Kaninchen, Meerschweinchen, größere 6 mm für Hunde). Nach Entfernung der Knochenplatte wird die Injektion vor-

---

*) Die zum Nachweis des Lyssavirus an Institute eingesendeten Gehirnstücke (Kleinhirn, Medulla) sollen womöglich steril entnommen werden und in sterilisierten trockenen Gefäßen oder besser in Glyzerin eingeschickt werden. Wenn das Material nicht in frischem Zustande, bereits faul, zur Verimpfung gelangt (was namentlich im Sommer nicht zu vermeiden ist), empfiehlt es sich, zur Vermeidung von sekundären Infektionen der Tiere (Meningitis) das Gehirnstückchen wie es Marx empfiehlt, mit 1 %iger Karbollösung zu verreiben und 24 Stunden im Eisschrank stehen zu lassen.

**) Als Methode zum experimentellen Nachweis eignet sich die intravenöse Injektion wegen ihrer Unzulänglichkeit nicht und auch deswegen, weil intravenöse Injektion von Gehirn, Rückenmarksemulsionen bei Hunden, Kaninchen Gerinnungen in Gefäßen erzeugen, denen die Tiere akut erliegen.

genommen. Entweder wird die Emulsion mit Spritzen (gerade oder gebogene Kanülen) mit Glaskapillaren unter die intakt gebliebene Dura mater subdural oder durch Einstich ins Gehirn cerebral (ca. 0,2 ccm) eingebracht. Die Wunde wird hierauf vernäht und mit Jodoformkollodium versorgt oder bloß mit MICHELschen Klammern versehen.)

Zur Vornahme der Trepanation bei Kaninchen, Meerschweinchen ist das Tierbrett gar nicht notwendig (Fig. 1). Die Tiere verhalten sich, wie aus der nebenstehenden Abbildung hervorgeht, bei entsprechender Haltung ruhig. Diese Art empfiehlt sich namentlich bei größeren Versuchsreihen, wobei sonst das Fixieren der Tiere auf Tierbretter immer viel Zeit in Anspruch nimmt.

Fig. 1.

Neben dieser erprobten Methode haben einzelne Autoren zur direkten Injektion die Impfung von der Augenhöhle aus (DAWSON, OSHIDA) von der Nasenhöhle (SALOMON) durch die Membrana obturatoria und ins Rückenmark (LEBELL) angegeben. Diese Verfahren haben gegenüber der angeführten Art der Einverleibung keine Vorzüge und bloß Nachteile der unsicheren technischen Ausführung, weshalb sie hier nicht weiter behandelt werden.

Von den Methoden der indirekten Applikation des Lyssavirus wäre zunächst die intranervöse Injektion hervorzuheben. Nach den Versuchen von DI VESTEA und ZAGARI, HELMANN, HÖGYES gelingt es mit Sicherheit, durch Injektion in periphere Nerven Lyssa zu erzeugen.

Die Methode besteht darin, daß man dem fixierten Tier in einen peripheren Nerv, der bloßgelegt wird, Virus mittels einer Spritze (feine Nadel) injiziert. Zu diesem Zwecke benutzt man gewöhnlich den Nervus ischiadicus. Nach Durchtrennung der Haut am Oberschenkel (2—3 cm) trennt man die Muskeln (Musc. glut. max.) innen von der oberflächlich verlaufenden Vene durch (Oberfl.-Ast der Vena ischiad.), hält die Wundränder mit Doppelhaken auseinander, hebt den in der Tiefe weiß schimmernden Nerven stumpf auf die Branchen der Pinzette und injiziert ventralwärts das Virus. Bei dieser Operation empfiehlt sich die Narkose.

Für praktische Bedürfnisse hat diese Methode keine Bedeutung und ist daher weniger in Verwendung. Praktisches Interesse kommt eher einer anderen Art der indirekten Einverleibung zu, der intraokulären Injektion. Daß die intrakranielle Einverleibung im allgemeinen der intraokulären vorzuziehen ist, dürfte allseitig anerkannt sein. Nur JOHNE empfiehlt die intraokuläre Injektion als gleichwertig der intrakraniellen, die aber nach der Kritik von MARX wohl nicht empfehlenswert zu sein scheint. Nach unseren eigenen Erfahrungen sind die Resultate der intraokulären Impfung bei Kaninchen verschieden, je nachdem man Straßenvirus oder Virus fixe benutzt. Für Virus fixe ist die intraokuläre Impfung sicher nicht empfehlenswert, da sie ganz unregelmäßige Resultate liefert.

Es würde die intraokuläre Impfung noch am ehesten dann als brauchbar sich erweisen, wenn verunreinigtes Material (faules Gehirn) zur Verwendung gelangt (Augeninfektionen können jedoch auch nicht immer verhütet werden, wodurch das Experiment wiederum gefährdet ist).

(Bei der intraokulären Injektion verfährt man so, daß man nach Kokainisierung des Auges (5 % Lösung) das Tier halten läßt, mit einer feinen Kanüle in die Cornea am Limbus von oben einsticht und die Nadel so tief einführt, bis die Spitze in der Ebene der Pupille sichtbar ist. Injiziert werden gewöhnlich 0,2—0,3 ccm der Emulsion.)

Schüder, Marx halten die intramuskuläre Injektion für sicherer und ziehen sie deshalb der intraokulären vor. Nach Marx empfiehlt es sich, große Mengen Gehirnemulsion 3—5 ccm zu beiden Seiten der Wirbelsäule in die Halsmuskulatur zu injizieren.

Erscheinungen der experimentellen Lyssa.

Der Ausbruch der Krankheit erfolgt nach einem verschieden langen Inkubationsstadium. Bei den gebräuchlichen Experimentaltieren (Kaninchen, Meerschweinchen, Hunden, Ratten, Mäusen*) ist das Inkubationsstadium unabhängig von der Tierart**), abhängig bloß von der Menge und Art der Einverleibung als auch von der Art des Virus. Das Straßenvirus verhält sich anders als das Passagevirus (Virus fixe), insofern als das Inkubationsstadium nach Infektion mit ersterem gewöhnlich 2—3 Wochen und noch länger dauern kann***).

(Högyes beobachtete bereits 10 Tage nach subduraler Infektion bei Hunden Lyssa, Schüder gibt sogar 9 Tage als Inkubationsstadium an. Marx konnte in einem Falle eine Inkubationszeit von fast ¼ Jahr konstatieren.)

Nach Infektion mit dem durch Kaninchenpassagen veränderten, von Pasteur als Virus fixe bezeichneten Lyssavirus treten die ersten Erscheinungen der Lyssa bereits am sechsten Tage ein.

Wie verschieden sich das Inkubationsstadium verhalten kann, wenn verschiedene Mengen Virus (fixe) einverleibt werden, läßt sich am besten an der Hand der bekannten Versuche von Högyes demonstrieren. Verdünnungen des Virus fixe 1:5000 erzeugen manchmal Lyssa mit verlängertem Inkubationsstadium, die Dilutionen 1:2000, 1:1000 und 1:500 töten immer, und zwar nach einer immer kürzer werdenden Inkubationszeit, und erst Verdünnungen von 1:200 angefangen wirken wie konzentrierte Emulsionen. Ähnliche Beobachtungen haben sich ermitteln lassen bei Anwendung verschieden lange über Kali causticum getrockneten Markes.

Wesentlich anders bezüglich des Inkubationsstadiums als die angeführten Tierarten verhalten sich Hühner bei künstlicher Infektion†). Das Inkubationsstadium sowohl bei Infektion mit Virus fixe als auch mit Straßenvirus ist bei Hühnern ein viel längeres als bei Säugetieren (40 Tage und länger). Bei Gänsen kommt es nach Infektion mit Virus fixe schon nach 12—19 Tagen zu Krankheitserscheinungen. Es hat sich gezeigt, daß auch das Alter der Tiere, ganz ähnlich wie bei Hühnerpest (Gänse), eine

*) Ausführliche Versuche an Ratten und Mäusen hat Bruno Galli-Valerio angestellt (Centralbl. f. Bakter., Bd. 40 u. 42).

**) Die Größe der Kaninchen dürfte dabei eine Rolle spielen. Zur Verwendung sollen gewöhnlich Kaninchen gelangen, die 1500—2000 g schwer sind.

***) Ob die Verschiedenheit des Inkubationsstadiums auf die Virulenz zu beziehen sein dürfte, wie Högyes, Marx anzunehmen geneigt sind, läßt sich nicht bestimmt behaupten, da Virulenzprüfungen mit Straßenvirus bisher in ausgedehntem Maße nicht durchgeführt sind.

†) Die rasende Wut ist bei Kaninchen selten und schon nach 1—2 Passagen erzeugt gewöhnlich das Virus die paralytische Wut. In den meisten Fällen kommt es sofort bei der ersten Passage zu der sogenannten paralytischen Wut. Im Institute konnte man mit einem Straßenvirus (Ostrau) noch nach mehreren Passagen durch Kaninchen das Bild der rasenden Wut bei Kaninchen beobachten.

†) Über natürliche Infektion durch Biß von Säugetieren finden sich Angaben in den Lehrbüchern von Zorn, Friedberger und Fröhner, Nocard und Leclainche.

Rolle spielt (junge Tauben sind empfänglich, alte Tauben lassen sich für gewöhnlich nicht infizieren). Wie wir noch sehen werden, weicht auch das Krankheitsbild bei Vögeln bezüglich seines Verlaufes mehr oder weniger ab von dem meist rasch zum Tode führenden der Säugetiere.

Bei Hunden, Meerschweinchen und Ratten tritt nach Ablauf der Inkubationszeit die Lyssa nach Infektion mit Straßenvirus meist in der Form der sogenannten rasenden Wut auf. Nach Högyes äußert sich das Krankheitsbild bei Hunden in Veränderung des Benehmens, Bissigkeit, starker Aggressivität, Erregtheit, Verlust des Appetits, Gefräßigkeit, Wutanfällen, im heulenden Bellen. Paresen, Paralysen, Meerschweinchen sind sehr unruhig, rennen im Käfig herum (Manègebewegungen), versuchen an den Wänden zu klettern, schreien und gehen dann ebenfalls so wie Hunde in Paralyse zugrunde.

Bei der sogenannten stillen Wut, die sowohl auf Straßenvirus als auch auf Virus fixe Kaninchen befällt, zeigen die Tiere zunächst ein verändertes Aussehen, welches durch einen eigentümlichen starren Blick charakterisiert ist, sind unruhig, erregt*). Als erstes klinisch objektives Symptom ist geringe Freßlust, leichte Paresen, namentlich der hinteren Extremitäten, zu verzeichnen und ein Tremor des Kopfes, der sich beim Auffallenlassen des Tieres deutlich demonstrieren läßt; die Paresen nehmen zu, die Tiere bekommen Paralysen und gehen unter Abmagerung zugrunde. Hunde, Meerschweinchen, die mit Virus fixe infiziert werden, zeigen das gleiche Krankheitsbild.

Bei Vögeln, die für Lyssavirus empfänglich sind (Hühner, Gänse), zeichnet sich das Krankheitsbild durch den langsamen Verlauf aus. Die ersten Erscheinungen äußern sich im Hängenlassen der Flügel, in Ataxie der Beine, die in Parese und Paralyse übergeht (s. Fig. 2, 3, 4, 5). Die Krankheit kann 14 Tage, ja mehrere Wochen lang dauern, bevor sie zum Exitus führt. In seltenen Fällen, bei Hühnern, tritt unter allmählichem Zurückgehen der Erscheinungen vollständige Heilung auf. (Ähnliches konnte Kleine und Schiffmann bei Gänsen, die mit Hühnerpest infiziert waren, beobachten.)

Fig. 2. Am 2. III. mit Straßenvirus subdur. infiziert. 18. IV. Ataxie. 2. V. photogr. Aufnahme. Das Huhn starb zwei Monate später.

Histologischer Nachweis des Lyssavirus.

Pathologisch-anatomisch finden sich bei makroskopischer Betrachtung der Organe, außer Ekchymosen der Schleimhaut des Magens bei Hunden und einer blaßvioletten Verfärbung der grauen Substanz des Gehirns, keine weiteren Veränderungen vor, aus welchen man auf das Krankheitsbild schließen könnte. Wohl aber finden sich mikroskopisch im Gehirn von mit Straßenvirus infizierten Tieren Veränderungen, die vielfach als pathognomonisch für Lyssa angesehen werden können. Die Zellveränderungen (Chromato-

*) Das sogenannte prämonitorische Fieber von Babes konnte Högyes bei der Nachprüfung in einer großen Anzahl von Versuchen nicht bestätigen (pag. 411); Glykosurie, Acetonurie wird von einzelnen Autoren gefunden.

lyse), wie sie namentlich von Schaffer, Babes, Golgi eingehend studiert und beschrieben wurden, dürften, wie spätere Untersuchungen gezeigt haben, nicht gerade für Lyssa charakteristisch sein. Ähnliche Befunde wurden ja später bei Vergiftungen mit chemischen Giften (Arsen, Phosphor, Morphium, Kokain) als auch mit Bakteriengiften (Tetanus, Botulismus) beschrieben.

Die von Babes beschriebenen, als „Wutknötchen“ benannten miliaren Infiltrationen um die Gefäße und Ganglien sollen nur bei der Wut vorkommen und nach Babes diagnostische Bedeutung haben. Die Ver-

Fig. 3. 26. II. subdur. Infektion mit Huhnvirus. 13. IV. Parese. 2. V. photograph. Aufnahme. 14. VII. Exitus.

änderungen finden sich hauptsächlich um die Blutgefäße des Zentralnervensystems (Gehirn). Die perivaskulären Lymphräume sind stellenweise von Leukocyten erfüllt, die Gefäßwand selbst bis zur Muskelschicht mit Leukocyten infiltriert. Hauptsächlich lassen sich diese Infiltrationen an den größeren Venen nachweisen. Bei den mit Virus fixe infizierten Tieren (Kaninchen, Hunden, Meerschweinchen) sind solche Veränderungen nicht zu sehen. Ähnliche Befunde hat van Gehuchten und Nelis in den Ganglien des Sympathicus beschrieben. Namentlich sollen die Herde im obersten Halsganglion charakteristisch sein. Allgemein wird den Gefäßveränderungen im Gehirn sowohl bei natürlicher als auch künstlicher Infektion noch heute ein diagnostischer Wert zugesprochen. Die von van Gehuchten zu diagnostischen Zwecken empfohlenen Veränderungen des Halsganglions wollen einzelne Autoren nicht anerkennen, da nach den Untersuchungen von Beck, Vallée gleiche Veränderungen bei gesunden und alten Hunden im Halsganglion vorkommen sollen (s. Frosch, pag. 642).

Ganz auffallend ausgesprochen sind diese Veränderungen um die Gefäße bei mit Lyssavirus infizierten Vögeln (Hühner, Gänse) entwickelt (Kraus und Clairmont), (Fig. 6 und 7). Die Zellanhäufung kann so stark sein, daß sie nicht mehr scharf abgegrenzt um die Gefäße angeordnet ist, sondern ins Gehirn diffus reicht. Außer im Gehirn finden sich im Rückenmark dichte ausgedehnte perivaskuläre Infiltrate, die konfluieren und knötchenartige Herde bilden. Diese Befunde sind nicht nur nach In-

Fig. 4. 31. V. subdur. mit Virus fixe infiz. 19. VI. beginnende Erscheinungen. 26. VI. photogr. Aufnahme.

fektionen mit Straßenvirus, sondern auch nach solchen mit Virus fixe bei Hühnern nachzuweisen und dürften demnach hier die Veränderungen nicht von der Art des Virus, sondern bloß von der Krankheitsdauer abhängig sein.

Trotzdem fast allgemein die Gefäßveränderungen als charakteristisch für Straßenvirus anerkannt wurden, hat man sie doch in der Praxis zur Diagnosestellung nicht herangezogen. Eine weit grössere Bedeutung haben die von Negri beschriebenen Körperchen gefunden.

Fig. 5. 31. V. subdur. mit Virus fixe infiziert. 26. VI. photogr. Aufnahme.

Im Jahre 1903 beschrieb Negri, Schüler Golgis, in den Ganglien wutkranker Hunde und Kaninchen eigentümliche runde, elliptische Gebilde*), die hauptsächlich in den Nervenzellen des Ammonshorns, in den Purkynjeschen Zellen, in verschiedener Zahl und Größe (1—27 μ) nachweisbar sind (Fig. 8). Negri konnte diese Befunde konstant bei natürlicher als auch künstlicher Straßenwut ermitteln. Von 88 untersuchten Hunden gab die histologische Untersuchung mit dem experimentellen Nachweis in 87 Fällen ein übereinstimmendes Resultat, so daß Negri diesen Körperchen eine ebenso sichere diagnostische Bedeutung zuerkannte, wie dem Experiment. Die Nachuntersuchungen, die in allen Instituten in den nächsten Jahren durchgeführt wurden, kamen alle übereinstimmend mit Negri zu dem Resultat, daß den Negrischen Körperchen ein sicherer diagnostischer Wert zukomme. Luzzani hat ebenfalls in Golgis Laboratorium 179 Lyssafälle untersucht und konnte in 177 Fällen mit dem Experimente gleichlautende Resultate erheben. Luzzani kommt zu dem Schluß, daß der Nachweis endocellulärer Formen zur Diagnose Lyssa berechtigt. Diese Behauptung findet ihre Bestätigung durch die Überprüfungen von Bertarelli, Volpino, d'Amato, Daddi, Schiff-

Fig. 6. Huhn (Großhirn).

*) Eine eingehende Beschreibung der Negrischen Körperchen s. Frosch, Lyssa, im Handbuch von Kolle und Wassermann 1907.

Mann u. a., so daß heute wohl an der großen diagnostischen Bedeutung dieser Körperchen nicht mehr zu zweifeln ist*). Da, wie aus dem weiteren noch hervorgehen wird, der Nachweis nativ, in Ausstrichpräparaten oder in fixierten Präparaten schon innerhalb 24 Stunden, zu erbringen ist, so dürfte in Zukunft diese Methode neben dem Experiment in der Praxis anzuwenden sein. Der schnelle Nachweis ist ja wegen der eventuellen Schutzimpfung der gebissenen Menschen von großer Wichtigkeit. Der positive Nachweis spricht für Lyssa. Bei negativem Ausfall muß stets das experimentelle Resultat abgewartet werden. Die Negrischen Körperchen sind nach der Beschreibung Negris verschieden groß, 1—27 μ lang, meist rundlich, elliptisch, birnförmig, am häufigsten trifft man rundliche Gebilde, 4—10 μ groß. Diese Gebilde sind meist intracellulär gelagert, einzeln oder mehrere, entweder näher oder weiter am Kern oder im Inneren der Fortsätze der Ganglienzelle. Nach Negri ist die Struktur dieser Gebilde charakteristisch. Die mit der Mannschen Methode gefärbten Präparate zeigen bei Anwendung starker Linsensysteme und entsprechender Beleuchtung im Inneren der Körper schwach rosenrot gefärbte glänzende kleine Gebilde verschieden an Zahl und Größe. (Bei Anwendung der von Maresch hier angewendeten Silberimprägnation nach Bielschofsky lassen die nach Mann homogen erscheinenden Einschlüsse noch feine Körnchenstruktur erkennen.)

Auf die Deutung dieser Einschlüsse und Struktur derselben soll weiter hier nicht Rücksicht genommen werden. Nebenbei sei hier nur bemerkt, daß in letzter Zeit bei der experimentellen Hühnerpest bei Gänsen im Gehirn Körperchen nachgewiesen wurden, welche eine gewisse Ähnlichkeit mit den Negrikörperen besitzen. Diese Gebilde sind von Kleine kurz beschrieben, eingehend sind sie erst durch Schiffmann studiert worden. Interessant ist noch eine weitere Analogie mit den Negrikörpern, daß bei der kurzdauernden Krankheit der Hühner im Gehirn die Hühnerpestkörperchen nicht nachweisbar sind wohl aber bei jungen Gänsen, welche nach subkutaner Infektion erst nach einigen Tagen verenden.

Die Technik der Darstellung der Negrikörper ist in der ersten Mitteilung Negris bereits angegeben worden und hat im Verlauf der weiteren Studien keine wesentliche Änderung erfahren. Im nachstehenden folge ich bei der Beschreibung, den im Institute gesammelten Erfahrungen Schiffmanns.

Fig. 7. Huhn (Großhirn).

Als Untersuchungsobjekt dient vorzüglich das Ammonshorn, wo sich die Körperchen in größter Anzahl finden, und zwar gelangt man am sichersten zum Ziel, wenn man aus

*) Bei Infektionen mit Virus fixe lassen sich die von Negri beschriebenen Gebilde selten nachweisen (Negri, Bertarelli). Bei häufigen Passagen des Straßenvirus schwinden, wie Schiffmann zeigen konnte, diese Gebilde.

der Mitte des Ammonshornes ein Stück entnimmt. Die einfachste Untersuchungsmethode ist die, das Gewebe zu zerzupfen, entweder frisch (NEGRI) oder nach 12stündiger Fixierung in ZENKERscher Flüssigkeit und in Wasser abspülen (LUZZANI). Jedoch stehen die Resultate der Zupfmethode denen der Schnittmethode, was Sicherheit anbelangt, nach. Bei reichlichem Vorhandensein von NEGRIschen Körperchen lassen sie sich, wie schon NEGRI beschrieben, mit allen landläufigen Fixierungs- und Färbemethoden (Hämalaun, Eosin, Fuchsin usw.) darstellen. In schön

Fig. 8. Hund (Kleinhirn).

distinkter Weise färben sich die Körperchen nach MANN. Man geht folgendermaßen vor: Möglichst dünne Gewebsstücke werden in ZENKERscher Flüssigkeit fixiert. Es trägt wesentlich zum guten Gelingen der Färbung bei, daß die Stücke nicht zu lange in der Fixierungsflüssigkeit bleiben. Gründliches Auswaschen in Wasser. Alkohol. Einbetten in Paraffin.

Falls die Stückchen nicht sehr gut ausgewaschen sind, schwimmen sie leicht vom Objektträger ab. Man kann dies vermeiden, indem man nach Xylol Alkohol mit einer sehr verdünnten alkoholätherigen Celloidinlösung übergießt, ein Verfahren, das dem Endresultate keinerlei Eintrag tut, da das Celloidin durch die nun nachfolgende wiederholte Behandlung mit Alkohol absol. vollständig gelöst und entfernt wird. Hierauf kommen die Objektträger mit Schnitten in folgende Farblösung:

1 % wässr. Methylenblaulösung	35 ccm
1 % wässr. Eosinlösung	35 ccm
Destilliertes Wasser	100 ccm

Die besten Resultate erhält man mit der Marke Methylenblau 00 GRÜBLER und Eosin BA GRÜBLER. In dieser Farblösung verbleiben die Schnitte 12—24 Stunden. Dann kommen sie in destilliertes Wasser; Abspülen mit absolutem Alkohol.

Hierauf kommen die Schnitte in Natronlauge und Alkohol (30 ccm Alkoh. abs. + 5 g einer 1 %igen Lösung von Natronlauge in absolutem Alkohol). Es geht blaue Farbe ab und die Schnitte werden rot; wenn dieser Farbenton erreicht ist, was bei gut gelungener Färbung ca. zehn Minuten in Anspruch nimmt, werden die Schnitte in absolutem Alkohol abgespült und kommen in das Wasser, wo sie einen violetten Ton annehmen (ein bis zwei Minuten), dann in schwach essigsaures Wasser, wo sie

einen mehr blauen Ton erhalten (ein bis zwei Minuten). Absoluter Alkohol. Xylol. Canadabalsam. Rote Blutkörperchen hellrot, Negrische Körperchen mehr dunkelrot. Die übrigen Gewebsarten bleiben blau bis violett.

Da diese Methode mindestens 2—4 Tage in Anspruch nimmt, die Diagnose der Tollwut häufig dringend ist, so werden von verschiedenen Autoren für Schnelldiagnosen weitere Methoden angegeben. Fixieren in 10% Osmiumsäure (Volpino, Abba und Bormans) mit nachfolgendem Auswaschen (Härten in Alkohol), Anfertigen von Gefrier- oder Rasiermesserschnitten; eben wegen der Art der Schnittanfertigung erscheinen diese Methoden nicht sehr praktisch. Bohne (Zeitschr. für Hyg. 1906) hat die Mannsche Methode in verkürzter Färbedauer mit der Henke-Zellerschen Acetoneinbettung kombiniert und so ein Verfahren angegeben, das die Körperchen in ca. drei Stunden in 6 μ dicken Präparaten zur Darstellung bringt.

Die Stückchen werden $^1/_2$—$^3/_4$ mm dick geschnitten.

1. Aceton 37° ca. 15 ccm 30—40 Minuten,
2. Paraffin 50° 60—75 Minuten bei 60°,
3. Einbetten, Schneiden, Aufkleben, Trocknen. (Die Schnittbänder werden auf kaltem Wasser ausgebreitet, dem etwas Gummi arabicum zugesetzt ist.)
4. Färbung wie oben ($^1/_2$—4 Minuten),
5. Kurzes Abspülen in Wasser,
6. Kurzes Abspülen in absolutem Alkohol.
7. Natronlauge, Alkohol. Absol. Alkohol. Wasser, mit Essigsäure versetztes Wasser (wie oben). Schnelles Entwässern. Xylol. Einschließen.

Es gibt noch eine Reihe anderer Färbmethoden, die aber weniger diagnostisches Interesse haben, als vielmehr dazu dienen, die Struktur der Körperchon darzustellen.

Literatur.

Abba und Bormans, Ann. de l'Inst. Pasteur 1905. Tome XIX.
Babes, Virchows Archiv, Bd. CX. — Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, Tome VI.
Bertarelli, Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVI. Ibid. 1905, Bd. XXXIX.
Bertarelli und Volpino, Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVII. — Riv. d'Jg. 1904, Tome XV.
Bohne, Zeitschr. für Hyg., Bd. LII.
Celli und de Blasi, Deutsche med. Wochenschr. 1093, Bd. XXIX.
d'Amato, La Riforma med. 1904, Tome XX.
Daddi, Riv. crit. di clin. med. 1900, 1901, 1903, 1904.
Dawson, Ref. Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXIX.
di Vestea und Zagari, Psych. Napoli 1887. — Ann de l'Inst. Pasteur, Tome III.
di Vestea, Riv. d'Ig. Speriment 1905, Tome XVI.
Gibier, Compt. rend. Biol., Tome XCVI, XCVIII.
Golgi, Berliner klin Wochenschr. 1894.
Helmann, Ann. de l'Inst. Pasteur 1888, 1889.
Högyes, l. c.
Johne, Sächs. Veterinärber. 1898, siehe Marx l. c. pag. 1279.
Kraus, Zeitschr. für Hyg., Bd. LI.
Kraus und Clairmont, Zeitschr. für Hyg., Bd. XXXIV.
Kraus, Keller und Clairmont, Zeitschr. für Hyg. 1902, Bd. XXXXI.
Lebell, Centralbl. für Bakt. 1899, Bd. XXVI.
Luzzani, Zeitschr. für Hyg., Bd. IL. — Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVI.
Nhote, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXV, LII.
Marx, l. c.
Maresch, Wiener klin. Wochenschr. 1905.
Negri, Zeitschr. für Hyg., Bd. XLIII u. XLIV.
Nelis, Centralbl. für Bakt., Bd. XXIX.
Oshida und Remlinger, Ann. de l'Inst. Pasteur 1903.
Remlinger und Riffat-Bey, Compt. rend. de la soc. Biol. 1903.
Schiffmann, Zeitschr. für Hyg., Bd. LII.
Schüder, Zeitschr. für Hyg., Bd. XXXXII. — Deutsche med. Wochenschr. Bd. XXIX.
van Gehuchten, Bull. de l'Acad. de med. de biol. 1900.
Volpino, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVII.

Über die Beeinflussung des Lyssavirus durch chemische und physikalische Agentien.

Versuche, welche über das Verhalten des Virus gegenüber äußeren Einflüssen uns nähere Aufschlüsse gebracht haben, sind bereits von PASTEUR ausgeführt worden. PASTEUR, CHAMBERLAND und ROUX haben ja bekanntlich das Austrocknen (1885) des Markes als Abschwächungsmethode für Darstellung des Vaccins benützt. Die in dieser Richtung fortgesetzten Versuche zeigen zunächst, daß höhere Temperaturen die Infektiösität des Virus schädigen und vernichten können. Bei 45 ° C erlischt die Virulenz in 24 Stunden, bei 50 ° in einer Stunde (CELLI). Nach HÖGYES hat halbstündiges Erwärmen auf 52—58 ° C die Virulenz vernichtet. Niedere Temperaturen, —16 bis —35 °, beeinträchtigen nach HÖGYES die Virulenz nur gering. JOBERT fand noch nach 10 Monaten das Mark eines bei —10 bis —25 ° aufbewahrten toten Kaninchens virulent. FROTHINGHAM teilt mit, daß eine bei — 4 ° aufbewahrte Marksuspension noch nach 22 Monaten virulent war. MACFADYEN konnte die Virulenz des Lyssavirus nach dreimonatlicher Aufbewahrung des Gehirns bei der Temperatur von flüssiger Luft unverändert nachweisen.

Licht und Luft schädigen das Virus nach kurzer Zeit. So hat beispielsweise KEMPNER die Vernichtung der Virulenz des 20 Tage dem Lichte ausgesetzten Markes konstatieren können. Nach CELLI ist die Virulenz bei Licht und 37 ° nach 40 Stunden vernichtet. PASTEUR fand, daß Mark, in einem trockenen Raum aufbewahrt, nach 15 Tagen die Virulenz verliert. VIALA konnte im feuchten aber luftleeren Raum die Virulenz 33 Tage erhalten. Im dunklen und im luftleeren feuchten Raum, bei niederen Temperaturen läßt sich die Virulenz konservieren. VIALA hatte die Virulenz im luftleeren Raum bei — 4 ° bis + 4 ° C noch nach fünf Monaten ungeschwächt nachgewiesen. Unter den angeführten Kautelen konserviert sich die Virulenz bei 23 ° C 28—33 Tage, bei 35 ° C 20 bis 22 Tage. VANSTEENBERGHE konnte ein bei Vakuum getrocknetes Mark noch nach neun Monaten virulent finden.

Neben Licht, Luft und höheren Temperaturen wird das Lyssavirus durch chemische Agentien geschädigt. CELLI fand 1 ‰ Sublimatlösung, 2,5 ‰ Kaliumpermanganatlösung, Essigsäure, die Virulenz zerstörend, in schwachen Alkohollösungen schwindet die Virulenz nach acht Tagen, in 70 % Alkohol schon nach 24 Stunden. BABES zeigt, daß in 1 ‰ Sublimatlösung die Virulenz von Hirnemulsion nach 2—3 Stunden erloschen ist. DE BLASI und RUSSO TRAVALI konnten in 5 % Karbolsäure in 50 Minuten, in 1 % Kreolin, 10 % Kupfersulfat, 5 % Salizylsäure in 5 Minuten die Virulenz vernichten. BOKAI und SZILAGGI fanden, daß Chlor, Brom, schweflige Säure (2 % übermangansaures Kali, 1 % Eucalyptusöl) schädigend auf Lyssavirus einwirkt. Nach CATTERINA zerstören Formalindämpfe in 15—45 Minuten Lyssavirus. FERNIS Untersuchungen über schädigende Eigenschaften von Chemikalien ergaben folgendes:

Organische Säuren (Essigsäure, Zitronensäure, Milchsäure) wirken gleich stark bei 1 : 675 und sind in Verdünnungen 1 : 3000 unwirksam. Wirksam waren außerdem:

Salicylsäure in Verdünnungen	1 : 1020,	unwirksam bei	1 : 1346
Schwefelsäure	1 : 20 200	„ „	1 : 40 200
Salzsäure	1 : 51 100	„ „	1 : 10 000
Kaliumpermanganat	1 : 520		
Ammoniak	1 : 2100		

Kohlensaures Natron	1 : 105		
Alaun	1 : 93		
Kupfersulfat	1 : 26 000		
Sublimat	1 : 131 000	Unwirksam bei	1 : 260 000
Silbernitrat	1 : 135 009	„ „	1 : 26 0000
Wasserstoffsuperoxyd	1 : 20		
Chloroform	1 : 67	„ „	1 : 130
Thymol	1 : 1350	„ „	1 : 26 000
Karbolsäure	1 : 420	„ „	1 : 520
Malachitgrün	1 : 2600	„ „	1 : 3400
Metylenblau	1 : 340	„ „	1 : 670

Nach v. Eislers Versuchen zerstören 1 $^0/_0$ige Lösungen von Saponin und Solanin die Virulenz des Virus fixe innerhalb von 5—6 Stunden. Interessant hierbei ist, daß die antigene Eigenschaft des Virus nicht zerstört wird. Ähnliche Versuche, wie Ehrlich bei Trypanosomen mit Trypanrot, Mesnil und Nicolle mit anderen Farbstoffen angestellt haben, hat v. Eisler mit Lyssavirus durchgeführt. Dichlorbenzidin und Toluidin (0,5 $^0/_0$), welche Farbstoffe Mesnil und Nicolle bei Naganainfektion als wirksam gefunden haben, waren nicht imstande, nach einer halbstündigen Einwirkung Lyssavirus zu zerstören.

Frantzius studierte die Einwirkung von Röntgenstrahlen auf Lyssavirus und konnte selbst nach einstündiger Einwirkung keine Zerstörung nachweisen. In jüngster Zeit berichtet Tizzoni über schädigenden Einfluß des Radiums auf Lyssavirus.

Über die Beeinflußung der mit Lyssavirus infizierter Tiere mittels Atoxyl lagen bisher keine Versuche vor. Derartige Versuche habe ich gemeinschaftlich mit Herrn Dr. A. Grünberg ausgeführt ohne daß irgend eine Beeinflußung im Ablauf der experimentellen Lyssa hätte wahrgenommen werden können*).

Heller und Bertarelli gelang es nicht bei einem Druck von 200 – 350 Atmosphären Lyssavirus zu zerstören. Die Versuche wurden so ausgeführt, daß Gehirn und Medulla (mindestens 4) in Mörsern mit Quarzsand verrieben und mit Kieselguhr solange versetzt werden, bis man eine bröckelige, scheinbar trockene Substanz erhielt. Diese wird in Müllerseide und sog. Gazetuch eingeschlagen und bei ansteigendem Druck in der Buchnerschen Presse ausgepreßt. Der Saft wurde teils filtriert, teils unfiltriert zur Infektion verwendet.

Barrats Versuche gingen darauf hinaus, unter Anwendung von flüssiger Luft dem Lyssavirus seine Infektiosität zu nehmen. Die Versuche ergaben, daß eine Zerreibung des Virus im Apparat von Macfadyen und Rowland während 5 Minuten die Virulenz nicht zerstörte, nach $^1/_2$, 1—3 Stunden war das Virus nicht mehr infektiös. Heller hat diese Versuche wiederholt und bestätigen können. Da möglicherweise die Bereitung eines nicht infektiösen Lyssavirus zu Immunisierungszwecken von Wichtigkeit sein könnte, soll hier auf die Technik der Versuche eingegangen werden. (Beschreibung des Apparates, siehe Pick, dieses Handbuch, pag. 387.) Die Technik der Verarbeitung des Lyssavirus gestaltet sich nach Heller folgendermaßen:

Das Material (1 g) wird in den Metallmörser gebracht, der Deckel aber erst nach Verdampfen der eingegossenen flüssigen Luft gut verschraubt. Sodann wird in das andere Gefäß soviel flüssige Luft gebracht, daß der Mörser zu $^2/_3$ seiner Höhe in die Flüssigkeit eintaucht. Das Material im Mörser gefriert und wird als gefrorene Masse durch den in

* Kaninchen, welche mit Atoxyl vorbehandelt wurden, verhalten sich auch gegenüber dem Vaccinevirus wie normale Tiere.

Bewegung gesetzten Pistill, welcher rotiert und sich auf und ab bewegt, verrieben. Es ist darauf zu achten, daß die flüssige Luft stets nachgegossen wird.

Im Anschluß über die Wirkungen chemisch-physikalischer Agentien auf die Virulenz des Lyssavirus wären noch Untersuchungen anzuführen, die zeigen, daß Magensaft (Valli), Galle und auch Serum von Tieren die Virulenz des Virus herabsetzen, ja sogar vernichten kann. Tizzoni und Centanni konnten nach mehrstündiger Einwirkung von Magensaft auf Virus fixe zunächst eine Abschwächung (nach 3—12 Stunden) und eine Vernichtung (nach 20 Stunden) nachweisen, Babes und Talasescu versetzten 1 g virulentes Rückenmark mit 20 ccm Magensaft (Hund) und konnten nach 5 Stunden bei 20° C eine Zerstörung des Virus beobachten. Ebenso wie Magensaft vermag auch Galle gesunder Tiere Virus zu zerstören (Frantzius, Vallée, Lesieur, Salomon). Diese Angabe wurde zuerst von Frantzius gemacht, aber erst durch einwandfreie Versuche konnte ich zeigen, daß der Galle tatsächlich viruszerstörende Eigenschaften zukommen*). v. Eislers Untersuchungen lehren, konform den Angaben von Lesieur, daß die rabizide Eigenschaft der Galle von den gallensauren Salzen abzuleiten ist, da weder Eiweiß noch die dargestellten Lipoide der Galle das Virus zu schädigen vermochten.

Daß auch Serum normaler Tiere (Säugetiere, Vögel) Lyssavirus abschwächen und zu zerstören imstande sei, geht aus den Versuchen von Babes, Kraus und Kreisl hervor. Viel wirksamer als normales Serum ist das Serum von Tieren, die mit Lyssavirus aktiv immunisiert wurden. Dieses Serum vermag in geringen Mengen Lyssavirus nach kurzer Einwirkung in vitro zu vernichten (siehe Kraus, dieses Handbuch II. Band: Über rabicides Serum).

Literatur.

Babes und Talasescu Ann. de l'Inst. Pasteur 1894.
Barrat, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXV.
de Blasi und Russo Travali, Rif. med. 1889—1890, cit. nach Högyes.
Bokai und Szilaggi, Pester med. Presse 1890, cit. nach Högyes.
Celli, Bull. de Acad. med. di Roma 1886/87, cit. nach Högyes.
Fermi, Archiv für Hyg. 1907.
Frantzius, Centralbl. für Bakt., Bd. XXIII.
Heller und Bertarelli, Centralbl. für Bakt. XXXVI.
Jobert, Compt. rend. Soc. Biol., Tome CXIII.
Kraus, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXIV.
Kraus und Kreisl, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXII.
Macfadyen und Rowland, Centralbl. für Bakt. 1903.
Remlinger, Bulletin de l'Inst. Pasteur 1904, 1905, 1906.
Tizzoni und Bongiovanni, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIX.
Vansteenberghe, Compt. rend. Soc. Biol., Tome LV.
Viala, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome V.

Über Beeinflussung des Lyssavirus durch Tierpassage. Straßenvirus und Virus fixe.

Pasteur wies nach, daß Straßenvirus, welches bei Kaninchen in der Regel 2—3 Wochen nach der Impfung Lyssa erzeugt, durch sub-

*) Um diese Versuche durchzuführen, muß man entweder Straßenvirus zur Verfügung haben (intraokuläre Infektionen) oder man muß, um mit Virus fixe cerebral infizieren zu können, vorher Galle durch Auswaschen entfernen. Versuche von Biedl und mir (Ctrlbl. f. i. Med. 1898, Nr. 47) haben gelehrt, daß minimale Mengen von Galle cerebral injiziert Kaninchen in einigen Minuten bis 48 Stunden töten.

durale Passage von Kaninchen auf Kaninchen derart verändert wird, daß das Inkubationsstadium abnimmt und nach 50 Passagen bloß 6—8 Tage beträgt. Wird dieses Virus noch weiter passiert, so ändert es sich nicht mehr, das Inkubationsstadium bleibt konstant. Ein derartig verändertes Virus nannte Pasteur Virus fixe (Virus fixe, Viruspassage). Dieses Virus fixe auf Hunde oder Meerschweinchen übertragen, vermag auch nicht mehr die Erscheinungen der rasenden Wut zu erzeugen wie das originäre Virus, sondern erzeugt bloß die sogenannte paralytische Lyssa. Umgekehrt konnte Pasteur wieder zeigen, daß Straßenvirus, welches durch Affen (drei Passagen) passiert wurde, ganz und gar seine Infektiösität für Kaninchen einbüßt. Diese Tatsachen wurden bald nachher von Babes, Högyes u. a. bestätigt. Ausgedehnte Versuchsreihen in dieser Richtung hat Högyes angestellt. Högyes (1886) benützte in den ersten Passagen junge Kaninchen von 700—1000 g; er gelangte in verhältnismäßig kurzer Zeit zu einem Virus fixe. Nach der sechsten Passage war das Inkubationsstadium halb so groß als anfangs, schon in der 10. Passage (im 4. Monate) ist es bereits auf acht Tage gesunken und von der 20. Passage bis zu sieben Tagen. Högyes verglich sein Virus fixe mit dem von Pasteur und fand, daß sein Virus (21.—30. Passage) mit dem passierten Virus Pasteurs (151.—160. Passage) übereinstimmt, indem die Tiere nach sieben bis acht Tagen verendeten. Auch der ein Jahr später durchgeführte Kontrollversuch lehrte, daß bezüglich des Inkubationsstadium, der Krankheitsdauer zwischen seinem und dem Pariser Virus kein Unterschied ist.

Babes benützt, um rasch zu einem Virus fixe zu gelangen, die alternierende Passage durch Kaninchen, 1—3 mal durch Meerschweinchen und geht wiederum auf Kaninchen zurück. Bruno Galli-Valerio (l. c.) berichtet, daß Straßenvirus nach 1—3 Passagen durch Ratten oder Mäuse den Charakter des Virus fixe annimmt, insofern das Inkubationsstadium abgekürzt erscheint, die Erscheinungen der Straßenlyssa (rasende Wut) aber erhalten bleiben. Ähnliches konnten auch Blasi und Russo Travali, di Mattei bei Passagen durch Katzen, Wölfe beobachten.

Eine Abschwächung erfährt das Straßenvirus nach Versuchen von Celli und Marino Zuppi, de Blasi und Travali bei Passagen durch Hunde. Nach 6—10 Passagen erzeugt das Virus keine Straßenwut mehr, sondern die paralytische, und nach weiteren Passagen gehen die Tiere ohne Erscheinungen unter Abmagerung zugrunde (konsumptive Form), (Genaro). Das Gehirn ist für Kaninchen nicht mehr infektiös. Dagegen ändert sich Virus fixe (Kaninchenpassage) auf Hunde übertragen weiter nicht. Nach Versuchen von Kraus, Keller und Clairmont und Marie ändert die Passage durch Vögel (Hühner, Tauben, Gänse) das Virus fixe, indem es vollständig zerstört wird oder abgeschwächt werden kann (das Inkubationsstadium ist verlängert)*).

Aus diesen mitgeteilten Tatsachen ergibt sich, daß das Straßenvirus durch Passage durch den Tierkörper geändert wird. Einerseits wird es, wenn man so sagen darf, in seiner Virulenz verstärkt (Passage durch Kaninchen), andrerseits kann es abgeschwächt werden (durch Affen, Hunde, Vögel).

Das durch Kaninchen passierte Straßenvirus, sobald es zum Virus fixe geworden ist, dürfte für Mensch und Affe abgeschwächt sein. Marx

*) Eine konstante Abschwächung wurde nicht nachgewiesen. Nach einer Passage durch Kaninchen hat das Virus die ursprüngliche Virulenz gewonnen.

nimmt auf Grund seiner Versuche an Javaaffen an, daß das durch Kaninchen passierte Virus fixe für Menschen abgeschwächt sei. Die Statistik der Schutzimpfungen nach PASTEUR spricht ebenfalls in dem Sinne.

Über das Wesen der Verstärkung und Abschwächung*) des Lyssavirus durch Tierpassage sind unsere Kenntnisse noch lückenhaft. Wenn auch HÖGYES, MARX, SCHÜDER und in letzter Zeit HELLER**) bestimmte Anschauungen über Verschiedenheit des Straßenvirus und des verstärkten Virus (Virus fixe) äußern, so sind sie doch mehr oder weniger hypothetischer Natur, Vermutungen ohne eine sichere experimentelle Begründung.

KRAUS, KELLER und CLAIRMONT konnten eine Verschiedenheit der beiden Virusarten ermitteln, die sich in einer Verschiedenheit der Vermehrungsfähigkeit äußert. Es konnte nachgewiesen werden, daß bei Kaninchen nach subduraler Infektion mit Virus fixe die Medulla oblongata früher in der Regel infektiös wird (3.—4. Tag) als nach Infektion mit Straßenvirus. (Wenn auch Unterschiede in der Infektiosität der Medulla bei Anwendung verschiedener Straßenvirusstämme zu konstatieren waren, so war doch im allgemeinen die Medulla später infektiös als nach Infektion mit Virus fixe.)

Daß neben dieser experimentell nachgewiesenen Verschiedenheit der beiden Virusarten noch weitere qualitative Unterschiede (Toxine) vorhanden sein dürften, ist zuzugeben, jedoch steht der Nachweis der von MARX und SCHÜDER supponierten Toxine bisher aus.

MARX und auch SCHÜDER vermuten in der Verschiedenheit der Toxinproduktion den prinzipiellen Unterschied der beiden Virusarten.

Literatur.

DE BLASI und TRAVALI, Ann. de l'Inst. Pasteur 1894, 1896.
CELLI und MARINO ZUPPI, Ann. de l'Inst. Hyg. di Roma 1892.
DI MATTEI, Ann. d'Ig. sper. 1898.
HELLER, l. c.
HÖGYES, Die exper. Basis der antirab. Schutzimpfungen Pasteurs. Enke, Stuttgart 1889.
KRAUS und CLAIRMONT, l. c.
KRAUS, KELLER und CLAIRMONT, l. c.
MARX, Deutsche med. Wochenschr. 1900.
NITSCH, R., Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 36.
SCHÜDER, l. c.

Experimentelle Begründung der Schutzimpfung gegen Hundswut.

Die älteste Methode der aktiven Immunisierung ist die nach PASTEUR. Wie bereits erwähnt wurde, hat PASTEUR das Prinzip der Jennerisation — mittels abgeschwächten Virus gegen virulentes, Tiere zu schützen — verallgemeinert und wissenschaftlich fundiert. PASTEUR ist es gelungen, mit künstlich abgeschwächten Kulturen (Hühnercholera, Schweinrotlauf, Milzbrand) Tiere gegen virulente zu vaccinieren und ein Schutzimpfungsverfahren gegen die natürliche Infektion analog der Vaccination gegen

*) Ob auch quantitative oder qualitative Änderungen sich vollziehen, darüber vermögen wir nichts auszusagen. Daß ein durch Kaninchen passiertes Straßenvirus in bakteriologischem Sinne virulenter geworden ist als das originäre Virus, ist aus Mangel quantitativer Untersuchungen bis heute nicht entschieden.

**) HELLERS Auffassung, daß es sich um verschiedene Formen (Entwicklungsstadien) beim Lyssavirus handeln dürfte, ist derzeit nicht erwiesen.

Variola zu begründen. Dieses Prinzip hat Pasteur dann auch auf die Lyssa zu übertragen versucht. Zunächst galt es aber eine Reihe Vorarbeiten zu erledigen, um die Durchführung der Immunisierung mit dem Lyssavirus zu ermöglichen: 1. Eine sichere Infektionsmethode mußte erst ersonnen werden. 2. Ein in seiner Virulenz konstantes Virus sowohl als Antigen, als auch zur Infektion war notwendig, um die Immunisierungs- und Infektionsbedingungen gleichmäßig gestalten zu können. 3. Ein sicheres Abschwächungsmittel war zu ermitteln, um stets unter gleichen Bedingungen die Abschwächung virulenten Materials durchführen zu können.

In der subduralen Infektion mit virushaltigem Gehirn, fand Pasteur einen absolut sicheren Modus, stets Lyssa zu erzeugen. Durch Tierpassage gelangte Pasteur dazu, Straßenvirus zu einem Virus fixe umzuwandeln und auf diese Weise, soweit man es eben beurteilen kann, ein konstantes immunisierendes und infektiöses Material zu gewinnen. Die weiteren Arbeiten in Gemeinschaft mit Chamberland und Roux führten zu einem Abschwächungsverfahren (1885). Es gelang, virulentes Mark (Virus fixe) durch Trocknen über Kali causticum bei 23—25° C derart zu verändern*), daß fünf Tage lang getrocknetes Mark nicht mehr Lyssa in sieben Tagen erzeugte, sowie das virulente frische oder ein bis vier Tage lang getrocknetes Mark, sondern verspätet. Acht Tage lang getrocknetes Mark war nicht mehr sicher infektiös und ein 12—14tägiges war avirulent.

Nachdem diese Vorarbeiten, die Pasteur als notwendige Voraussetzung seiner weiteren Immunisierungsarbeiten erachtet hatte, glücklich gelöst waren, ging Pasteur daran, die Schutzimpfung gegen Lyssa experimentell zu begründen. Das ursprüngliche Immunisierungsverfahren (1884) bestand darin, daß Straßenvirus durch Affenpassage abgeschwächt, Kaninchen subdural injiziert wurde und das von diesen Tieren gewonnene Virus zur Immunisierung von Hunden benützt wurde. Es gelang auf diese Weise eine Reihe von Hunden gegen subdurale Infektion mit Straßenvirus zu schützen. Diese Immunisierung wurde weiter nicht mehr verfolgt und hat nunmehr noch historisches Interesse.

Das später geübte Immunisierungsverfahren beruht im wesentlichen darauf, daß Virus fixe (von Kaninchen) getrocknet verschieden-altrig, vom avirulenten bis zum virulenten, subkutan einverleibt wird. Vom 13tägigen angefangen, wurde täglich das nächst kürzer getrocknete Mark subkutan injiziert, bis man zum Schluß eintägiges injizierte. Pasteur konnte mittels dieses Verfahrens Hunde nicht nur gegen den nachträglichen Hundebiß, sondern auch gegen die subdurale Infektion schützen. Bei 23 immunisierten Hunden hatte der nachträgliche Biß keine Wut zur Folge, während von den nichtgeimpften gebissenen Hunden bei 66 % die Wut ausbrach. 5 subdural infizierte Hunde, 6 gebissene, 8 intravenös injizierte blieben im Gegen-

---

*) Babes' Versuche ergaben andere Resultate:

1 Tag lang getrocknetes Mark tötete in 10—11 Tagen (virulentes in 7 Tagen)
2 „ „ „ „ „ „ 12—14
3 „ „ „ „ „ „ 13—20
4 „ „ „ „ „ „ 9—15
10 „ „ „ „ ist avirulent.

Die Differenz zwischen den Resultaten Pasteurs ist zunächst in der Größe der Tiere zu suchen. Pasteur benutzte 2 kg, Babes 1 kg schwere Kaninchen.

satz zu den infizierten nicht geimpften am Leben (von den letzteren gingen subdural infiziert zugrunde von den gebissenen 3, von intravenös injizierten 3).

Damit war die Grundlage für die Immunisierung mit Lyssavirus geschaffen. Weitere Versuche PASTEURS haben gezeigt (1885), daß es auch gelingt, postinfektionell Tiere vor Ausbruch der Krankheit zu schützen. PASTEUR hat bei der nach 24 Stunden postinfektionell durchgeführten Immunisierung innerhalb 24 Stunden die gesamte Menge des verschiedenaltrigen Virus subkutan injiziert und diese Injektion wiederholt*).

Noch bevor PASTEUR diese letzte kurative Methode erprobt hatte, versuchte er das sukzessive Immunisierungsverfahren auf den Menschen anzuwenden, indem er auf Vorschlag von VULPIAN und GRANCHER den von einem wütenden Hunde gebissenen neunjährigen Josef Meister der Impfung unterzog.

Dieser am Menschen geglückte Versuch und die günstigen Tierexperimente bilden die Grundlage des zurzeit allgemein geübten postinfektionellen Schutzimpfungsverfahrens gegen Hundswut.

Die in der Folge mißglückten experimentellen Nachprüfungen einzelner Autoren (VON FRISCH, HÖGYES) und die trotz Schutzimpfung eingetretenen Todesfälle bei gebissenen Menschen waren die Veranlassung, daß verschiedene Experimentatoren nach anderen neuen Immunisierungsmethoden suchten. Auch gaben die zahlreichen Immunisierungsverfahren mit Bakterien und Toxinen weitere Anregungen zum Studium der Immunisierung mit Lyssavirus.

PASTEURS Vorstellung, wie erwähnt wurde, ging zunächst dahin, daß das Prinzip seines Immunisierungsverfahren in der Abschwächung des Virus fixe durch Trocknung des Markes gelegen sei.

PASTEUR hat bei seinen Studien bereits feststellen können, daß Verdünnungen eines Virus je nach der Stärke der Verdünnung das Inkubationsstadium verlängern, so z. B. erkranken Kaninchen nach Infektion mit vierfacher Verdünnung nach acht Tagen, mit 16facher nach neun, mit 64facher nach 11 und 152facher Verdünnung nach 16 Tagen.

Diese Versuche, die PASTEUR zum Zwecke der Abschwächung des Virus angestellt, nahm HÖGYES wieder auf, nachdem die Nachprüfungen der prä- und postinfektionellen Immunisierung nach PASTEUR ihm mißlungen waren**). HÖGYES ging von der Idee aus, daß mittels Verdünnung ein viel gleichmäßigeres Antigen zu gewinnen sein müßte als mittels

---

*) Sowohl bei diesen postinfektionellen Immunisierungsverfahren als auch bei den präventiven ist es bis heute nicht klar, warum kurz hintereinander erst avirulentes dann virulentes Mark injiziert wird. Es ist unwahrscheinlich, daß innerhalb weniger Stunden (postinfektionelle Schutzimpfung) oder weniger Tage (3—4 Tage) die vorangegangene Injektion mit avirulentem Virus bereits immunisierend gewirkt haben konnte.

BABES, GAMALEIA konnten mittels des Traitement intensiv über günstige postinfektionelle Schutzimpfungen bei Hunden berichten.

**) Die präinfektionelle Schutzimpfung (Traitement simple und intensiv) nach PASTEUR ergab HÖGYES negative Resultate. Vielleicht könnte man (HÖGYES) einwenden, daß im 1. Versuche zu kurze Zeit nach der letzten Impfung (8 Tage), im 2. und 3. Versuche zu spät (114 und 109 Tage) nach der Schutzimpfung die Infektion vorgenommen wurde. Auch im nächsten Versuch (Traitement intensiv) wurde zu früh infiziert, trotzdem verendeten die geimpften Hunde später als Kontrollhunde. Die präinfektionellen Versuche stimmen mit den negativen Resultaten v. FRISCHS überein.

Austrocknen. Högyes konnte das Virus durch Verdünnungen in seiner Wirksamkeit so ändern, daß es entweder gar nicht mehr wirkte oder Lyssa mit längerem und kürzerem Inkubationsstadium erzeugte.

Högyes gelang es dann auch mit einem derart diluiertem Virus aktiv zu immunisieren. Die zu Immunisierungen verwendeten Verdünnungen stellt Högyes so dar, daß ein Gewichtsteil Medulla aufs 10-, 100-, 200-, 250-, 500-, 1000-, 5000- und 10000fache verdünnt und mit Kochsalzlösung emulgiert wurde. Es wurde bei der Immunisierung in kurzen Zwischenräumen von schwach verdünnten Emulsionen zu stärkeren übergegangen.

Mittels dieser Dilutionsmethode konnte Högyes im Experiment prä- und postinfektionell viel günstigere Resultate erzielen als wenn er nach Pasteurs Angaben vorging.

Es gelang Högyes bei präinfektioneller Immunisierung von 30 Hunden 25 Hunde gegen eine subdurale Infektion mit Virus fixe oder Straßenvirus immun zu machen. Nur bei fünf Hunden trat Lyssa auf. Högyes meint aber, daß diese fünf Hunde eine schwächere Infektion, wie es der Biß ist, vertragen hätten.

Die postinfektionellen Immunisierungen mit diluiertem Virus fixe waren nur erfolgreich, wenn als Infektionsmodus der Biß gewählt wurde. Von acht gebissenen nachträglich behandelten Hunden brach bei keinem die Wut aus, von acht Kontrollhunden wurden fünf wutkrank. Nachdem Högyes bei ca. 70 Hunden die Unschädlichkeit nachgewiesen, und auch dieselbe für gesunde Menschen (Institutspersonal) erwiesen hatte, ging er daran, dieses Verfahren an Stelle des Pasteurschen an gebissenen Menschen anzuwenden.

Unsere Versuche (Kraus, Keller und Clairmont), die mit der Dilutionsmethode nach Högyes an Kaninchen durchgeführt wurden, haben zunächst einige Fehlerquellen aufgedeckt, welche wohl auf den Ausfall derartiger experimenteller Immunisierungen von Einfluß sein könnten. Zuerst konnten wir zeigen, was bereits Pasteur annahm und Centani auch demonstrieren konnte, daß die Immunität langsam eintritt und gewöhnlich erst 20 Tage nach der letzten Injektion entwickelt ist. Wählt man zur Infektion einen früheren Zeitpunkt, wo die Immunität noch nicht entwickelt ist, sind die Tiere trotz Immunisierung nicht geschützt*).

Zweitens ist auch nach unseren Versuchen wichtig zu wissen, daß zur Infektion verdünntes durch Papier filtriertes Virus zu verwenden sei. Wie auch in den später zu besprechenden Versuchen über Auswertung der Rabizidie eines Serums dieser Faktor von nicht zu unterschätzender Bedeutung ist, so hat es sich auch hier gezeigt, daß trotz Einhaltung des geeigneten Zeitpunktes nach der Immunisierung die Versuche negative Resultate ergeben, solange unfiltrierte Emulsionen zur Infektion verwendet werden.

Interessant waren auch die Resultate in einer Versuchsreihe, in welcher die nach Högyes immunisierten Kaninchen einerseits mit Straßenvirus 1:1, 1:50, andererseits mit Virus fixe 1:1, 1:50 infiziert wurden. Blos die mit Straßenvirus infizierten Kaninchen blieben am Leben.

*) Dies ist wahrscheinlich die Ursache für die ungünstigen experimentellen Ergebnisse präinfektioneller Immunisierungen Pasteurs und auch für die späteren nicht günstigen Resultate bei Hunden der präinfektionellen Schutzimpfung mittels des Traitement intensiv. (1. Brief.)

Die Dilutionsmethode nach Högyes eignet sich vorzüglich, wie noch aus später zu erörternden Versuchen hervorgehen wird, zur Immunisierung größerer Tiere um rabizides Serum zu gewinnen. Wir konnten mittels dieser Methode Hunde, Schafe und Pferde lange Zeit ohne Schaden behandeln.

Von der Auffassung ausgehend, daß die Art des Virus eine Rolle bei der Immunisierung spielen dürfte, habe ich in Gemeinschaft mit Prantschoff diesbezügliche Versuche angestellt. Wäre es nicht denkbar, daß die Immunisierung mit Virus fixe zum Unterschiede von Straßenvirus, also eines bereits durch Tierpassage veränderten Virus, eine bisher ungekannte Rolle spielen dürfte? Marx erwähnt bereits in seiner Monographie, daß die peritoneale Schutzimpfung mit Straßenvirus nicht gelingt. Unsere diesbezüglichen Versuche*) zeigen dasselbe bei subkutaner Immunisierung mit Straßenvirus nach Högyes.

Die Tiere bekamen 14 Injektionen subkutan mit verdünntem Straßenvirus von 1:1000 bis 1:50, täglich 1 ccm**). 20 Tage nach der letzten Injektion erfolgte die subdurale Infektion mit filtriertem Virus fixe 1:100 oder mit filtriertem Straßenvirus 1:100 intraokulär oder subdural. Das Ergebnis war negativ, indem die infizierten vorbehandelten Kaninchen Lyssa bekamen. Daß die Infektion mit Virus fixe zur Krankheit geführt hat, würde den mit Virus fixe durchgeführten Immunisierungen nicht widersprechen, auffallend ist gegenüber den früher angeführten Versuchen, daß auch die Infektion mit Straßenvirus Lyssa zurfolge hat. Diese Versuche würden weitere Anhaltspunkte für die Verschiedenheit des Straßenvirus und Virus fixe ergeben. Nach den Bindungsversuchen, welche Friedberger und v. Eisler mit rabizidem Serum ausgeführt haben, dürfte diese Verschiedenheit der antigenen Eigenschaften nicht in der Verschiedenheit der bindenden Eigenschaften des Virus fixe und Straßenvirus zu suchen sein, da sich beiderlei Virus diesbezüglich gleich verhielt.

Anschließend seien noch Versuche angeführt, welche die bereits von Högyes aufgeworfene Frage, ob nicht die Menge des Virus fixe überhaupt ausschlaggebend sei, in Diskussion ziehen. Es hat bereits Pasteur, dann Högyes einzelne derartige Versuche angeführt. Nach ein- oder zweimaliger subkutaner Injektion mit conc. Virus fixe***) waren Hunde gegen subdurale Infektion mit Straßenvirus refraktär.

Unsere Versuche (Kraus und Pantschoff) wurden mit getrocknetem oder diluiertem Mark durchgeführt und zwar so, daß Kaninchen einmalige oder mehrmalige Injektion gleichaltrigen Markesgleicher Konzentration oder zwei- bis dreimalige Injektionen verschiedenaltrigen, verschieden verdünnten Markes in größeren Mengen subkutan injiziert wurden:

1. Virus fixe 1 : 100 (6 ccm) nach 20 Tag.
   1 : 500 do. do.
   1 : 1000 do. do.
   1 : 5000 do. do.
   } subd. Virus fixe 1 : 100. Lyssa.
2. Virus fixe 1 : 500 (10 ccm) Kan. 327—42, nach 20 Tagen Virus fixe subdural 1 : 100. Lyssa.
3. Virus fixe 1 : 500 14 Injekt. 3 ccm nach 20 Tagen subd. Virus fixe 1 : 100. Lyssa.

---

*) Diese und andere hier mitgeteilten Tatsachen sind bisher nicht veröffentlicht.

**) Die Impfverluste sind auch hier nicht größer als mit Virus fixe; ein einzelne der behandelten Tiere gehen an Lyssa oder ohne nachweisbare Ursache zugrunde.

***) Die Versuche Högyes, mit Passagevirus angestellt, ergaben, wie ich aus dem Vergleiche der Tabellen sehe, ungünstigere Resultate als mit Virus fixe.

4. Virus fixe 1 : 1000 (20 ccm) Kan. 115—97 nach 26 Tagen subd. Virusfixe. Lyssa.
5. Virus fixe 1 : 1000 14 Injekt. tägl. 2 ccm Kan. 43—108. Nach 20 Tagen intraoknl. Straßenvirus. Lyssa.
6. Virus fixe 1 : 1000 (10) 15. XII.
1 : 500 (10) 19. XII. nach 20 Tagen subd. Virus fixe 1 : 100. Lyssa.
7. Virus fixe 1 : 1000 15. XII.
1 : 500 16. XII.
1 : 300 17. XII.
1 : 100 19. XII. nach 20 Tagen subd. Virus fixe 1 : 100. Lyssa.

Jedenfalls zeigen die Versuche, daß auch nach Einverleibung größerer Menge Virus fixe (1 : 500, 10 oder 42 ccm) gegen subdurale Infektion mit filtriertem Virus fixe 1 : 100 kein Schutz bei Kaninchen zu erzielen ist. Ob nicht diese Tiere eventuell gegenüber der Infektion mit Straßenvirus, wie es Högyes in seinen Versuchen ja auch gezeigt hat, refraktär sein dürften, müssen weitere diesbezügliche Versuche lehren.

Daß bereits einmalige Injektion von konzentriertem Virus Immunität erzeugen könne, haben nach Galtier (1881) Roux und Nocard an Herbivoren (Schafe, Ziegen) gezeigt. Tiere, die 24 Stunden vorher intraokulär mit konzentriertem Straßenvirus infiziert waren, konnten nachher mit mehrmaliger intravenöser Injektion von Passagevirus geschützt werden. Auch bei Hunden konnte Roux durch einmalige intravenöse Injektion (8- oder 11tägig) Immunität erzeugen, allerdings waren die Resultate inkonstant. Krasmuzki hat ähnliche Versuche an Kaninchen*) angestellt und Wyssokowitsch versuchte durch intravenöse Injektion von Virus fixe Menschen zu behandeln.

Protopopoff und Helmann haben durch intraperitoneale Injektion von Virus fixe Immunität erzeugen können. Marx, der diese Versuche in neuerer Zeit wieder aufgenommen hat, will nach einer einmaligen Injektion großer Mengen Virus fixe bei Kaninchen, Hunden und Ziegen kompletten Impfschutz erzielt haben.

Würde es sich ergeben, daß die umständliche Methode Pasteurs und auch die von Högyes in einem kürzeren Zeitraum zu ersetzen sei, wäre diese Feststellung sowohl von theoretischer als auch von praktischer Bedeutung.

Es würde sich daraus ergeben, daß die bisherige Auffassung, daß nur die Methode Pasteurs (zuerst verdünntes, dann konzentriertes Virus) zur Immunität führen könne, nicht das Prinzip des Verfahrens ausmache und daß die Menge eines **bestimmten** Virus (Virus fixe) maßgebend sei. In zweiter Linie wäre natürlich auch für die Praxis viel gewonnen, da ja die jetzt übliche Schutzimpfung viel zu umständlich und kostspielig ist. Wir werden sehen, daß ähnliche Versuche auch bereits in der Praxis an Menschen durchgeführt wurden (Ferran).

In einer anderen Richtung als die vorausgehenden Versuche bewegen sich die Immunisierungsstudien von Babes, Puscariu und Vesesco, Rodet und Galavielle, Tizzoni und Centanni, Heller, Marie.

Babes hatte günstige Resultate mit durch Wärme abgeschwächten Virus erhalten. Die mit auf 58° verschieden lange (40′, 32′, 24′, 16′, 8′, 4′, 2′) erwärmten Mark behandelten Hunde waren postinfektionell geschützt. Die Konsequenzen für die Praxis aus diesen Versuchen hat, wie wir noch hören werden, Puscariu (Jassy) gezogen.

---

*) Wie bereits angeführt worden, führen intravenöse Injektionen von Gehirnemulsionen bei Kaninchen und Hund zu intravaskulären Gerinnungen und zu Tod.

Rodet, Galavielle und Martin bereiten ihr Vaccin durch Aufbewahren in Glyzerin, wobei die Infektiosität des Markes abgeschwächt werden soll, nicht aber die immunisierenden Eigenschaften.

Theoretisches Interesse hat noch die italienische Methode (Valli), bei welcher abgeschwächtes Virus*) durch Einwirkung natürlichen Magensaftes (Tizzoni und Centanni) oder künstlicher Magensaft (Babes und Talasescu) benützt wurde.

Aus diesen letzten Angaben scheint die Tatsache hervorzugehen, daß lebendes Virus zur Immunisierung überhaupt nicht notwendig zu sein scheint. In dieser Richtung bewegen sich auch neuere Versuche von Heller im Anschluß an die Ermittelungen von Barrat.

Barrat, wie schon angeführt wurde, konnte mit dem Apparat von Macfadyen und Rowland unter Anwendung flüssiger Luft dem Lyssavirus nach $^1/_2$—1 Stunde seine Infektiosität nehmen. Diese Tatsache konnte Heller bestätigen und macht sie zum Ausgangspunkt neuer Versuche zur Ermittlung der antigenen Eigenschaften des Lyssavirus. Leider lassen die mit großem Fleiß ausgeführten Versuche gar keinen Schluß zu. Heller hat zehn Kaninchen subkutan verschieden lange mit dem nach Barrat erzeugten avirulenten Lyssavirus vorbehandelt und glaubt, daß dieser Schutzimpfungsmethode ein Effekt zukomme, weil nämlich nach subkutaner Infektion mit Passagevirus die Tiere am Leben geblieben sind. Wir möchten demgegenüber den Einwand erheben, daß die subkutane Infektion sowohl mit Virus fixe als auch mit Straßenvirus viel zu unsichere Resultate ergibt, als daß man sie als Prüfungsmethode über die zustandegekommene Immunität heranziehen darf. (Heller verwendet wohl bei seinen Kontrolltieren die intracerebrale Infektion.)

Über die experimentelle Begründung der kombinierten Immunisierungen (Serovaccination), wobei Virus entweder gemischt mit rabicidem Serum (Marie) oder nebeneinander injiziert wird (Babes) soll bei Besprechung der Rabicidie des Lyssaserums berichtet werden (Bd. II).

Über die Technik der Schutzimpfungen bei Menschen.

Die günstigen Resultate der präinfektionellen Immunisierung im Tierversuch, welche Pasteur an Hunden gewonnen hatte, veranlaßten ihn, auf Rat der Professoren Vulpian und Grancher einen von einem wütenden Hunde gebissenen Knaben derart zu behandeln. Am 6. Mai 1885 wurde der 9jährige Knabe Meister zum ersten Male mit Hundswutvirus aktiv immunisiert. Er erhielt 13 Injektionen subkutan im Verlaufe von 11 Tagen**). Im Laufe des nächsten Jahres vom 26. Oktober bis 25. Februar 1886 (Compt. rend., Vol. CII, pag. 459, Mars 1 1886) hat Pasteur 350 Menschen, die von wütenden oder wutverdächtigen Hunden gebissen waren nach seinem Verfahren geimpft. Am 12. April (Compt. rend., Tome CII, pag. 835) teilt Pasteur 726 geimpfte Fälle mit (688 von Hunden 38 von Wölfen gebissen). Am 2. November 1886 machte Pasteur in der Académie des Sciences die Mitteilung, daß er bis 31. Oktober 1886 bereits 2490 Personen geimpft hatte. In dieser Mitteilung berichtet Pasteur, daß er sich wegen einzelner Todesfälle bei

*) Dieses Virus soll tatsächlich abgeschwächt sein insofern, als ein 3 oder 12 Stunden lang mit Magensaft behandeltes Virus fixe Kaninchen erst nach 15 Tagen bzw. 6 Wochen tötete und die von diesen Kaninchen geimpften Tiere ebenfalls spät verenden.

**) 15-, 14 + 12-, 11 + 9-, 8-, 7-, 6-, 5-, 4-, 3-, 2-, 1tägiges Mark.

Wolfsbissen entschlossen hat, eine verstärkte Methode*) anzuwenden welche ihm günstigere Resultate ergeben hat. Im ersten Heft seiner Annalen erscheint dann ein zusammenfassender Bericht über die seit November 1885 bis Dezembber 1886 behandelten Fälle und eine Zusammenstellung über die Erfolge der Schutzimpfungen der neu gegründeten Impfinstitute. Es wurden außer von Pasteur behandelt:

von Bujwid	in Warschau	84	Fälle	ohne Todesfall
„ „	„ Petersburg	118	„	mit 1 Todesfall
„ Gamaleia	„ Odessa	325	„	mit 12 Todesfällen
„ di Vestea	„ Neapel	48	„	ohne Todesfall
„ Ullmann	„ Wien	96	„	ohne Todesfall
„ Parschinsky	„ Samara	47	„	mit 2 Todesfällen.

Seither sind tausende und tausende von Menschen (nach Högyes sind innerhalb von 10 Jahren 50000 Menschen) geimpft worden. Babes' Zusammenstellung aus fünf Instituten weist 17 556 Behandelte in den Jahren 1903/05 auf.

Die Resultate fast aller Institute stimmen darin überein, daß bei rechtzeitiger Anwendung der Schutzimpfung, die Zahl der Todesfälle nach Biß wütender Tiere kaum 1 % erreicht. Damit ist wohl der Beweis für die Wirksamkeit der Schutzimpfung erbracht..

Wenn auch seither das ursprüngliche Verfahren von Pasteur selbst zunächst und dann von anderen modifiziert wurde, so *bleibt immer die Immunisierung mit* **Virus fixe** als Prinzip erhalten.

Das in den meisten Instituten geübte Verfahren ist wohl das von Pasteur angegebene oder nur wenig modifizierte Verfahren: die *Schutzimpfung mit verschiedenaltrigem, getrocknetem Rückenmark von an Virus fixe* verendeten Kaninchen. Neben dieser Behandlungsmethode haben einzelne Autoren, wie z. B. Högyes, Babes, Puscariu, Immunisierungen angegeben, die im Prinzip wohl von Pasteurs Methode nicht verschieden sind.

Bei den *Schutzimpfungen* nach Högyes *oder bei der rumänischen* (Babes, Puscariu) kommt das *Virus fixe nicht, wie beim ursprünglichen* Pasteurschen *Verfahren, getrocknet in Anwendung, sondern verdünnt oder verschieden lange erwärmt.*

Die Serumbehandlung wie sie von Babes, Tizzoni gedacht war, kann, wie wir später sehen werden, nicht in Betracht kommen, wohl aber wird rabizides Serum in Kombination mit der aktiven Immunisierung von einzelnen bei schweren Gesichtsbissen und Wolfsbissen als raschere Immunisierung verwendet (Babes, Marie).

Die Schutzimpfung nach Pasteur beruht, wie bereits auseinandergesetzt wurde, auf der subkutanen Einverleibung von Wutvirus. Das Virus, da es nicht kultivierbar ist, muß von an Lyssa verendeten Tieren gewonnen werden. Zu diesem Zweck werden gesunde Kaninchen (1500 bis 2000 g) subdural infiziert und deren Rückenmark verwendet. *Nicht das originäre Straßenvirus kommt zur Anwendung, sondern ein durch Tierpassage* (Kaninchen, Meerschweinchen) *verändertes,* sich *konstant* bleibendes Virus, welches *Virus fixe***) bezeichnet wird.

Man geht bei der Anlage eines neuen Institutes so vor, daß man sich ein Virus fixe, so wie es Högyes beispielsweise tat, selbst durch

---

*) 12 + 10 + 8 um 11, 4 und 9 Uhr am 1. Tag, 6 + 4 + 2 um 11, 4 und 9 Uhr am 2. und am 3., 8 + 6 + 4 am 4., 3 + 2 am 5., 1 am 6., 4 am 7., 3 am 8., 2 am 9. und am 10. Tage mit eintägigem Mark.

**) Über Erzeugung dieses Virus wurde in einem früheren Kapitel gesprochen.

Tierpassage (Kaninchen oder Meerschweinchen nach Babes) bereitet oder ein solches von anderen Instituten erhält. Mit diesem letzteren, in sterilisiertem Glyzerin konserviertem Mark werden täglich zwei Kaninchen subdural geimpft. Erst wenn die erst geimpften Kaninchen (nach 10 bis 12 Tagen) an Lyssa eingegangen sind, wird zur weiteren Impfung die frische Medulla verwendet*). (In Instituten, die wenig Patienten haben, wird, um Kaninchen zu sparen, da ja wenig Mark gebraucht wird, das getrocknete Virus in Glyzerin aufbewahrt und bloß alle zehn Tage geimpft (Calmette). Man wiederholt die Infektion noch an einer zweiten oder dritten Serie von Kaninchen und benützt, wenn die Kaninchen regelmäßig unter dem Bilde der paralytischen Lyssa eingehen, das Rückenmark für die Schutzimpfung.

Babes prüft noch vorher das Rückenmark im Experiment aus. Zunächst prüft er die Abschwächung aus, indem er 12—2 tägiges Rückenmark Kaninchen subdural injiziert, um die Gleichmäßigkeit der Abschwächung zu konstatieren. Dann prüft er in einem postinfektionellen Versuche an Hunden, die er von einem wütenden Hunde am Kopfe beißen läßt, die antigene Wirksamkeit. Wenn die 24 Stunden nachher in Behandlung genommenen Hunde am Leben bleiben, von vier Kontrolltieren mindestens zwei sterben, wird das Virus zur Behandlung von Menschen verwendet.

Fig. 9.

Das frisch an Lyssa verendete Kaninchen (Marx entblutet Tiere 24 Stunden vor dem Tode) wird aufgespannt, dessen Rückenmark und Gehirn herauspräpariert. Das mit Lysol oder Sublimat gewaschene Fell wird vorher abgezogen und der Rückenmarkskanal mit einer krummen Knochenschere von unten herauf aufgemacht. (Es empfiehlt sich, durch Unterlage eines Holzblockes die Wirbelsäule zu spannen. Vor der Knochentrennung sollen die langen Rückenmuskeln längs der Processus spinosi mit dem Messer getrennt werden.) Nach Freilegung des Rückenmarkes

---

*) Das ursprüngliche Mark soll aber in Glyzerin weiter aufbewahrt werden, damit bei eventuellem Ausfall der nächst infizierten Tiere Virus zur Infektion vorhanden ist.

Auf die konservierende Eigenschaft des Glyzerins hat Roux zuerst aufmerksam gemacht. Loir, Rodet and Galavielle, Remlinger konnten die Wirksamkeit des in Glyzerin konservierten Virus noch nach Monaten (Remlinger 10 Monate) konstatieren. Für die Praxis ist die Konservierung des Virus in Glyzerin nicht unwichtig. Zunächst eignet sich diese Art der Konservierung für Gehirne, welche zu diagnostischen Zwecken an Institute transportiert werden sollen. Institute, welche wenig Patienten haben, können durch Konservierung des Markes in Glyzerin viel Material sparen. Außerdem kann man ein bestimmtes Virus zu Studienzwecken derart unverändert aufbewahren. Interessant ist die Analogie, daß auch das Virus der Hühnerpest, der Vaccine sich in Glyzerin lange (Monate) unverändert virulent erhalten läßt.

nimmt man das Rückenmark heraus. Man schneidet es in unteren Lumbalmark quer durch, faßt das Ende mit einer anatomischen Pinzette

Fig. 10.

und trennt mit der Schere die Wurzeln durch, so daß man das Rückenmark anstandslos herausnehmen kann (Fig. 9 und 10). Das Rückenmark wird dann an sterilisierten Seidenfäden in braune sterilisierte Glasgefäße (Fig. 11), die am Boden Stücke von Kali causticum (Kalium hydrooxydat) enthalten, aufgehängt. Die Gefäße werden in dunklen Kästen, in einem Raum, der auf 22—25° C temperiert ist, aufbewahrt. Die Medulla wird nachher durch Herausnahme des Gehirns zur Weiterimpfung verwendet. (Zum Schluß muß das Tier noch obduziert werden, ob nicht eventuell Infektionen vorliegen*) usw., da das Mark solcher Tiere weder für die Schutzimpfung noch zur weiteren Passage verwendet wird. Auch wird das Mark durch Impfung von Bouillon auf Sterilität geprüft.)

Fig. 11.

Das Rückenmark wird dann, je nachdem es verschieden lange getrocknet wurde, in sterilisierten Reibschalen aus Glas mit sterilisierter Bouillon oder physiologischer

*) Gewöhnlich außer an Coccidiose gehen Kaninchen an der von Beck und Kraus beschriebenen sogenannten Kanincheninfluenza zugrunde (Zeitschr. f. Hyg., Bd. XV u. XXIV). Diese Krankheit, bedingt durch zweierlei sehr ähnliche Mikroorganismen, ist höchst infektiös. Wenn einmal die Seuche ausgebrochen ist, so gehen fast alle Kaninchen daran zugrunde. Bei Einstellung frischer Tiere empfiehlt es sich, stets nachzuschauen, ob keine eitrige Sekretion an der Nase nachweisbar ist.

Kochsalzlösung mittels eines Glaspistilles emulgiert und in Mengen von 3 ccm Menschen subkutan injiziert. Approximativ wird 1 ccm Mark auf 1 ccm Flüssigkeit gerechnet (Högyes). Nach Marx wird 1 ccm Mark im Reibglas mit 5 ccm steriler Bouillon oder mit Babesschem künstlichem Serum (5 g Natr. sulf., 6 g Natr. chlorat., 1000 ccm Wasser) verrieben. Davon werden 1—3 ccm je nach dem Alter des Markes injiziert. Eine genaue Abwägung des Markes wird nirgendwo vorgenommen und Pasteur selbst gibt keine genaue Dosierung der Menge des Virus an*).

Die Impfung geschieht täglich, durch 14 Tage, drei Wochen und länger. Die Injektionen werden subkutan mit einer Pravazspritze vorgenommen. Daß hierbei alle Kautelen zu beachten sind, ist selbstverständlich. Die Kanüle wird jedesmal in heißem Öl sterilisiert. Nach vollendeter Schutzimpfung werden die Impflinge entlassen und von den betreffenden Behörden ein Jahr in Evidenz gehalten.

Die folgende Tabelle bringt übersichtlich das Schema, nach welchem im Institute Pasteur bei der Schutzimpfung vorgegangen wird:

Tag der Behandlung	I. Bei leichten Bissen	II. Die gewöhnliche Behandlung	III. Bei schweren Bissen (Kopf)
	getrocknetes Mark	getrocknetes Mark	getrocknetes Mark
1.	14+13 Tage je 3 ccm	14+13 Tage je 3 ccm	V. 14+13 A. 12+11 je 3 ccm
2.	12+11 „ „ 3 „	12+11 „ „ 3 „	„ 10+9 „ 8+7 „ 3 „
3.	10+9 „ „ 3 „	10+9 „ „ 3 „	„ 6 „ 6 „ 2 „
4.	8+7 „ „ 3 „	8+7 „ „ 3 „	5 je 2 ccm
5.	6+6 „ „ 2 „	6+6 „ „ 2 „	5 „ 2 „
6.	5 „ „ 1 „	5 „ „ 2 „	4 „ 2 „
7.	5 „ „ 1 „	5 „ „ 2 „	3 „ 1 „
8.	4 „ „ 1 „	4 „ „ 2 „	4 „ 2 „
9.	3 „ „ 1 „	3 „ „ 1 „	3 „ 1 „
10.	5 „ „ 2 „	5 „ „ 2 „	5 „ 2 „
11.	5 „ „ 2 „	5 „ „ 2 „	5 „ 2 „
12.	4 „ „ 2 „	4 „ „ 2 „	4 „ 2 „
13.	4 „ „ 2 „	4 „ „ 2 „	4 „ 2 „
14.	3 „ „ 2 „	3 „ „ 2 „	3 „ 2 „
15.	3 „ „ 2 „	3 „ „ 2 „	3 „ 2 „
16.	—	5 „ „ 2 „	5 „ 2 „
17.	—	4 „ „ 2 „	4 „ 2 „
18.	—	3 „ „ 2 „	3 „ 2 „
19.	—	—	5 „ 2 „
20.	—	—	4 „ 2 „
21.	—	—	3 „ 2 „

Die Schutzimpfungsanstalten halten sich entweder an die Schemen II und III, welche im Institut Pasteur jetzt angewendet werden, oder modifizieren das Verfahren in der Weise, daß sie mit kürzer getrocknetem Mark beginnen und rasch zu virulentem Mark aufsteigen.

Am eingehendsten hat sich Babes mit der Pasteurschen Schutzimpfung in ihrer Anwendung in der Praxis beschäftigt. Postinfektionelle Versuche an Hunden, in welchen $1/2$ Stunde nach der subduralen Infek-

*) Eine ausführliche Beschreibung der Einzelheiten bei der Schutzimpfung siehe Babes im Handbuch von Pentzold und Stintzing.

tion es Babes gelang, die Tiere am Leben zu erhalten, führten ihn dazu, auch bei Menschen rasch zu virulentem*) Mark überzugehen. Zunächst war es diese experimentelle Erfahrung und später die nicht besonders günstigen Resultate des ursprünglichen Pasteurschen Verfahrens bei Bißwunden am Kopfe von wütenden Hunden, namentlich aber Wölfen, welche Babes dazu führten, das Verfahren Pasteurs zu modifizieren. Am internationalen Kongreß in London stellte Babes die Forderung an das Pasteursche Verfahren, daß es möglich sei, wenigstens von den Gebissenen mit ungünstiger Prognose (Kopfbisse von Wölfen) diejenigen am Leben zu erhalten, welche nicht vor dem 30. Tage gestorben sind. Babes änderte je nach den Erfahrungen, die er jeweilig machen konnte, das ursprüngliche Pasteursche Schema der Immunisierung, so daß derzeit sechs Schemen vorliegen, nach welchen Menschen in Bukarest behandelt wurden. Schutzimpfung nach Babes.

Die besten Resultate verzeichnet Babes auch bei Wolfsbissen wenn folgendermaßen vorgegangen wurde:

Tage	Getrocknetes Mark	10% Gehirnemulsion (Virus fixe)	Serum von immunisierten Hunden, Eseln
1.	9 + 8, 7 + 6	—	—
2.	3 + 2, 2 + 1	—	—
3.	3 + 2, 1	—	—
4.	8 + 7	20 ccm auf 80° erwärmt	—
5.	6 + 5	20 „ „ 70° „	—
6.	5 + 4	20 „ „ 70° „	—
7.	4 + 3	20 „ „ 65° „	—
8.	3 + 2	20 „ „ 60—55° „	—
9.	2 + 1	20 „ „ 55—50° „	—
10.	—	—	20 ccm
11.	8 + 7	20 „ „ 80° „	—
12.	7 + 6	20 „ „ 75° „	—
13.	6 + 5	20 „ „ 70° „	—
14.	5 + 4	20 „ „ 65° „	—
15.	3 + 4	20 „ „ 60° „	—
16.	3 + 2	20 „ „ 55° „	—
17.	2 + 1	20 „ „ 50° „	—
18.	10	—	} 20 ccm
19.	—	—	
20.	—	—	

Mit dieser Behandlung hatte Babes 16 Fälle behandelt und keinen Mißerfolg (Tod nach der fünften Woche) (bloß einen Todesfall in der dritten Woche**) zu verzeichnen. Bei Hundebissen meint Babes wird diese Behandlung noch bessere Resultate ergeben. Auch mit den anderen

*) Die Hunde vertragen anstandslos am 1. Tag, 12 + 11 + 10 + 9 + 8tägiges Mark, nach 1 Stunde 9 + 8 + 7 + 6 + 5tägiges, nach 1 Stunde 6 + 5 + 4 + 3 + 2-tägiges, nach 1 Stunde 3 + 2 + 1 + frisches Mark. Diese Injektionen werden 6 Tage lang fortgesetzt.

**) Die nichtbehandelten Fälle sterben meist am 30. Tag bezw. einige Tage früher oder später; etwas weniger als die Hälfte geht später zugrunde (von 300 Fällen sind 28 in der 3. Woche erkrankt).

Modifikationen, in welchen weder Serum noch erwärmtes Mark zur Anwendung kam, hatte BABES günstige Resultate insofern, als er die Mortalität von 60—90% um mehr als 40—70% herabzusetzen imstande war. Jedenfalls geht aus, der BABESschen Statistik hervor, daß eine intensivere Behandlung als die welche im Institut PASTEUR geübt wird, namentlich bei schweren Bissen günstigere Resultate aufzuweisen hat. Weiters aber für das Verständnis des Prinzipes der Immunisierung ist die Tatsache wichtig, daß bereits am ersten oder zweiten Tag virulentes Mark von Virus fixe injiziert werden kann ohne irgendwie den Menschen zu schädigen.

Auch andere Institute (GAMALEIA), Krakau (BUJWID) usw. beginnen mit einem nur kürzer getrockneten Mark die Impfung und steigen rascher zu virulentem Mark. Diese Institute haben ebenfalls bessere Resultate seitdem sie mehr virulentes Mark injizieren (s. HÖGYES).

BUJWID trocknet das Mark bei 7—10° im Winter, im Sommer 12—15° und beginnt mit achttägigem im Sommer, injiziert bis zu zweitägigem Mark.

MARX hat im Berliner Institut nach folgendem Schema behandelt.

I. 8 + 7, 6 + 6, 5, 5, 4, 3, 3, 5, 5, 4, 4, 3, 3, 2, 2, 5 + 4, 3, 4, 5tägiges Mark in 19 Tagen.

II. 8 + 7 + 6, 5 + 4, 4 + 3, 5 + 5, 4 + 4, 3, 3, 2, 2, 5, 5, 4, 4, 3, 3, 2, 2, 4, 3, 3, 2tägiges Mark in 21 Tagen.

Später hat BECK diese Behandlung etwas abgeändert, so daß nach folgendem Schema in Berlin behandelt wird.

8 + 7, 6 + 6, 5, 5, 4, 3, 3, 5 + 4, 4, 3, 3, 2, 2, 5 + 4, 3, 2tägiges Mark in 16 Tagen.

Das Wiener Institut (PALTAUF) impft jetzt durch 14 Tage folgende Markserien:

8 + 7, 6, 5, 5, 4, 3, 3, 5, 4, 3, 2, 4, 3, 2tägiges.

Die Methode von HÖGYES, welche bisher keine allgemeine Anwendung gefunden hat und nur in Budapest durchgeführt wird, beruht, wie früher schon auseinandergesetzt wurde, darauf, daß verschieden verdünntes frisches Gehirn der an Lyssa (Virus fixe) verendeten Kaninchen (Medulla oblongata) Menschen subkutan injiziert wird. Man geht bei der Bereitung der Emulsion so vor, daß man 1 Teil Medulla oblongata abwägt, mit 100 Teilen physiologischer Kochsalzlösung verreibt und von dieser Stammlösung mittels geaichter Pipetten Verdünnungen von 1:200 bis 500—1000—2000—5000—6000—8000—10000 anlegt.

Wie die Nachprüfungen von NITSCH ergeben haben, so sind auch 10000fache Verdünnungen, mit welchen HÖGYES seine Infektionen beginnt, noch infektiös. NITSCH gelang es nach subduraler Injektion größerer Mengen des aufs 5—10000fache verdünnten Virus, stets Lyssa mit gewöhnlicher Inkubation von 7—10 Tagen zu erzeugen. HÖGYES injiziert demnach, wenn er bei 3 ccm einer 10000fachen Verdünnung beginnt, die sicher tödliche Dosis für Kaninchen. Am selben Tage injiziert er aber noch 6000fach, eventuell 2000fach verdünntes Virus, sodaß er schon am ersten Tage gleich große Mengen infektiösen Virus subkutan einverleibt.

Schema für leichtere Hand- und Fußwunden.

Tag der Injektion	Grad der Dilution	Menge der injizierten Emulsion ccm	Tag der Injektion	Grad der Dilution	Menge der injizierten Emulsion ccm
1.	$^1/_{10000} + ^1/_{8000}$		8.	$^1/_{1000}$	$1^1/_2$
	$^1/_{6000} + ^1/_{5000}$	3		$^1/_{500}$	1
2.	$^1/_{5000}$		9.	$^1/_{200}$	
	$^1/_{2000}$	2	10.	$^1/_{6000} + ^1/_{5000}$	3
3.	$^1/_{2000}$			$^1/_{2000}$	2
	$^1/_{1000}$	$1^1/_2$	11.	$^1/_{2000}$	
4.	$^1/_{1000}$			$^1/_{1000}$	$1^1/_2$
	$^1/_{500}$	1	12.	$^1/_{1000}$	
5.	$^1/_{200}$			$^1/_{500}$	
6.	$^1/_{6000} + ^1/_{5000}$	3	13.	$^1/_{200}$	1
	$^1/_{2000}$	2	14.	$^1/_{100}$	
7.	$^1/_{2000}$				
	$^1/_{1000}$	$1^1/_2$			

Schema für Kopf- und Gesichtswunden.

Tag der Injektion	Grad der Dilution	Menge der injizierten Emulsion ccm	Tag der Injektion	Grad der Dilution	Menge der injizierten Emulsion ccm
1.	$^1/_{10000} + ^1/_{8000} + ^1/_{6000}$	3	11.	$^1/_{200}$	1
	$^1/_{5000} + ^1/_{2000}$	3—2	12.	$^1/_{1000} + ^1/_{5000}$	3
2.	$^1/_{5000} + ^1/_{2000}$	3—2		$^1/_{2000} + ^1/_{1000}$	$2—1^1/_2$
	$^1/_{1000} + ^1/_{500}$	$1^1/_2—1$	13.	$^1/_{1000} + ^1/_{500}$	$1^1/_2—1$
3.	$^1/_{200}$	1		$^1/_{200}$	1
4.	$^1/_{6000} + ^1/_{5000}$	3	14.	$^1/_{6000} + ^1/_{5000}$	3
	$^1/_{2000} + ^1/_{1000}$	$2—1^1/_2$		$^1/_{2000} + ^1/_{1000}$	$2—1^1/_2$
5.	$^1/_{1000} + ^1/_{500}$	$1^1/_2—1$	15.	$^1/_{1000}$	$1^1/_2$
	$^1/_{200}$	1		$^1/_{500}$	1
6.	$^1/_{6000} + ^1/_{5000}$	3	16.	$^1/_{200}$	
	$^1/_{2000} + ^1/_{1000}$	$2—1^1/_2$	17.	$^1/_{1000} + ^1/_{5000}$	
7.	$^1/_{1000}$	$1^1/_2$		$^1/_{2000} + ^1/_{1000}$	$2—1^1/_2$
	$^1/_{500}$	1	18.	$^1/_{1000}$	
8.	$^1/_{200}$			$^1/_{600}$	
9.	$^1/_{6000} + ^1/_{5000}$	3	19.	$^1/_{200}$	1
	$^1/_{2000} + ^1/_{1000}$	$2—1^1/_2$	20.	$^1/_{100}$	
10.	$^1/_{1000}$	$1^1/_2$			
	$^1/_{500}$	1			

Puscariu hat die von Babes zuerst experimentell begründete Immunisierung auf den Menschen übertragen. Ein Gehirn wird in 100 ccm sterilem Wasser emulgiert, durch Watte filtriert und durch 15 Minuten auf verschiedene Temperaturen erwärmt (80, 70, 65, 55, 50 und 45° C).

Die Behandlung erfolgt nach folgendem Schema:

Für mittlere Fälle:

1 ccm	anormale Emulsion	auf	80°	2 ccm
2 „	„ „	„	75°	2 „
3 „	„ „	„	70°	2 „
4 „	„ „	„	65°	2 „
5 „	„ „	„	60°	2 „
6 „	„ „	„	55°	2 „
7 „	„ „	„	75°	3 ccm
8 „	„ „	„	70°	3 „
9 „	„ „	„	65°	3 „
10 „	„ „	„	60°	3 „
11 „	„ „	„	55°	3 „
12 „	„ „	„	50°	3 „

Für leichte Fälle:

1 ccm	anorm. Emuls.	auf	80—75°	2 ccm
2 „	„ „	„	70—65°	2 „
3 „	„ „	„	60°	2 „
4 „	„ „	„	55°	2 „
5 „	„ „	„	80—75°	3 ccm
6 „	„ „	„	70—65°	3 „
7 „	„ „	„	60—55°	3 „
8 „	„ „	„	50°	3 „
9 „	„ „	„	80°	5 ccm
10 „	„ „	„	70°	5 „
11 „	„ „	„	60°	5 „
12 „	„ „	„	50°	5 „

Für schwere Fälle:

1 ccm	anormale Emulsion	auf	80—75°	3 ccm
2 „	„ „	„	70—65°	3 „
3 „	„ „	„	60—55°	3 „
4 „	„ „	„	50°	3 „
5 „	„ „	„	80—75°	4 ccm
6 „	„ „	„	70—65°	4 „
7 „	„ „	„	60—55°	4 „
8 „	„ „	„	50°	4 „
9 „	„ „	„	45°	4 „
10 „	„ „	„	80°	5 ccm
11 „	„ „	„	70°	5 „
12 „	„ „	„	60°	5 „
13 „	„ „	„	50°	5 „
14 „	„ „	„	45°	5 „

Bezüglich der Indikation zur Impfung sei hier folgendes bemerkt.

Menschen, die von sicher wütenden Hunden (klinisch, experimentell und histologisch) (Gruppe A) oder von wutverdächtigen Hunden (Obduktionsbefund) (Gruppe B) gebissen wurden, kurz bei begründetem Wutverdacht, vorausgesetzt, daß der Biß auch eine Kontinuitätstrennung der Haut zur Folge hatte (Blutung), sind ohne weiteres der Impfung zu unterziehen. Bei oberflächlichen, nicht bis ins Korium reichenden, nicht blutenden Hautabschürfungen, Quetschungen braucht nicht geimpft zu werden. Wenn kein genügender Anhaltspunkt für die Annahme eines Wutverdachtes des Tieres besteht (weder klinisch noch pathologisch-anatomisch) werden in der Regel die Menschen nicht geimpft (Gruppe C). Gerade für diese Gruppe der Gebissenen ist die Entscheidung der Frage, ob geimpft werden soll oder nicht, jetzt leichter zu entscheiden als früher. Man ging früher so vor, daß man das verdächtige Tier in klinische Beobachtung brachte, ob nicht eventuell doch Wuterscheinungen auftreten würden oder verimpft die Medulla. Um keine Zeit zu verlieren, was hier, wie die Statistik lehrt, ebenso wichtig für die Wirksamkeit der Schutzimpfung ist wie bei anderen Infektionskrankheiten, wird jetzt schon die histologische Untersuchung auf Negrische Körper durchgeführt. Der negative Ausfall der histologischen Untersuchung, wie früher erwähnt, beweist allerdings nicht sicher das Nichtvorhandensein der Lyssa.

Die Statistiken der nach Pasteur behandelnden Institute sind in den Berichten der Schutzimpfungsanstalten zusammengestellt, woraus

sich ergibt, daß die Mortalität der von Hunden gebissenen Menschen kaum 1 oder geringes über 1% beträgt*).

Babes hat in einer jüngsten Zusammenstellung aus den Jahren 1903, 1904 und 1905 die Statistik der Institute Paris, Berlin, Wien, Budapest und Bukarest mitgeteilt. Es starben:

in Paris	von	2110	behandelten Fällen insgesamt	0,61%
„ Berlin	„	934	„ „ „	1,28%
„ Wien	„	762	„ „ „	1,04%
„ Budapest	„	8658	„ „ „	0,77%
„ Bukarest	„	3091	„ „ „	0,12%

Schlußbemerkungen.

Die ältere Statistik Gamaleias spricht ebenso wie die von Bujwid, Bordoni, Uffreduzzi (Turin), de Blasi, Russo Travali (Palermo), Palmirski und Orlowski für die von Babes mit Erfolg vertretene Anschauung, daß das wirksame Prinzip der Immunisierung große Dosen virulenten Markes von Virus fixe seien.

Daß die Injektion virulenten Markes unschädlich ist, beweisen zur Genüge die Fälle von Babes, welche niemals irgendwelche Erscheinungen von Lyssa aufgewiesen haben. Danach scheint es ganz überflüssig, getrocknetes Mark ein oder zwei Tage vorher zu injizieren, um am dritten Tage virulentes Mark zu injizieren, da in zwei Tagen eine Immunität gegen virulentes Mark unmöglich entstanden sein konnte.

Schon die Schutzimpfung nach den Pasteurschen Angaben sprechen dafür, daß virulentes Mark bei subkutaner Einverleibung für den Menschen unschädlich sein dürfte, da das getrocknete avirulente Mark selbst in sechs oder acht Tagen keine Immunität gegen virulentes erzeugt. Die früher angeführten postinfektionellen Versuche Pasteurs an Hunden können ebenfalls dazu führen, anzunehmen, daß die Menge des Virus fixe das wirksame Prinzip der Immunisierung ist.

Ferran hat ja bereits im Jahre 1888 mit vollvirulentem Mark Menschen injiziert, indem er täglich 3—4 ccm durch 10 Tage einverleibt hatte**). Wenn wir aber auch von Ferrans Versuchen, die nach einer brieflichen Mitteilung an Högyes sehr günstige Resultate ergaben, absehen, so bestätigen die Immunisierungen nach Högyes und seiner Statistik, weiter die von den angeführten Autoren nach Pasteurs Methode gemachten Erfahrungen, daß virulentes Mark bei subkutaner Einverleibung für den Menschen unschädlich ist.

---

*) Auch bei der Verwertung der Statistik wird auf die Einteilung der Gebissenen nach Pasteur überall Rücksicht genommen. In die Gruppe A werden diejenigen Gebissenen aufgenommen, für welche die Wuth der beissenden Tiere experimentell oder durch die Wuterkrankung gleichzeitig gebissener Tiere oder Menschen sichergestellt ist. Gruppe B umfaßt jene Personen, für welche die Wut des beißenden Tieres durch veterinärärztlichen Befund, zumeist durch Einsendung des Sektionsbefundes und auch durch Angaben über den Krankheitsverlauf konstatiert ist. Gruppe C umfaßt solche Personen, bei denen die Wuth der beißenden Tiere wahrscheinlich, aber nicht beglaubigt ist.

**) Ob die Todesfälle, welche nach Bordoni Uffreduzzi Bareggi zu verzeichnen hat, wirklich an Lyssa gestorben sind, läßt sich, da das Tierexperiment versäumt wurde, nicht mit Sicherheit bestimmen.

Die weiteren künftigen Arbeiten zur Verbesserung der PASTEURschen Schutzimpfung sollten, wo jetzt zweifellos feststeht, daß subkutane Injektionen des verdünnten Markes nach PASTEUR überflüssig sind, feststellen, welche Mengen virulenten Virus fixe zur aktiven Immunisierung des Menschen notwendig wären. Die von MARX, BABES, NITSCH entwickelte Vorstellung, daß virulentes Virus fixe für Menschen bereits ein Vaccin darstelle, könnte nach dem Angeführten die richtige sein.

Nach alledem dürften subkutane Injektionen größerer Mengen virulenten Virus fixe die beste Schutzimpfungsmethode ergeben.

Literatur.

Ausführliche Literatur s. HELLER: Die Schutzimpfung gegen Lyssa. G. Fischer, Jena 1906.

BABES, Semaine Médicale 1906, Zeitschr. f. Hyg. 1904.
BECK, Klin. Jahrbuch 1901, 1902.
BUJWID, Österr. Sanitätswesen 1895; Hyg. Rundschau 1895.
CENTANNI, Rif. medica 1892.
FERRAN, Ann. de l'Inst. Pasteur 1888.
GALAVIELLE u. MARTIN, Compt. rend. de Biol. 1902.
GALTIER, Compt. rend. 1888.
GIBIER, Compt. rend. 1884.
HÖGYES, l. c.
KRAUS, KELLER u. CLAIRMONT, l. c.
LEBELL, Centralbl. f. Bakt. 1899.
LÖTHE, v., Centralbl. f. Bakt. 1904.
MARIE, l. c., Soc. Biol. 1903, 1904.
MARX, Deutsche med. Wochenschr. 1899, 1900.
NITSCH, Centralbl. f. Bakt. 1906, Wiener klin. Wochenschr. 1904.
NOCARD u. ROUX, Ann. de l'Inst. Pasteur 1888, 1890.
OSHIDA, Centralbl. f. Bakt. 1901.
PALTAUF, Österr. Sanitätswesen 1896.
PUSCARIU, Ann. de l'Inst. Pasteur 1890, Arch. des sciences méd. 1900.
REMLINGER, Bull. de l'Inst. Pasteur 1904, Compt. rend. soc. biol. 1905, Ann. de l'Inst. Pasteur 1905.
ROUX, Ann. de l' Inst. Pasteur 1887.
SCHÜDER, Zeitschr. f. Hyg. 1903.
VIALA, Ann. de l'Inst. Pasteur (Statistik) 1899, 1900, 1901.

Anhang.

Es seien hier noch einzelne Bestimmungen und Zirkulare, wie sie in der Lyssaanstalt in Wien (Prof. PALTAUF) in Anwendung kommen, angeführt, da sie für den Betrieb einer Schutzimpfungsanstalt von Wichtigkeit sind.

Die über Ermächtigung des hohen K. K. Ministeriums des Innern errichtete Schutzimpfungsanstalt gegen Wut, ist nicht blos den der Impfung bedürftigen Bewohnern von Wien, sondern auch auswärtigen Hilfsbedürftigen zugänglich.

In dieser Anstalt werden von wütenden Tieren gebissene Menschen der Schutzimpfungen gegen Ausbruch der Wut nach der Methode PASTEURS unterzogen. Die Impfbehandlung erstreckt sich auf beiläufig 12—14 Tage.

Die Vornahme der Wutschutzimpfung findet täglich zwischen 10 und 11 Uhr vormittags ambulatorisch, und zwar vorläufig bis zur Feststellung eines Gebührentarifes unentgeltlich statt.

Die zu Impfenden haben sich unter Vorweisung eines besonderen Zertifikates, welches die im folgenden Muster angeführten Daten enthalten soll, am Aufnahmsjournale zu melden.

In den Krankenverpflegsstand selbst, und zwar gegen Zahlung der normalmäßigen Verpflegskosten, können jedoch nur solche Personen aufgenommen werden, deren Bißverletzungen eine Spitalsbehandlung erheischen. Ist dies nicht der Fall, so haben die von auswärts Kommenden für ihre Verpflegung und Unterkunft selbst zu sorgen.

Es ist dringend erwünscht, daß seitens der politischen, Polizei- oder Gemeindebehörden oder von ärztlichen Organen nur solchen Personen der Besuch der Anstalt empfohlen werde, welche von konstatiert „wütenden" oder durch verschiedene Umstände als höchst „wutverdächtig" zu bezeichnenden Tieren gebissen worden sind. Den gebissenen Personen sind diesbezügliche Zertifikate mitzugeben, welche dem beigegebenen Muster entsprechend, Angaben über die Provenienz des Tieres, welches gebissen hat, die Möglichkeit seiner Infektion, die im Leben geäußerten Symptome, die weiteren Schicksale und allenfalls den Obduktionsbefund des Tieres zu enthalten haben, wobei der Gebrauch der Bezeichnung „wutverdächtig" ohne weitere Angabe zu vermeiden ist.

Mit den Tieren, welche Menschen gebissen haben, ist nach den hierüber bestehenden Vorschriften (s. § 35 des Gesetzes vom 28. Februar 1880, R.-G.-Bl. Nr. 35, betreffend die Tilgung ansteckender Tierkrankheiten und die mit der Ministerialverordnung vom 12. April 1880, R.-G.-Bl. Nr. 36, erlassenen Durchführungsbestimmungen hierzu) vorzugehen, nur empfiehlt es sich im Falle, als selbe getötet und der Sektion unterzogen worden sein sollten, den uneröffneten Schädel des Tieres in die Schutzimpfungsanstalt gelangen zu lassen.

Verletzungen, die nur in Abschürfungen der Oberhaut, in leichten Bissen durch dicke Kleider, namentlich Tuchkleider, bestehen, so daß z. B. nur Zahneindrücke zustande gekommen sind, bedürfen der Behandlung in der Anstalt nicht.

Zertifikat

zur Vorweisung in der Schutzimpfungsanstalt gegen Wut (Lyssa) und zur Meldung im Aufnahmsjournale daselbst.

1. Name und Wohnort des Arztes oder Veterinärs, Benennung der Behörde oder des Amtes, des Gemeindevorstehers oder Gendarmerieposten-Kommandos, von welchem dieses Zertifikat ausgestellt wird: ....

2. Genaues Nationale (Vor- und Zuname, Alter, Stand, Zuständigkeit nnd ordentlicher Wohnsitz desjenigen, für welchen dieses Zertifikat ausgestellt wird: ....

3. Genaue Angabe der Zeit, wann die Person gebissen worden ist: ....

4. Genaue Beschreibung des Tieres (Größe, Rasse u. dergl.), welches die Person gebissen hat: ....

5. Angabe, ob die Bißwunde geblutet hat: ....

6. Angabe, was mit der Wunde geschah: ....

7. Name und Adresse des Eigentümers des Tieres: ……………………

……………………

8. Angabe, ob die Untersuchnng des Tieres vor oder nach dessen Verendung oder Tödtung stattgefunden hat und mit welchem Ergebnisse: ……………………

……………………

9. Angabe, was sonst mit dem Tiere geschah: ……………………

……………………

10. Angabe, ob das Tier selbst gebissen wurde, und wie lange vor seiner Erkrankung dies der Fall war: ……………………

11. Angabe, ob das Tier sein Aussehen und sein Verhalten seit der Erkrankung geändert hat: ……………………

12. Angabe, ob das Tier auch andere Tiere gebissen hat und welehe: ……………………

……………………

13. Angabe, ob es auch noch andere Personen gebissen hat und welche: ……………………

……………………

Datum Unterschrift

(Wird dieses Zertifikat von Amtsorganen ausgestellt, ist das Amtssiegel oder Visum der Behörde beizudrücken, der sie zugeteilt sind.)

Krankengeschichte.

Ambulant *Spital* *Monat* ……………………

Zählblatt Nr. ………… *Jahr* ……………………

Name, Alter, Beschäftigung: ……………………

gebissen am …………………… *von* …………………… *in* …………………… *Bezirk* ……………………

vorgestellt am ……………………, *entlassen am* …………………… *Land* ……………………

Sitz und Grad der Bißwunde	*Am Kopfe*	*Am Arm*	*An der Hand*	*An der unteren Extremität*	*Am Stamme*	*Einfache*	*Multiple*	*Nach den Dokumenten, resp. Angaben zu Gruppe*		
								A.	*B.*	*C.*
Leicht										
Mittelschwer										
Schwer										

Die Wunden wurden geätzt mit: ……………………

Der Biß erfolgte durch Kleidungsstücke: ……………………

Der Biß erfolgte an unbedeckten Stellen: ……………………

Befund bei der Aufnahme:

Bemerkungen:

An

Die Überimpfung von dem eingesandten Gehirn eines ……………………
ergab bei den Kaninchen typische Erscheinungen von Wut; dieselben erkrankten ………… Tage nach der Impfung

Es war somit …………………… bestimmt an Wut erkrankt.

Wien, am …………………… 190

Z. *Vertraulich!*

An die

k. k. Bezirkshauptmannschaft

in

Gemäß hohen Erlasses der k. k. n.-ö. Statthalterei, Z. 48821, vom 27. Juli 1894 erlaubt sich der Gefertigte, eine k. k. Bezirkshauptmannschaft zu ersuchen, daß das Schicksal de ....

....

....

welche am .... aus der Behandlung nach Pasteurs Methode (Schutzimpfung gegen Wut) hierorts entlassen worden ...., bis ein Jahr nach erfolgtem Bisse, d. i. bis cc. .... überwacht werden möge, daß ferner, im Falle der Tod .... unter Symptomen des Wutverdachtes oder überhaupt in einer die Möglichkeit einer Wuterkrankung nicht völlig ausschließenden Weise erfolgen sollte, frühzeitig die möglichst rasche, sanitätspolizeiliche Obduktion angeordnet werde und nach dem Ergebnisse, wenn der Verdacht auf Wut bestehen bliebe, sowie wenn eine evidente Wuterkrankung vorläge, die Brücke und das verlängerte Mark mit Teilen des Kleinhirns sowie Stücken des Ammonshorns in konzentriertem Glyzerin verwahrt, an die hierortige Anstalt samt einem Decursus morbi und Obduktionsbefunde von Amtswegen eingesendet werde.

Im Interesse der statistischen Berichte ersucht der Gefertigte jedenfalls um eine kurze Mitteilung über das Befinden de . selben zu Ende des Jahres 190..

Wien, am .... 190......

XX.

Die Methoden der Schutzimpfung gegen Typhus, Darstellung der Impfstoffe.

Resultate beim Menschen.

Von

E. Friedberger

in Königsberg i. Pr.

I. Die älteren Methoden der Schutzimpfung vor den Untersuchungen über das Wesen der Typhusimmunität.

Die ersten Versuche der Typhusschutzimpfung fallen in eine Zeit, da eine Reihe von Forschern, ohne sich eine rechte Vorstellung über das Wesen der Immunität bei dieser Infektion zu machen, auf den Schultern PASTEURS stehend, dessen für Hühnercholera, Milzbrand und andere Infektionskrankheiten ausgearbeitetes Immunisierungsverfahren mehr oder weniger modifiziert auch für Typhus und Cholera zunächst im Tierversuche anwandten. Das erschien umsomehr gerechtfertigt, als ja nach den Erfahrungen Reinfektionen bei diesen Krankheiten spontan ungemein selten sind*).

Die ersten, die in der erwähnten Weise eine Immunisierung gegen Typhus zunächst im Tierexperiment versuchten, waren FRÄNKEL und SIMONDS[36]), SIROTININ[96]), BEUMER und PEIPER[7, 8]).

Sie verfuhren ausnahmslos nach dem Verfahren der Immunisierung mit steigenden Dosen, von stark subletalen beginnend und suchten so einen Schutz gegen sicher letale Impfstoffmengen zu erzielen.

Es genügt, auf diese Versuche, die nur mehr ein historisches Interesse beanspruchen, in aller Kürze einzugehen.

FRÄNKEL und SIMONDS haben zuerst, gestützt auf die zufällige Beobachtung, daß vor längerer Zeit mit nicht letalen Dosen Typhus geimpfte Kaninchen einen Schutz gelegentlich neuer Impfungen zeigten,

---

*) Nach den Beobachtungen CURSCHMANNS[25]) in Hamburg beträgt die Zahl der Rezidive bei Typhus 2,4% (von 1888 Typhuskranken, die im Jahre 1889 in Hamburg zur Beobachtung kamen, waren es 54 Fälle, die zum zweiten Male an Typhus erkrankten. Nach EICHHORSTS[29]) Untersuchungen sind die Zahlen etwas höher, 28 Fälle unter 666 = 4,2%.

derartige Versuche zielbewußt ausgeführt. Sirotinin hat ähnliche Befunde zu verzeichnen gehabt, ohne jedoch bei der Inkonstanz der Resultate mit Sicherheit eine Immunität anzunehmen.

Systematische Versuche in dieser Richtung sind dann weiter von Beumer und Peiper angestellt worden.

Sie immunisierten subkutan mit Bouillonaufschwemmungen zwei- bis dreitägiger Kartoffelkulturen Mäuse und konnten bei geeigneter Vorbehandlung mit kleinen steigenden Dosen in 14 tägigen Intervallen einen sicheren Schutz gegen die letale Bakteriendosis erzielen.

Sie hoffen, die durch ihre „Versuchsreihe gewonnenen Tatsachen für die menschliche Pathologie im Sinne der Schutzimpfung dereinst verwenden zu können" (l. c. 7 p. 136). Sie empfehlen bereits die Prüfung der Frage, „ob sterilisierte Kulturen dieselben Resultate, dieselbe Immunität zu erzielen im stande sind". „Dann stände den vorsichtigsten Versuchen bei Menschen, der Anwendung sterilisierter kleinster, dann stetig größerer Dosen des Typhusgiftes ein begründetes Bedenken wohl nicht mehr entgegen."

Chantemesse und Widal[19]) gelang dann in der Tat auch die Immunisierung von Mäusen mit abgetöteten Typhusbazillen. Später[20]) zeigten die Autoren im Anschluß an die Versuche von Beumer und Peiper, daß man auch Meerschweinchen und Kaninchen, wie dies zuvor auch Brieger, Kitasato und Wassermann[13]) ausgeführt hatten, mit abgetöteten Typhusbakterien immunisieren kann. Sie verwendeten 14 tägige, bei 37° gewachsene Bouillonkulturen, die bei 100° abgetötet und in mehrtägigen Intervallen subkutan in Dosen von 16—20 ccm im Ganzen injiziert wurden.

Einige Versuche mit gleichen Resultaten hat Sanarelli[90]) angestellt. Er benutzte als Impfstoff virulente acht bis zehn Tage alte Bouillonkulturen, die bei 120° abgetötet wurden.

Einen wesentlichen Fortschritt sowohl in der Technik der Immunisierung wie in der Erkenntnis über das Wesen der Immunität stellt sodann die eben erwähnte Arbeit von Brieger, Kitasato und Wassermann[13]) dar. Gestützt auf die kurz zuvor von R. Pfeiffer[74]) veröffentlichten Befunde, wonach die toxischen Eigenschaften der Cholerabakterien direkt als an den Bakterienleib gebunden zu betrachten sind, wiesen die Autoren nach, daß bei Cholera und beim Typhus auch das immunisierende Prinzip in der Bakterienzelle zu suchen sei und daß Bouillonfiltrate nur insofern immunisierend wirken als sie Bakterienleibessubstanzen enthalten.

Die Autoren erstrebten nun weiterhin eine Trennung des toxischen von dem immunisierenden Prinzip, indem sie durch Züchtung in einer besonderen Thymusbouillon, wie sie vorher schon von Wooldridge[83]) benutzt worden war, das Gift der Bakterien unter Erhaltung des immunisierenden Agens zu zerstören suchten.

Bereitung der Thymusbouillon: Fein zerhackte Thymusdrüsen mit gleichen Mengen destillierten Wassers 12 Stunden im Eisschrank gehalten; Kolierung durch ein feines Tuch, Sterilisierung der Flüssigkeit bei 100° 15′ lang. Die Ausfällung des Eiweißes bei dieser Temperatur wird durch Zusatz gleicher Menge Wasser und Soda bis zur schwachen Bläuung von Lackmuspapier verhindert (Wasser und Sodazusatz schwanken etwas bei den verschiedenen Thymusdrüsen). Für Typhus ist dieser Nährboden ohne weiteres verwendbar, für Cholera wird die dreifache Menge von Wasser zugesetzt. Der Impfstoff für Typhus besteht nun aus drei Tage alten 15′ bei 100° er hitzter Thymusbouillonkultur.

Die intraperitoneale Injektion dieses Impfstoffes erwies sich bei Meerschweinchen als fast unschädlich. Die schutzgeimpften Tiere zeigten i. R. nach 10 Tagen, bei besonderer Präparation des Impfstoffes aber bereits am folgenden Tag*) einen Schutz gegen 1,0 virulenter Bouillonkultur, welcher Dosis nicht vorbehandelte Kontrollen unbedingt erlagen. Auch nach weiteren acht Tagen und selbst nach Monaten bestand bei derartig behandelten Tieren Schutz gegen die tödliche Dosis von Bouillonkulturen.

Bei Cholera wurde auch in 80 % Erfolg erzielt bei entsprechender intraperitonealer Vorbehandlung und nachheriger Infektion per os nach dem Kochschen Modus. (Ruhigstellung des Darmes durch Opium und Neutralisation des Magensaftes durch Soda.)

Auch an Kaninchen und Mäusen wurden Versuche mit gleichem Effekt angestellt.

Die Autoren haben dann noch, von der Erwägung ausgehend, „daß in den Bakterienkörpern die Bildungsstätte der Schutzstoffe zu suchen ist", die wirksamen immunisierenden Bakteriensubstanzen zu isolieren versucht.

Methode: Alte Typhusbouillonkultur wird im Vakuum bei 37° eingeengt; Fällung mit absolutem Alkohol; Stehenlassung unter Alkohol („einige Zeit"); Trocknen des Niederschlags im Exsikkator; Lösung in Wasser, nochmalige Alkoholfällung; Trocknung des Niederschlags. Man erhält ein weißes in Wasser lösliches Pulver, das zwar stark toxisch wirkt, aber bei geeigneter Dosierung zur Immunisierung mit Erfolg verwendet werden kann.

Eine Modifikation besteht in der Fällung von bei 80° eingedampfter Typhusbouillon mit Alkohol. Der Niederschlag wird abgehoben, in Wasser gelöst und in Dosen von 0,02 zur Immunisierung von Meerschweinchen benutzt. Nach den Angaben von Chantemesse und Widal ist jedoch diese Methode der Immunisierung wenig zuverlässig.

Bruschettini[16]) gelang es im Anschluß an die Versuche von Brieger, Kitasato, Wassermann, Chantemesse und Widal gleichfalls Kaninchen durch subkutane Vorbehandlung mit kleinen Dosen lebender, ferner durch 60° abgetöteter und auch 8—20 Tage alter Kulturen gegen die tödliche Dosis Typhus zu schützen. Die Sera haben nach seinen Versuchen sowohl „bakterizide" wie „antitoxische" Eigenschaften.

II. Methoden der Schutzimpfung, die eine auf Bakterizidie beruhende Immunität erstrebten.

Einleitung. Die Art der Immunität bei Typhus und die Prinzipien der Wertbestimmung des Serums.

Alle diese vorbesprochenen Tierversuche waren doch noch zu unvollkommen und unsicher, um eine Anwendung der Methode in der Praxis für den Menschen zu gestatten, zumal eine Wertbestimmungsverfahren für die Veränderungen der Sera nach erfolgter Impfung noch in keiner Weise bestand. Das wurde erst ermöglicht durch die Arbeiten

*) Dieser schnell eintretende Schutz ist wohl auf nicht spezifische Resistenz R. Pfeiffer-Isaefe[49]) [78]) [79]) zurückzuführen.

von Pfeiffer und Wassermann[75]), Pfeiffer[76]), Pfeiffer-Kolle[80]), Pfeiffer-Isaeff[79]), die das Wesen der Immunität bei Cholera und Typhus aufgedeckt haben.

Zunächst entsprach es freilich nur dem Analogiebedürfnis, nach der Entdeckung des Diphterie- und Tetanusantitoxins durch Behring und seine Mitarbeiter, auch beim Typhus die Wirkung ähnlicher Stoffe anzunehmen. So vermuteten Brieger, Kitasato und Wassermann, obwohl sie richtig erkannten, daß das Gift des Typhusbakteriums an die Leibessubstanzen der Bakterien gebunden sei, daß die schützende Wirkung bei aktiv immunisierten oder übertragen immunisierten Tieren auf dem Gehalt des Serums an Antitoxin beruhe. R. Stern[99]) hat dann auch im Typhusrekonvaleszenten-Serum Antitoxin nachzuweisen versucht. Er injizierte Meerschweinchen Serum zusammen mit „Typhusgift" (bei 100° abgetötete Agarkulturmasse). Eine deutliche antitoxische Wirkung tritt bei seinen Seris im Vergleich mit dem Normal-Menschenserum nicht zutage.

Auch im Serum der künstlich gegen Typhus immunisierten Tiere ließ sich Antitoxin nicht nachweisen. Die diesbezüglichen Befunde vermögen gleichfalls der Kritik nicht standzuhalten.

Bitter[9]) arbeitete mit einem „Typhusgift", das er sich folgendermaßen bereitete: 14tägige Typhus-Glyzerin-Bouillonkulturen werden im Vakuum auf $^1/_{10}$ Volumen eingedampft, durch Kieselgur filtriert. Bei einem mit einem solchen Gifte behandelten Tiere glaubte er im Serum Antitoxin nachweisen zu können.

Beumer und Peiper[7]) ist es nicht gelungen, im Serum eines mit „Typhusgiff" (Bouillonkultur bei 55—60° abgetötet) behandelten Hammels sicheres Antitoxin gegen das Gift zu finden.

Pfeiffer konnte dann in Gemeinschaft mit seinen Mitarbeitern zeigen, daß die Immunität bei der Cholera- und Typhusinfektion keine antitoxische im Sinne von Behring ist. Er erkannte, daß der Charakter der Immunität auf dem Gehalt des Serums an bakteriolytischen Antikörpern beruhe. In den oben zitierten Arbeiten wurde nachgewiesen, daß im Blutserum der Typhus- und Cholerarekonvaleszenten und ebenso bei künstlich gegen diese Krankheitserreger immunisierten Tieren keine antitoxischen, sondern nur die bakteriolytischen Schutzstoffe zu finden seien.

Nachdem durch diese Untersuchungen die Existenz löslicher Cholera- und Typhusgifte nach Art der echten Toxine (Diphtherie, Tetanus) endgültig ausgeschlossen schien*) und dementsprechend auch die Existenz von Antitoxin im Serum von Rekonvaleszenten und schutzgeimpften Tieren, bezwecken die Immunisierungsversuche bei Menschen, bis in die neueste Zeit hinein nur die Erzeugung bakteriolytischer Sera.

Durch die Ausarbeitung einer genauen Wertbestimmungsmethode für bakteriolytische Sera durch Pfeiffer, war die Möglichkeit gegeben, den Erfolg einer Schutzimpfung mittels des Blutserums des Geimpften zahlenmäßig auszuwerten und damit war eigentlich erst die wissenschaftliche Grundlage für die erfolgreiche Schutzimpfung des Menschen geschaffen. Bei der Bewertung der Impfstoffe für den Menschen, welche wir jetzt besprechen wollen, ist im wesentlichen neben dem Bestreben, möglichst geringe Reaktion des Organismus auszulösen, auch stets die Überlegung ausschlaggebend gewesen, ein Serum mit möglichst hohem bakteriolytischem Titer zu erhalten.

---

*) Die neueren Arbeiten über Cholera und Typhusgifte und Antitoxine sind in besonderen Kapiteln behandelt (s. Kraus, v. Stenitzer, Bd. I, und Bd. II).

Obwohl das Serum eines Typhusrekonvaleszenten in der Regel und das Serum künstlich immunisierter Menschen und Tiere stets einen hohen bakteriolytischen Titer hat, während dem Normalserum nur eine minimale schützende Kraft zukommt, so hat man doch von manchen Seiten die Steigerung der bakteriolytischen Serumkraft gegen die Norm nicht als unbedingten Beweis der Immunität ansehen wollen. Namentlich Beobachtungen eines erneuten Ausbruches des Typhus während der Rekonvaleszenz bei ausgesprochener bakteriolytischer Qualität des Serums schienen dagegen zu sprechen (Jürgens[51]). Derartige vereinzelte Beobachtungen laßen sich jedoch, worauf Friedberger[40]) hingewiesen hat, durch die Annahme einer Reinfektion mit einem serumfesten Stamm erklären und vermögen nicht die Bedeutung der Bakterizidie im allgemeinen zu erschüttern.

Wenn wir sehen, daß Tiere, die nach brauchbaren Methoden aktiv gegen Typhus und Cholera immunisiert sind, regelmäßig bei künstlicher Nachinfektion geschützt sind, und daß die Reinfektion beim Menschen innerhalb begrenzter Zeitabschnitte zu den größten Seltenheiten gehört, wenn wir andererseits sehen, daß bei allen diesen Individuen der bakteriolytische Titer eine hohe Steigerung gegen die Norm erfahren hat, so dürfen wir wohl den Serumtiter als Maßstab für die Immunisierung benützen.

Ohne hier auf die Frage eingehen zu wollen, ob die Immunität gegen Thyphus und Cholera ausschließlich auf dem erhöhten bakteriolytischem Vermögen der Körpersäfte beruht, müssen wir wohl doch den Schluß ziehen, daß der aktive Schutz ein umso höherer ist, je stärkere schützende Wirkung dem Serum bei der passiven Übertragung im Infektionsversuch am Tier, resp. im Plattenversuch zukommt.

Wir haben also im bakteriziden Titer in der Tat einen Maßstab zur Beurteilung des immunisierenden Verfahrens und zur Bewertung des erreichten Schutzes. Natürlich muß die Auswertung der bakteriolytischen Kraft eines Serums gegenüber einem geeigneten, d. h. virulenten Stamm erfolgen. Dann geben wenigstens für Cholera bei der Einheitlichkeit des Rezeptorenapparates dieser Bakteriengruppe*) die gefundenen Werte wohl den absoluten Maßstab zur Beurteilung des Serums.

Bei der Verschiedenheit des Rezeptorenapparates verschiedener Typhusrassen, wie sie zuerst durch Friedberger[37]) aufgedeckt und durch Friedberger und Morreschi[43]), sowie im Anschluß daran durch Besserer und Jaffe[6]) näher untersucht wurde, gibt der Titer gegenüber einem virulenten Typhusstamm noch keinen absoluten Maßstab für die Bewertung eines Serums. Nach Friedberger[40]) ist neben der Titerhöhe auch eine Titerbreite (Polyvalenz gegenüber verschiedenartigen Typhusstämmen) für die Bewertung der Immunität in Betracht zu ziehen. Friedberger und Moreschi fanden z. B., daß zwei Sera gegenüber ein und demselben Typhusstamm den gleichen bakteriziden Titer besaßen, aber das eine von den beiden, das durch mehrmalige Immunisierung erzeugt war, hatte zugleich eine höhere schützende Kraft gegenüber einem abnorm serumfesten Stamm. Die Immunisierung war also in letzterem Falle eine zuverlässigere, obwohl das bei der gewöhnlichen Titerbestimmung mit nur einem virulenten Stamm nicht zum Ausdrucke kam.

---

*) Von den Eltorstämmen, über deren Stellung noch Meinungsverschiedenheiten (Gottschlich, Kraus[56]), Kolle und Meinecke[53])) bestehen, sei hier zunächst abgesehen.

Der gleichzeitige Gehalt eines Serums an Agglutininen wird für die Auswertung der Sera im allgemeinen weniger in Betracht gezogen, da ja nach den Untersuchungen zahlreicher Autoren beide Eigenschaften eines Immunserums voneinander unabhängig sind und keineswegs immer parallel gehen.

So erschöpfend die Bedeutung der Agglutinine für die Diagnostik abgehandelt ist, so fehlen merkwürdigerweise noch ganz Untersuchungen, über die Bedeutung des Agglutinationstiters für den Schutzwert eines Serums. Wir wissen noch nicht, ob ein schutzgeimpftes Individuum, das neben einem hohen Titer zugleich einen hohen Agglutinationswert aufweist, nun besser oder weniger gut geschützt ist als dann, wenn mit gleichem bakteriolytischen Wert ein verminderter Gehalt des Serums an Agglutinin verknüpft ist.

Nach neueren Untersuchungen von Kraus[54]), Löffler[59]) und Wassermann und Citron[104]) scheint auch einer lokalen Immunität für den Schutz unabhängig vom Titer eine gewisse Bedeutung zuzukommen. Speziell für die hier in Betracht kommenden Infektionen, Cholera und Typhus liegen aber Untersuchungen in dieser Richtung noch nicht vor. Es dürfte auch bei der Unmöglichkeit, wegen der Unempfänglichkeit von Tieren (vielleicht mit Ausnahme der anthropoiden Affen) gegenüber diesen Infektionen das Tierexperiment heranzuziehen, kaum jemals gerade bei diesen Krankheiten eine Lösung herbeigeführt werden.

Es wäre daher von größtem Werte, zu untersuchen, inwieweit beim Tier vermittels eines Erregers, der eine echte Darminfektion auslöst, durch Vorbehandlung mit abgetötetem Material auf dem Wege des Verdauungstraktus sich eine „lokale“ Immunität erzielen ließe, die einen sicheren Schutz gegen nachherige Infektion mit vollvirulentem Material gestattet, ohne daß doch eine nennenswerte Steigerung der spezifischen Qualitäten des Blutserums einzutreten braucht. Diese ist nach Friedbergers[39]) Tierversuchen bei Verfütterung von Typhus- und Cholerabakterien und nach Versuchen von Wright[107]), Brieger und Meyer[12, 14]) am Menschen (Typhus), wenn sie überhaupt eintritt, nur minimal. Daß eine gewisse lokale Immunität vom Darm aus, wenigstens gegenüber chemischen Giften, in der Tat möglich ist, dafür sprechen Untersuchungen, die Cloetta[21]) angestellt hat. Es gelang ihm, durch Verfütterung von Arsenik per os Hunde und Kaninchen an Dosen zu gewöhnen, welche beim Kontrolltier unbedingt toxisch wirken; doch waren diese Tiere gegenüber der subkutanen Darreichung des Giftes genau so empfindlich wie die Kontrollen.

Wenn auch bei Typhus und Cholera eine lokale Immunität des Darmtraktus in diesem Sinne sich erzeugen ließe, so wäre ein Verfahren hierfür in Verbindung mit der seither üblichen allgemeinen Immunisierung besonders geeignet, gerade bei Typhus entsprechend dem Charakter dieser Infektion Erfolge zu zeitigen.

Nachdem wir über brauchbare Methoden verfügen, um eine allgemeine aktive Immunität gegen Typhus und Cholera hervor zu rufen, muß allerdings unser Bestreben nunmehr darauf gerichtet sein, durch Ausbildung lokaler Immunität den Effekt der allgemeinen zu verstärken und zu stützen. Solange aber ein solches Verfahren nicht experimentell erprobt ist, sind wir auf die alleinige allgemeine Immunisierung angewiesen und es bleibt hier als wesentlicher Indikator für den eingetretenen Erfolg der Impfung die Wertbestimmung des Serums.

Zur endgültigen Beurteilung der angewendeten Methode als solcher und des Wertes der Schutzimpfung überhaupt müssen wir allerdings als

letzten und schließlich ausschlaggebenden Faktor den praktischen Erfolg, der in der Statistik zum Ausdruck kommt, betrachten. Es handelt sich darum, festzustellen, inwieweit bei einer und derselben Immunisierungsmethode und bei Vergleich verschiedener Immunisierungsmethoden unter denselben Infektionsbedingungen geimpfte und nicht geimpfte sich verhalten bezüglich der Mortalität, Morbidität und Letalität.

Die Schutzimpfung gegen Typhus wurde im wesentlichen an einem sehr gleichartigen Menschenmaterial ausgeführt, nämlich an Truppenbestandteilen der englischen Kolonialarmee und in jüngster Zeit an Soldaten des deutschen Heeres, die zur Bekämpfung des Aufstandes nach Afrika entsendet wurden.

Aber doch bietet die Unmöglichkeit alle äußeren Verhältnisse und vor allem die natürlichen Bedingungen für die Infektion richtig abzuschätzen, bei einer Bewertung des Zahlenmaterials gewisse Schwierigkeiten und beeinträchtigt die Bedeutung derartiger Zahlen wie überhaupt der meisten medizinischen Statistiken.

Da die Impfungen, speziell der deutschen Soldaten, auch mit der späteren Periode des Feldzuges zusammenfielen, also mit einer Zeit, in der man den hohen Wert anderweitiger prophylaktischer Maßnahmen und die Gefahr der Infektion besser würdigte, so kann ein Teil des guten Erfolges auch auf das Konto dieses Momentes gesetzt werden.

Derartige Betrachtungen sollten keineswegs die Bedeutung der Schutzimpfung herabsetzen, sie sollen nur zeigen, wie sehr doch Vorsicht in der Beurteilung von derartigen Statistiken geboten ist.

Aus diesen Erwägungen heraus hat man mit Recht stets bei der Ausarbeitung eines Immunisierungsverfahrens auf die spezifischen Veränderungen des Blutserums und ihre Bestimmung den größten Wert gelegt und sie als Grundlage zur Rechtfertigurg der Einführung einer Methode in die Praxis betrachtet.

Diese allgemeinen Darlegungen gelten sowohl für die Immunität bei Typhus wie bei Cholera. Wenn wir hier im übrigen die Darstellung der Impfstoffe für Typhus und Cholera getrennt besprechen, so geschieht dies der Übersichtlichkeit halber, wenn auch bei dem offenbar gleichen Charakter der beiden Infektionen und vor allem der Natur der Immunität sachlich eine derartige Trennung nicht ohne weiteres erforderlich scheint.

Spezielle Methoden der aktiven Immunisierung gegen Typhus.

1. Nach Pfeiffer und Kolle[81]).

Nachdem Peeiffer und Kolle die Natur der Immunität beim Typhusrekonvaleszenten aufgedeckt und die Beobachtung erhoben hatten, daß die Veränderungen im Organismus derartiger Individuen identisch sind mit jenen, wie sie künstlich mit Bakterien immunisierte Tiere zeigen, lag es nahe, den bei diesen erzeugbaren Impfschutz auch beim Menschen durch künstliche aktive Immunisierung hervorzurufen. Diesen Weg haben zuerst Pfeiffer und Kolle beschritten, indem sie zunächst zwei Individuen, die sich hierzu freiwillig erboten, mit von ihnen bereitetem Impfstoff behandelten*).

*) Einige Wochen vorher berichtet Wright[108]) allerdings über die Injizierung von abgetöteten Typhusbazillen bei zwei Offizieren der indischen Armee. Die Versuche waren gelegentlich von Untersuchungen über den Einfluß von Calciumchlorid auf die Gerinnungsähigfkeit des Blutes angestellt worden und es ist aus der Arbeit nicht zu ersehen, daß es sich um Schutzimpfungen handelt, speziell über eine Titrierung der Sera ist nichts mitgeteilt.

Darstellung des Impfstoffes: Aufschwemmung von Agarkulturmasse in Bouillon und Sterilisierung bei 56°. Dosis 2 mg = $^1/_{10}$ Agarkultur in 1 ccm Bouillon aufgeschwemmt.

Injektion subkutan am Rücken. Reaktion: Drei Stunden nach der Injizierung tritt Frostgefühl auf, Schwindel und lebhafte Schmerzen an der Injektionsstelle; die Temperatur erreicht ein Maximum von 38,5°; Fieberdauer ca. 24 Stunden.

Schutzstoffbildung: Am 11. Tage nach der Injektion betrug der Titer bei einem Geimpften 0,007 gegen $>$ 0,5 normal, beim anderen 0,01 gegen 0,5 normal (Auswertung nach der Pfeifferschen Methode im Meerschweinchenversuch). Pfeiffer und Marx[82]) haben dann noch Versuche mit einem mit $^1/_2$% Phenol zwei Monate aufbewahrten, dem Pfeiffer-Kolleschen analogen Impfstoff angestellt und gefunden, daß ein derartiges Präparat sowohl gegenüber den Kaninchen wie den Menschen seine antigene Eigenschaft vollkommen bewahrt hat.

Die später mit der Methode Peiffer-Kolle gesammelten praktischen Erfahrungen und Erfolge sind weiter unten ausführlich behandelt.

2. Methode der aktiven Immunisierung gegen Typhus nach Wright[107—117]).

Die Methode der aktiven Immunisierung des Menschen mit abgetöteten Typhusbakterien wurde dann des weiteren erprobt und in den verschiedensten Richtungen modifiziert durch Wright und seine Mitarbeiter.

Seine zahlreichen wertvollen Erfahrungen hat Wright in einem auch ins Deutsche übersetzten Werke: „Kurze Abhandlung über Anti-Typhusinokulationen“[107]) niedergelegt.

Schon bald nach Pfeiffer und Kolle konnten Wright und Semple[117]) über eine große Reihe von Impfungen Mitteilung machen. Seitdem sind von Wright und seinen Mitarbeitern in der englischen Kolonialarmee praktische Versuche in ausgedehntestem Maße angestellt worden und seine Methode hat sich bei über 100000 Impfungen, die er im wesentlichen an englischen Soldaten ausgeführt hat, auf das Beste bewährt. Es ist nicht ein einziger unglücklicher Zwischenfall mit tödlichem Ausgang zu verzeichnen gewesen. Trotzdem hat es, wohl wegen der starken Reaktion, die die Impfung bei empfindlichen Individuen ausübt, an Anfeindungen nicht gefehlt und so wurden auf Grund eines Gutachtens, das nach der Beendigung des südafrikanischen Krieges der zur Beratung des Kriegsministeriums geschaffene Adversary Board abgab, die Impfungen sistiert. Ein von dem Royal College of Physician ernanntes Komitee hat sich daraufhin in äußerst vorteilhaftem Sinne über die Impfung ausgesprochen, da dem Verfahren ein günstiger Einfluß auf Morbidität und Letalität zweifellos zukomme. Das Verfahren sei außerdem bei Anwendung der nötigen Vorsichtsmaßregeln absolut gefahrlos und nur im unmittelbaren Anschluß an die Impfung bestehe bei einzelnen Personen eine gesteigerte Empfindlichkeit und Infektionsempfänglichkeit.

Auf diese Momente hat jedoch Wright[114]) selbst stets aufmerksam gemacht. Er bezeichnet dieses Stadium der erhöhten Empfindlichkeit im unmittelbaren Anschluß an die Impfung als negative Phase (näheres über die negative Phase siehe pag. 735 ff.). Da das Adversary Board dieses Gutachten des Royal College of Physician, nicht anerkannte, wurde ein neues Sachverständigenkomitee eingesetzt, dessen günstigem Urteil die Wiederaufnahme der Impfung in der englischen Armee zuzuschreiben ist.

Auf Anregung von Pfeiffer und gestützt auf dessen Erfahrungen über die Erhaltung der Antigene bei 60° verwendet auch Wright als Impfstoff ausschließlich bei 60° abgetötete Bouillonkulturen, deren immunisierender Effekt auch nach seinen Untersuchungen dem der lebenden Bakterien gleichkommt. Er benutzt jedoch nicht Agarkulturaufschwemmungen, sondern Bouillonkulturen.

Wright hat die Methoden der Impfstoffdarstellung, Dosierung und Standardisierung aufs Sorgfältigste ausgearbeitet.

Methode der Darstellung des Impfstoffes.

Ursprünglich verwendete Wright 10—21 Tage alte 37°-Bouillonkulturen, die nachher sterilisiert und karbolisiert wurden. Die Schwierigkeiten, die derartige Kulturen für die Standardisierung nach Wright-Leishmann[116]) (s. u.) boten, und andere Erwägungen veranlaßten ihn, jetzt ausschließlich 24—48 Stunden alte Kulturen zu benutzen.

Die Kulturen sollen durch mehrere Meerschweinchenpassagen eine gewisse Virulenz erreicht haben, weil nach seiner Meinung bei Typhuskulturen die Virulenz und „Giftproduktion" in der Nährbouillon parallel gehen. Außerdem stellt er neuerdings an die Kulturen die Anforderung, daß sie eine erprobte Wachstumsenergie haben, derart, daß innerhalb 24 Stunden bei optimalem Wachstum 1000—2000 Millionen Bazillen pro ccm der Bouillonkultur resultieren.

Nach Harrisons Untersuchungen ist die Virulenz der Kultur ohne Bedeutung für die Güte des Impfstoffes; er legt Wert darauf, daß die Abtötung bei einer möglichst milden Temperatur 52° (Grenztemperatur) erfolgt, da eine Temperaturvon 65° bereits eine erhebliche Schädigung des Impfstoffes bedingen soll.

Fig. 1. Kultivierungsflasche nach Wright.

Fig. 2. Zwei Mischgefäße miteinander verbunden nach Wright.

Als Nährboden verwendet Wright 1% Peptonbouillon, genau neutralisiert und in besonderen Kolben (Fig. 1)*) in nicht zu hoher Schicht eingebracht.

*) Fig. 1 bis 4 sind mit Genehmigung des Verfassers dem Werk von Wright entnommen.

Die Impfung dieser Kolben geschieht mittels Reinkulturaufschwemmung aus einer Spritze, deren Kanüle in die vorher durch einen glühenden Glasstab sterilisierte Wand des an dem Kolben befindlichen mit Quetschhahn und Glasstab verschlossenen Schlauches *S* eingestochen wird. Die Stichwunde kann durch einen Tropfen Gummilösung geschlossen werden. Die Vorteile dieser Flaschen sieht Wright in der Möglichkeit bequemer und sicherer Impfung, der Möglichkeit geringe Mengen der Kultur zur Prüfung ohne Gefahr der Verunreinigung entnehmen zu können, endlich in der Möglichkeit einer sicheren Überführung des Inhaltes in Mischgefäße.

Der Inhalt mehrerer Kulturflaschen wird nämlich nach Prüfung auf Reinheit zur Bereitung des Impfstoffes im Großen in einem Mischgefäß (Fig. 2) gesammelt. Diese Mischgefäße sind mit Gummipfropfen geschlossen, in deren Durchbohrung ein mit Wattepfropfen versehenes gebogenes Glasrohr steckt. Das Ganze ist mit Paraffin abzudichten. In ihrem unteren Teile haben die Flaschen drei Ansatzrohre mit Gummischlauch und Quetschhahn; das Ende des Gummischlauches ist durch sterilen Glasstab verschlossen.

Zur Überführung der Bouillonkulturen aus dem Züchtungskolben in das Mischgefäß wird aus den Gummischläuchen beider Gefäße der Glasstab unter aseptischen Kautelen herausgenommen und die vorher sterilisierten Enden der beiderseitigen Gummischläuche werden durch ein steriles Glasrohr verbunden. Nach Öffnung der beiderseitigen Quetschhähne läßt man die Flüssigkeit in das Mischgefäß überlaufen. Auf diese Weise wird jede Verunreinigung vermieden. Bei Abnahme der entleerten Kulturflaschen ist ein Ausfluß von Resten der Typhuskultur zu vermeiden.

Die Mischflasche wird nun unverzüglich in ein Wasserbad gebracht, in dem sie allseitig bis zum Hals mit Wasser bedeckt ist (eventuell Beschweren durch einen um den Hals gelegten Bleiring); vor und während des Einstellens in das Wasserbad ist jedes Aufschütteln der Flüssigkeit zu vermeiden, damit nicht Verspritzungen der Bakterienemulsion in dünnen Schichten in dem Oberteile der Flasche an der Glaswand entstehen, die antrocknen, wodurch die Bakterien der sicheren Abtötung entgehen könnten.

Sobald die Temperatur in der Kulturflüssigkeit 60° erreicht hat, wird die Flamme des Wasserbades abgedreht und das Gefäß mit dem Impfstoff bleibt noch 10—15′ im heißen Wasser stehen. Die Temperaturbemessung in der Flasche geschieht mittels eines besonders konstruierten Paraffinthermometers (Fig. 3 u. 4). Das Paraffinthermometer besteht aus einer leeren Glaskugel (*B*), die nach oben in ein kürzeres (*A*) nach unten in ein längeres in der Mitte noch spindelförmig erweitertes offenes Glasrohr (*C*) ausgezogen ist. Die untere Röhre ist mit Paraffin S. P. 60 gefüllt. Durch diese Belastung im unteren Teil steht der ganze Apparat in der Kulturflüssigkeit nach Art eines Schwimmers.

Das Prinzip dieses Thermometers beruht nun darauf, daß bei der Temperatur von 60° das schmelzende Paraffin die Tendenz hat, nach oben zu steigen, was aber wegen der spindelförmigen Gestalt der unteren Kugelverlängerang erst möglich ist, wenn es ganz verflüssigt ist. Infolge des nun erfolgenden Zutrittes des Paraffins in die obere Kugel tritt zugleich Flüssigkeit in das Thermometer ein und es sinkt zu Boden. Das Prinzip dieses Paraffinthermometers verbot eine Sterilisation in situ, da dabei ja das Paraffin bereits ausgelaufen wäre. Dies wurde jedoch verhütet, sobald man das untere Ende des Glasbehälters nach Einfüllen des Paraffins abschmolz. Es war alsdann wieder eine Einrichtung notwendig, um unter Vermeidung einer Infektion des Mischgefäßes das abgeschmol-

zene Ende des Schwimmers abzubrechen, wodurch ja allein das Funktionieren des Apparates gewährleistet war.

Das geschieht dadurch, daß beim Herrichten des Mischbehälters um den unteren Thermometerteil eine aus dünnem Messingdraht *(H)* angefertigte Schlinge *(D)* gelegt wird, die durch den oberen Tubus nach außen geführt ist. An dieser Schlinge wird das Thermometer so weit herabgezogen, bis es dem oberen Tubus gegenüber steht; das äußere Ende des Drahtes *(H)* wird im Tubusschlauch durch ein Glasstäbchen *(J)* festgeklemmt (s. auch Fig. 4, Querschnitt).

Hat nach erfolgter Sterilisierung dieser so armierten Mischflasche die Füllung begonnen, so wird, noch ehe das Flüssigkeitniveau die Drahtschlinge erreicht hat, diese herausgezogen und damit das zugeschmolzene Ende des Thermometers abgebrochen. Nunmehr steigt der Schwimmer mit dem Flüssigkeitsniveau und sinkt nach Schmelzen des Paraffins und erfolgter Füllung, sobald die Temperatur von 60° erreicht ist. LEISHMANN[56]) umgeht die Verwendung des komplizierten Paraffinthermometers einfach dadurch, daß er in das Wasserbad neben der Flasche mit dem

Fig. 3. Paraffinthermometer des Mischgefäßes (nach WRIGHT) in situ an der Innenwand.

Fig. 4. Querschnitt des Mischgefäßes mit Paraffinthermometer (nach WRIGHT).

Impfstoff eine zweite offene, mit Wasser gefüllte Flasche setzt, in die ein Thermometer hineinragt. Die Temperatur des Inhalts dieser Flasche entspricht dann der im Kulturgefäße.

Um ein einheitliches Material für die Impfung zu gewinnen, wird der Inhalt der gesamten Mischgefäße vereinigt. Ähnlich wie vorher Kulturflasche und Mischflasche werden nunmehr die einzelnen Mischflaschen miteinander durch längere Schläuche verbunden (Fig. 2) und der Inhalt durch Höherstellen je einer Flasche in die tiefer stehende übergeleitet eventuell unter Einfügung einer weiteren leeren sterilen Mischflasche in die Batterie.

Nachdem so ein einheitliches Material gewonnen ist, erfolgt die Probeentnahme:

1. Zur Prüfung auf Sterilität; sie geschieht durch Aussaat reichlicher Mengen des Impfstoffes auf Agar und in Bouillon.

2. Zur Standardisierung des Impfstoffes.

Unter Standardisierung versteht Wright „die Bestimmung der Stärke des Impfstoffes im Verhältnis zu einem anderen Vaccin, dessen Dosis durch Versuche am Menschen festgesetzt worden ist".

Standardisierungsmethoden.

1. Die älteste in Gemeinschaft mit Semple ausgearbeitete Methode bestimmte die Dosis letalis lebender Agarkultur für 100 g Meerschweinchen. Danach wurde entsprechend die Dosis des Bouillonimpfstoffes für den Menschen geregelt.

2, Die in den meisten Fällen angewandte Standardisierungsmethode war eine doppelte; es wurde jedesmal die Konzentration und Toxizität des Impfstoffes geprüft.

Prüfung der Giftigkeit[116]).

Die Giftigkeitsbestimmung des Impfstoffes wurde mit der abgetöteten und mit Phenol versetzten Aufschwemmung vorgenommen. Die geringe Phenolmenge (0,5 $^0/_0$) ist ohne Einfluß bei der Messung der Giftigkeit. Wegen der individuellen Schwankungen der Meerschweinchen gegenüber dem Gift wurden stets zwei Versuchsserien mit Tieren von 250—300 g angestellt. Die Tiere erhielten subkutan 0,5, 0,75, 1,0 1,5 des Impfstoffes. Der Tod trat nach 12 Stunden bis 3 Tagen ein.

Sektionsbefund: Infiltration der Impfstelle, Schwellung der Nebennieren; geringe Hyperämie und Vergrößerung der Milz, desgleichen der Peyerschen Plaques; geringe Exsudation in Pericard, Pleura und Peritonealhöhle, häufig kleine Lungenhämorrhagien.

Die tödliche Dosis für 100 g Meerschweinchen stellt die Impfdosis für den Menschen dar, Sie schwankt bei den einzelnen Giften zwischen 0,5—2,0 ccm. Bei schwächeren Impfstoffen kann man durch Dekantieren und Abgießen der oben stehenden Flüssigkeit ein stärker wirkendes Präparat erhalten. Die starken individuellen Schwankungen der Versuchstiere gegenüber dem Typhusgifte lassen die Methode als nicht genügend zuverlässig erscheinen und Wright hat deshalb in Gemeinschaft mit Leishmann zugleich eine rein physikalische Bestimmungsmethode ausgearbeitet.

Methode von Wright-Leishmann[116]) zur Prüfung der Konzentration des Impfstoffes.

Man stellt sich ein System von hellen und dunklen Linien dar, indem man auf einem Objektträger in Entfernung von 0,5 cm 2 gleich breite Streifen schwarzen Papiers aufklebt. (Fig. 5.)

Von diesem am Fenster aufzustellenden Objektträger *F* wird aus der Entfernung von 1,5 m ein Bild auf einem Planspiegel *D* eines von allen Linsen befreiten Mikroskopes, das nur am unteren Objektivende eine aufgekittete Glasplatte (*B*) trägt, geworfen und durch den Tubus hindurch beobachtet. Über dem Diaphragma des Objektivtisches steht in einem Gefäß (*E*), dessen Boden (*C*) aus Glas besteht, der zu prüfende Impfstoff. Es gilt, die minimalste Schicht dieses Impfstoffes ausfindig zu machen, durch

die gerade das Liniensystem F bei Beobachtung durch den Tubus hindurch verschwindet. Man macht diese Einstellung des Mikroskopes, mißt mittels eines Maßstabes die Entfernung des oberen Tubusendes (A) von der Oberfläche des Objekttisches und schraubt nun den Tubus herab, bis sich Frontglas des Objektivs und die Innenfläche des Glasbodens des Impfstoffgefäßes berühren. Abermalige Messung der Entfernung Objekttisch — Tubusöffnung. Die Differenz gibt die gesuchte Dicke der Impfstoffschicht. Die Schichtdicke soll etwa 1 cm betragen bei einem Impfstoff von geeigneter Konzentration. Wright hebt selbst hervor, daß autolytische Vorgänge namentlich in älteren Kulturen die Durchsichtigkeit des Impfstoffes in unkontrollierbarer Weise verändern und das daher die Methode ungenau ist.

Zählmethode von Wright.

Das jetzt von Wright[110]) benutzte Verfahren besteht in einer direkten Zählung der Bakterien einer 24 Stunden alten Bouillonkultur mit Hilfe des Mikroskopes nach eine im Prinzip außerordentlieh sinnreichen, in praxi aber nicht fehlerfreien Methode.

Fig. 5. Apparat zur Standardisierung von Bakterienvaccins nach Wright-Leishmann.

Prinzip der Methode: Wright geht von der Überlegung aus, daß in einem gefärbten Ausstrichpräparat, das hergestellt ist aus einer Mischung bestimmter Volumina normalen Blutes und einer Bakterienaufschemmung (z. B. Bouillonkultur), die Formelemente (Blutkörper und Bakterien) in gleichem Verhältnisse vorhanden sein müssen wie in den Volumeinheiten. Das Präparat gestattet uns, durch Zählung direkt die Menge der Erythrocyten und Bakterien in einer Mischung beliebiger Volumina von Blut und Bakterienaufschwemmung durch Auszählung eines aliquoten Teiles (mehrere Gesichtsfelder des Mikroskopes) zu ermitteln; die Zahl der Erythrocyten in der Volumeneinheit ist als konstant anzunehmen und bekannt und daraus läßt sich leicht x = die Zahl der Bakterien ermitteln.

Zahl der Erythrocyten im Präparat: Zahl der Bakterien im Präparat = 500 000 000 000 : x.

Ausführung: Eine ungeaichte Glaskapillare, die man sich durch Ausziehen eines Glasrohres über der Flamme hergestellt, wird mit Gummisauger armiert und bis zu einer mit Fettstift bezeichneten Marke, mittels des Gummisaugers mit Blut gefüllt. Darauf folgt, durch eine kleine Luftblase getrennt, ein gleiches Volumen der zu zählenden Bakteriensuspension und schließlich drei Volumina Kochsalzlösung. Bei weniger dichten Bakteriensuspensionen kann man auch die Kochsalzvolumina ganz oder zum Teil durch Bakterienvolumina ersetzen, und dies bei der

Berechnung entsprechend berücksichtigen (Division); doch sind stets fünf Volumina in toto zu nehmen.

Der Inhalt der Tube wird auf einen Objektivträger aufgetragen und durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausspritzen gut gemischt. Ein Tropfen dieser Mischung wird auf einem vorher gereinigten (mit Alkohol abbrennen oder in konzentrierter Lösung von Kali causticum kochen), Objektträger in der gewöhnlichen Weise ausgestrichen und gefärbt. Es werden in mehreren Gesichtsfeldern Bakterien und Erythrocyten gezählt, eventuell unter Zuhilfenahme eines Zählnetzes; daraus wird die Zahl der Bakterien nach der oben angegebenen Gleichung berechnet.

So einfach und genial auch die Methode der Bakterienzählung nach Wright in ihren Prinzipien ist, so stößt man doch in Ausführung derselben in praxi auf Schwierigkeiten, auf die Leishmann, Harrisson, Bulloch, Smalmann[56]) näher hingewiesen haben. Zunächst ist es fast unmöglich, eine ganz gleichmäßige Verteilung von Bakterien und Zellen über das ganze Präparat zu erhalten. Sodann wirkt die Pseudoagglutination, wie sie in Bouillonkulturen häufig ist und auch die Zusammenballung durch die Agglutinine des normalen Serums (aus dem zugesetzten Blut stammend) störend. Auch eine partielle Bakteriolyse könnte die Genauigkeit der Resultate in Frage stellen. (Dieser Übelstand ließe sich übrigens wohl durch Erhitzung des Blutes auf 56° verhüten.) Leishmann empfiehldeshalb eine andere Methode, die nach einer Kombination der Plattenmethode mit der Wrightschen Zählmethode geaicht ist. Von einer sorgfältig bereiteten Kochsalzlösung-Aufschwemmung, die sowohl zur Zählmethode nach Wright, wie auch zum Plattenzählverfahren geeignet war (keine Klümpchenbildung) und bei der nach beiden Methoden übereinstimmende Resultate erzielt wurden, wurden aliquote Teile getrocknet und gewogen. Die Resultate der Wägung in Beziehung zu den durch Zählung ermittelten Bakterienmengen, lassen sich dann ein für allemal als konstant annehmen und leicht auf Kulturen übertragen, bei denen die direkte Zählmethode wegen der erwähnten Schwierigkeiten versagt.

Es erscheint fraglich, ob derartige mühseligen und im Grunde ja doch nie ganz zuverlässigen Standardisierungsmethoden einen Zweck haben, ja ob eine derartige exakte Standardisierung, wie sie Wright wenigstens anstrebt, überhaupt notwendig ist. Eine Typhuskultur stellt bei Verwendung desselben Stammes, geschweige denn bei Verwendung verschiedener Stämme, bezüglich ihrer Virulenz, ihrer Toxizität für den Menschen keine konstante Größe dar, und wir wissen, daß diese Qualitäten unter Umständen schon von einem zum anderen Tage großen Schwankungen unterliegen können. Unter diesen Verhältnissen scheint auch eine weniger exakte Dosierungsmethode, wie etwa die Ösenabmessung oder die ungefähre Wägung der Bakterienmasse in feuchtem Zustande für die Dosierung hinlänglich zu genügen, zumal ja doch stets Dosen gegeben werden sollen, die von der letalen weit entfernt liegen müssen.

Abfüllung des standardisierten Impfstoffes in Fläschchen[116]).

Die Abfüllung des Impfstoffes in kleine Flaschen zur direkten Verwendung geschieht in einer Art und Weise, die eine Verunreinigung durch Luftkeime nach Möglichkeit ausschließt. Die zur Einfüllung bestimmten Fläschchen werden sterilisiert und mit sterilen Gummikappen ver-

schlossen, die zuvor in konzentrierter Sublimatlösung gelegen haben. Diese Gummikappen bieten den Vorteil, durch einfachen Nadelstich Flüssigkeitsmengen entnehmen zu können, ohne daß doch in gleicher Weise wie beim Abheben eines Pfropfens die Gefahr der Infektion durch Luftkeime besteht. Die Überfüllung aus dem Mischgefäß in die Versandfläschchen findet nun in der Weise statt, daß die oben mit Watte verstopfte Luftröhre des Mischgefäßes mit einem Handgebläse versehen wird, während der unterste der drei Ansätze mit einem sterilen Gummirohr armiert wird, in das am unteren Ende eine Hohlnadel eingefügt ist. Danach wird unter leichtem, mittels des Handgebläses erzeugten Drucke nach Entfernung der Verschlußklammer im Ausfluß der Mischflasche die Überfüllung vorgenommen. Zu diesem Zwecke wird die Gummikappe der Abfüllfläschchen in konzentrierte Karbol- oder Lysollösung getaucht. Dann wird die Gummikappe jeder Flasche mit einer sterilen Hohlnadel durchbohrt und in eine zweite Durchbohrung wird die mit der Mischflasche in Verbindung stehende Hohlnadel eingestochen; der Impfstoff strömt, da durch das Handgebläse in der Mischflasche ein geringer Überdruck erzeugt ist, in die Flasche ein, während zugleich durch die zweite Kanüle die Luft entweicht. Verschluß der Anstichöffnungen nach erfolgter Füllung durch Gummilösung, nachdem zuvor die antiseptische Lösung durch absoluten Alkohol entfernt ist und die Gummikappe noch durch Äther gereinigt ist. Ist die Gummilösung erstarrt, so wird über die Kappe noch eine Paraffinschicht (bei 160° erhitztes Paraffin) gezogen. Bei Verwendung des Impfstoffes wird die Kappe mit heißem Öl oder heißer antiseptischer Lösung sterilisiert. Mittels einer sterilen Kanülennadel wird ein Loch eingestochen und an einer anderen Stelle wird dann die Gummikappe nochmals durchbohrt zur Entnahme des Impfstoffes. (Das erste Loch soll als Ventil dienen, um Luft einzulassen.)

Dosierung für den Menschen. Bedeutung der negativen Phase.

Die nach den einzelnen Standardisierungsverfahren gewonnenen Impfstoffe werden für den Menschen folgendermaßen dosiert:

1. Bei dem nach der älteren Methode dargestellten Impfstoff erhält der Erwachsene subkutan die für 100 g Meerschweinchen letale Dosis (s. auch pag. 732), welche etwa einem Opaleszenzgrad von 1 ccm entspricht.

2. Nach der mikroskopischen Zählmethode wird die Dosierung so geregelt, daß zunächst eine Impfung von 750—1000 Millionen abgetöteter Bakterien subkutan erfolgt, der sich eine zweite Inokulation der doppelten Menge nach 11 Tagen anschließt.

Es ist schon darauf hingewiesen worden, daß nach Wrights[109, 112]) Untersuchungen der Einspritzung des Vaccins in nicht seltenen Fällen eine negative Phase, d. h. eine Verarmung des Blutes an Schutzstoffen folgen soll. Wright führt diese Erscheinung, die auch namentlich deutlich bei den Revaccinationen auftritt, auf Grund der Ehrlichschen Theorie darauf zurück, daß die eingeführten Antigene, die im Blut kreisenden normalen Antikörper oder durch die vorhergehende Immunisierung erzeugten Immunantikörper verankern.

Es ist nach dieser Feststellung klar, daß die negative Phase umso größer sein muß, je größer die Impfstoffdosis ist. Nach kolossalen Vaccinmengen vermißt dann auch Wright die Bildung von Antigenen überhaupt (dauernde negative Phase). Bei mittleren Impfstoffmengen folgt die positive

Phase d. h. der Anstieg erst nach einer negativen Phase von ca. drei Wochen Dauer. Bei kleinen Dosen fällt die negative Phase gänzlich weg, es beginnt sogleich der Anstieg des Titers. Aus diesen Tatsachen zieht Wright folgende praktischen Konsequenzen: Zu starke Dosen Impfstoff sind überhaupt zu vermeiden. Mittlere Dosen sind nur dann zu verabreichen, wenn der Schutzgeimpfte frühestens erst später als drei Wochen nach der Impfung Gelegenheit hat, sich der Infektion auszusetzen. Besteht diese Gefahr unmittelbar, d. h. bei Impfungen im Typhusgebiet selbst, so sollen nur kleine Dosen verwendet werden, die keine negative Phase verursachen. Aber in solchen Fällen ist noch eine stärkere Dosis nach Verlauf einer gewissen Zeit zu verabreichen.

Neuere, bisher noch nicht veröffentlichte Tierversuche von Pfeiffer und Friedberger lassen es fraglich erscheinen, ob eine negative Phase im Sinn einer erhöhten Empfänglichkeit im Anschluß an die Impfung überhaupt existiert.

Eine Verarmung des zirkulierenden Blutes an spezifischen Stoffen durch die Vaccination, besonders bei Verwendung großer Dosen, namentlich auch bei der Revaccination ist theoretisch nach Ehrlich wohl begründet und daß sie in der Tat zutage treten, kann dafür sprechen, neben den Beobachtungen Wrights [108]) selbst, die Kurven, die Brieger und Ehrlich [14]) über die Schwankungen des Tetanusantitoxingehaltes in der Milch einer Ziege während der Immunisierung veröffentlicht haben, die analogen Kurven von Salomonsen und Madsen [89]) über Diphtherieantitoxin bei einem Pferd, die Kurven von Morgenroth [66]), über Antilab, von Bulloch [8]) und Sachs [88]) über Hämolysine, von Jörgensen und Madsen [50]) über Agglutinine. von v. Dungern [27]) über Majapräzipitin. Es fragt sich nur, ob dieser negativen Phase auch in praxi für den Menschen eine Bedeutung zukommt, d. h. ob bei Dosen, wie sie hier verwendet werden, die Verarmung des zirkulierenden Blutes an Antikörpern übeɹhaupt zustande kommt und ob eine erhöhte Empfänglichkeit für Infektion resultiert, wodurch allein die theoretisch höchst interessante Tatsache eine praktische Bedeutung erhielte und es rechtfertigen würde, daß ihr bei der Technik des Immunisierungsverfahrens jene Rolle zugeteilt wird, die Wright ihr vindiziert.

Das Experiment am Tier vermag hier einen gewissen Aufschluß zu geben. Pfeiffer und Friedberger haben Meerschweinchen zur Entscheidung dieser Frage mit hohen Dosen von Cholera- und Typhusvaccin subkutan vorbehandelt und nachher die Empfindlichkeit dieser Tiere im Vergleich zu Kontrollen gegenüber der intraperitonealen Infektion geprüft. Da ergab sich denn nach den Tierversuchen, daß im Anschluß an die Immunisierung selbst mit relativ sehr hohen Dosen in keinem Fall eine erhöhte Empfindlichkeit für eine nachfolgende Infektion besteht; im Gegenteil, die vaccinierten Tiere zeigten fast ausnahmslos eine gesteigerte Widerstandsfähigkeit gegenüber der Infektion bereits 8—36 Stunden nach der Schutzimpfung.

Der Schutz ist jedoch kein spezifischer; die mit Cholera vaccinierten Tiere waren nicht nur gegen die Cholera, sondern auch gegen die Typhusinfektion widerstandsfähiger geworden und umgekehrt; es dürfte sich hier also um ein einfaches Resistenzphänomen handeln.

Technik der Impfung.

Sterilisation der Spritze durch Aufsaugen von Öl, das auf 140^0 erhitzt ist. (Beim Mangel eines Thermometers gibt die Bräunung einer in das Öl eingetauchten Brotkrume die Temperatur an.)

Was den Ort der Injektion anbelangt, so vermeidet WRIGHT Stellen, an denen die Haut fest anliegt, weil da die Injektion bei der sich anschließenden Schwellung Spannung und starke Schmerzen verursacht. Er wählt die Rückengegend nahe der Schulter und die Lendengegend.

Symptome beim Menschen.

Die Schwere der Symptome steht nach WRIGHT mit der Impfstoffdosis in Relation, doch nur bis zu einer gewissen Grenze, über die hinaus auch mehr an Impfstoff keine stärkeren Symptome auslöst.

Die Symptome sind lokale und allgemeine, zwischen denen nach WRIGHT Beziehungen derart bestehen, daß bei schwerer lokaler Reaktion die Störungen des allgemeinen Befindens geringer sind und umgekehrt.

1. Lokale Symptome: Frühestens $^1/_4$ Stunde i. R., 2—3 Stunden nach der Injektion beginnt starke Rötung und Schwellung der Haut, verbunden mit seröser Exsudation, geringer Lymphangitis und Schwellung der regionären Lymphdrüsen. Zuweilen ist die Entzündung außerordentlich heftig, sie zeigt dann einen fast erysipelatösen Charakter. Alkoholgenuß ist vor und nach der Impfung zu vermeiden, da er die lokalen Beschwerden steigert. Gegen die lokalen Symptome empfiehlt WRIGHT innerlich 2 g Calciumchlorid oder Calciumlaktat*) und lokal zur Linderung der Schmerzen warme Umschläge und Einreibung folgender Salbe:

Acid. carbolic.	1,0	Zink. oxyd.	3,0
Extr. Ergotin. liquid . .	4,0	Lanolin	20,0

Als lokales Residuum bleibt nach der Impfung noch wochenlang in der Haut ein Knötchen von etwa Erbsengröße zurück. Auffallend ist das Auftreten von Schmerzen an der Impfstelle selbst nach Monaten, wenn trotz der Impfung eine Typhusinfektion erfolgt.

2. Allgemeinen Symptome: Sie beginnen zeitlich, etwa mit den lokalen. Muskelanstrengungen nach der Impfung beschleunigen und erhöhen sie. Auch bei Personen, die vorher angestrengt geistig gearbeitet haben (Examenskandidaten der Medizinschule in Netly) und bei solchen, die vorher gefastet hatten, waren die allgemeinen Erscheinungen heftiger.

Bei der einmaligen größeren Dosis, wie sie früher gegeben wurde, (= dos. let. für 100 g Meerschweinchen) traten nicht selten schwere Störungen auf, heftige Schüttelfröste und Schwächeanfälle, zuweilen zog sich auch die Genesung lange hin, doch war kein Todesfall zu verzeichnen.

Bei der derzeitigen Dosierung dauert das leichte Unwohlsein, verbunden mit Kopfschmerzen, nur etwa 2—3 Stunden, die Temperaturerhöhung ca. 24 Stunden; nur die lokalen Symptome sind hier etwas hartnäckiger. LEISHMANN beobachtete häufig in der zweiten Nacht nach der Wiederimpfung starke Schweißausbrüche.

Übereinstimmend wird auch von einer Reihe von Autoren (WRIGHT, BASSENGE und RIMPAU[3]), KOLLE und LENTZ[52])) auf die ungemein starke Reaktion bei Individuen, die an Malaria leiden, hingewiesen.

---

*) Er nimmt an, daß die günstige Wirkung dieser Mittel auf ihrer Fähigkeit beruht, die Koagulabilitätszeit des Blutes, die durch die Impfung verlängert ist, wieder herabzusetzen.

Spezifische Blutveränderungen.

Die Blutveränderungen, speziell nach der jüngsten Impfungsmethode Wrights, wurden an einem gleichmäßig ausgewählten Material von Versuchspersonen durch Leishmann[44]) und seine Mitarbeiter eingehend studiert.

Im ganzen wurden 106 Personen geimpft, die sich freiwillig er boten hatten; der Wiederimpfung unterzogen sich 86 Individuen. Es kamen 42 Stunden alte Bouillonkulturen, bei 62° abgetötet und mit 0,5 $^0/_0$ Lysol versetzt, zur Anwendung. Die Versuchspersonen wurden in vier Gruppen geteilt, die verschiedene Mengen Impfstoff erhielten (die vierte Gruppe aus Personen bestehend, die schon einmal geimpft waren, ist hier zunächst nicht berücksichtigt). Die Impfstoffdosis schwankte zwischen 110 und 170 Millionen Bazillen bei der ersten Behandlung und etwa der doppelten Menge bei der folgenden. Bei 14 Personen waren genaue fortlaufende Blutuntersuchungen gemacht. In allen Fällen trat eine Steigerung der spezifischen Qualitäten des Serums ein.

Die Untersuchung geschah nach den von Wright[111, 112]) ausgearbeiteten Methoden, bezüglich deren näheren Beschreibung wir auf die Originalarbeiten resp. den zweiten Band dieses Handbuches verweisen.

Es sei nur kurz erwähnt, daß die Bakterizidie in vitro nach der Plattenmethode mit den von Wright angegebenen Modifikationen bestimmt wurde; es wurde die Serummenge ermittelt, welche eine bestimmte Bakterienmenge, $^1/_{10\,000}$ ccm Bouillonkultur, in einer Stunde bei 37° abzutöten vermochte.

Die Bakteriolyse wurde in vitro vorgenommen, der Grad der Granulabildung wurde an gefärbten Ausstrichpräparaten bestimmt. Die Stimuline und Opsonine wurden gleichfalls nach den von Wright und Douglas angegebenen Methoden ausgewertet.

Es ergab sich, daß die stärksten Dosen die höchsten Titerwerte hervorriefen, doch bestand im übrigen kein voller Parallelismus zwischen Impfstoffmenge und Grad der spezifischen Blutveränderung. Versuchspersonen, die die Hälfte der maximalen Dosis erhalten hatten, zeigten fast dieselben Titerwerte.

Die Resultate, wie sie nach diesen Methoden erhalten wurden, gestatten nur schwer einen Vergleich mit den nach anderen Methoden gewonnenen, doch geben sie unter Berücksichtigung der Normalwerte bei denselben Versuchspersonen ein deutliches Bild über die Wirkung der Impfung.

Die Agglutininbildung beginnt erst am neunten Tage; nach der zweiten Impfung sinkt der Wert und beginnt merkwürdigerweise wiederum nach neun Tagen zu steigen.

Die Maximalwerte betrugen etwa 2000—4000 und wurden am 22.—25. Tage erreicht.

Die Steigerung des bakteriziden Vermögens beginnt deutlich am 6.—8. Tage nach der Impfung, erreicht ihren Höhepunkt etwa drei Tage nach der Wiederimpfung (14. Tag) mit einem Wert, der den durchschnittlichen Normalwert etwa um das Fünffache übertrifft.

Die Bakteryolisine zeigen sich nach sechs Tagen bereits gegen die Norm vermehrt, erreichen ihr Maximum etwa am 18. Tage. Steigerung gegen die Normalwerte: 5—10fach, je nach der Impfstoffdosis.

Opsonine waren nicht nachweisbar.

Der Gehalt an ‚Stimulinen' („Elemente im erhitzten Serum die die Phagocytose befördern") erfuhr nach 11 Tagen eine in allen vier Gruppen annähernd gleiche Steigerung gegen die Norm, die von der Vaccindosis unabhängig war.

Statistik.

Die Schwierigkeiten der Statistik erkennt Wright selbst an, er weist aber mit Recht darauf hin, daß trotzdem und unter Berücksichtigung aller der Fehler und Ungenauigkeiten, wie sie unter den schwierigen Verhältnissen, auf die sich diese Zahlen stützen, unvermeidlich sind, das günstige Resultat der Schutzimpfung unzweideutig zutage tritt.

Die Schwierigkeiten und Ungenauigkeiten einer Statistik über den Erfolg der Typhusschutzimpfung bei der englischen Kolonialarmee liegen nach Wright im wesentlichen in folgenden Momenten begründet:

1. Bei der steten Fluktuation (häufiger Garnisonwechsel, Veränderung des Bestandes durch Zuzug an Reserven, Tod usw.) in der englischen Kolonialarmee ist es schwierig, die Zahlen jederzeit genau zu überblicken und zu beurteilen.
2. Aus dem gleichen Grunde ist es schwer festzustellen, inwieweit geimpfte und nichtgeimpfte Personen sich unter gleichen Infektionsbedingungen befunden haben.
3. Dadurch, daß die Impfung häufig nicht im Nationale verzeichnet war, kamen Ungenauigkeiten vor, indem Soldaten, um sich vor einer Impfung zu drücken, falsche Angaben machten oder Pockenimpfung mit Typhusimpfung verwechselten.
4. Endlich führt auch die Unmöglichkeit, die klinische Diagnose im Feld immer bakteriologisch zu erhärten, zu Fehldiagnosen und dadurch zu Ungenauigkeiten der Statistik.

Bei den Impfungen, die Wright[116]) selbst gelegentlich seiner Teilnahme an der englischen Pestkommission in Indien angestellt hat, hat er mit Leishmann ein Material von 2835 Geimpften gesammelt, das im Vergleich zu 8640 Ungeimpften folgendes Resultat lieferte:

Die Mortalität verhielt sich bei Geimpften zu Ungeimpften = 27:213 = 0,95 % : 2,5 %.

Die Morbidität = 5:23 = 0,2 % : 0,34 %.

Die Resultate aller Impfungen, soweit sie statistisch gesammelt waren, hat Wright in zwei Arbeiten[114, 115]) zusammengestellt und ferner in seiner Monographie veröffentlicht, der die nachfolgende Tabelle entnommen ist:

(Siehe Tabelle pag. 742 u. f.)

Bezüglich der Kritik, die Wright selbst an den einzelnen Zahlen übt, sei auf die Originalarbeiten verwiesen. Die Kritik vermag, wie auch Gaffky[44]) hervorhebt, das günstige Resultat, das sich unzweideutig bei dem außerordentlich großen Material um so schärfer ergibt, nicht zu beeinflussen; die Resultate gewinnen noch mehr an Beweiskraft, wenn wir erfahren, daß die Impfung sehr häufig durch ungeschultes Personal in höchst unsorgfältiger Weise ausgeführt wurde. (Es wurden z. B. die Flaschen mit dem Impfstoff vor dem Gebrauch nicht geschüttelt, so daß viele Impflinge nur die oben stehende klare Flüssigkeit eingespritzt erhielten.) In sehr vielen Fällen konnte die zweite Impfung, wie sie Wright fordert, nicht ausgeführt werden.

Statistiken über Antityphus-

Serien-Nummer	Gruppe unter Beobachtung	Intervall zwischen Inokulation u. Beginn d. Infektionschance	Ort	Beobachtungszeit laut Statistik	Berichtet durch	Publikation und andere Informationsquellen
1	Personal des Barmyng-Asyls	kein Intervall	Barmyng Asyl Maidstone	Oktober bis Ende der Epidemie 1897	Dr. J. S. Tew, M. A. G. R. Foulerton, Dr. A. M. Jackson	Public Health März 1898, The Lancet 2. Juni 1900
2	Geimpfte Regimenter u. andere Abteilungen der britischen Armee in Indien	kein Intervall	Verschiedene Stationen in Indien	1899	Offizielle Berichte	Army Medical Report für 1899
3	15 Husaren, deren Frauen und Offiziere	wahrscheinlich ein paar Wochen	Meerut Indien	Okt. 1898 bis Oktbr. 1900	Offizielle Berichte	British Medical Report für 1899 und The Lancet 5. Febr. 1901, berichtet durch Prof. A. E. Wright
4	Garnison aus Ladysmith	2 bis 11 Monate	Ladysmith Südafrika	2. Nov. 1899 bis 28. Febr. 1900	Offizielle Berichte	British Medical Report und The Lancet, 14. Juli 1900, berichtet durch Prof. A. E. Wright
5	Britische Garnison in Ägypten und Cyprus	kein Intervall	Ägypten u. Cyprus	1900	Bericht d. ersten medizinisch. Beamten in Ägypten	British Medical Journal und The Lancet, 4. Mai 1901, berichtet durch Prof. A. E. Wright
6	Britische Garnison in Indien	Verschieden: kein Intervall bis 1 Jahr	Indien	1900	Offizielle Berichte	Army Medical Report für 1900
7	Patienten im Tintown Hospital Ladysmith	keine Daten	Südafrika	—	Dr. D. Melville	British Medical Journal, Vol. I, 1901
8	Patienten in Stationary Hospital Harysmith	keine Daten	Südafrika	Sept. 1900 bis Sept. 1901	Maj. E. Birt R. A. M. C.	British Medical Journal, 11. Jan. 1902

inokulationen nach WRIGHT.

Zahl der Geimpften und Nichtgeimpften pro Gruppe		Zahl der Typhusfälle		Prozentuale Morbidität der Krankheit		Zahl der Typhus-Todesfälle		Prozentuale Morbidität bei Typhus		Letalität		Bemerkungen
Geimpfte	Nicht-geimpfte	Geimpfte	Nicht-geimpfte	Geimpfte	Nicht-geimpfte	Geimpfte	Nicht-geimpfte	Geimpfte	Nicht-geimpfte	Geimpfte	Nicht-geimpfte	
84	116	0	4	0	3,4	—	—	—	—	—	—	Vor Ausführung der Inokulationen waren in d. Stabe, etwa 200 an d. Zahl, 12 Typhusfälle vorgekommen.
4,502	25,851	44	657	0,98	2,54	9	146	0,2	0,57	1:4,9	1:4,5	—
360	179	2	11	0,55	6,14	1	6	0,27	3,35	1:2	1:2,2	—
1,705	10,529	35	1,489	2,05	14,14	8	329	0,47	3,12	1:4,7	1:4,5	—
720	2,669	1	68	0,14	2,55	1	10	0,14	0.37	1:1	1:6,8	—
5,999	54,554	52	731	0,87	1,69	8	224	0,13	0,48	1:6,5	1:3,3	—
—	—	30	265	—	—	2	5	—	—	1 : 15	1 : 53	—
—	—	263	947	—	—	18	135	—	—	1:14,6	1 : 7	Ein Vergleich zwischen 151 Protokollen üb. geimpfte Patienten mit 317 über Nichtgeimpfte zeigt, daß die Höhe und Andauer des Fiebers, d. Prozentsatz der Rückfälle und die Zahl der täglichen Evakuationen unter der Geimpften viel geringer war.

(Fortsetzung.) **Statistiken über**

Serien-Nummer	Gruppe unter Beobachtung	Intervall zwischen Inokulation u. Beginn d. Infektionschance	Ort	Beobachtungszeit laut Statistik	Berichtet durch	Publikationen und andere Informationsquellen
9	Patienten in Portland Hospital	keine Daten	Südafrika	1900	Dr. H. H. Tooth	British Medical Journal, 16. März 1901
10	Patienten im Irish Hospital	"	"	1900	Dr. J. B. Coleman	Transactions of the Royal Academy of Medic. in Ireland, Vol. XIX
11	Patienten im Scottish National Red Cross Hospital	"	"	1900	Colonel Henry Cayley	British Medical Journal, 12. Jan. 1901
12	Patienten im Imperial Yeomanry Hospital	"	"	1900-1901	Dr. A. Elliot u. Dr. J. Washburn	The Lancet, 18. Jan. 1902
13	Patienten aus verschiedenen Militärkrankenhäusern	"	"	1900-1901	Dr. R. W. Dodgson	Offizieller Bericht
14	Personal d. Portland Hospitals	einige Wochen	"	Teil von 1900	Dr. Tooth	British Medical Journal, 16. März 1901
15	Personal des Imperial Yeomanry Hospitals Delfontein	keine Daten	"	keine Daten	Dr. Elliot u. Dr. Washburn	The Lancet, 18. Jan. 1902
16	Personal des Imperial Yeomanry Hospitals in Pretoria	In meisten Fällen einige Wochen	"	Aug. 1900 bis März 1901	Dr. Dodgson	Offiziell. Bericht
17	Nr. 8, " 9, " 10 { Personal v. 3 allgem. Krankenhäusern	einige Wochen	Bloemfontein, Südafrika	April bis August 1900	" / " / "	" / " / "
18	Personal der zweiten Abteilung, Scottish Red Cross Hospital	einige Wochen	Südafrika	Teil von 1900	Colonel Cayley J. M. S.	British Medical Journal, 12. Jan. 1901

Antityphusinokulationen.

Zahl der Geimpften und Nichtgeimpften pro Gruppe		Zahl der Typhusfälle		Prozentuale Morbidität der Krankheit		Zahl der Typhustodesfälle		Prozent. Morbidität bei Typhus		Letalität		Bemerkungen
Geimpfte	Nichtgeimpfte	Geimpfte	Nichtgeimpfte	Geimpfte	Nichtgeimpfte	Geimpfte	Nichtgeimpfte	Geimpfte	Nichtgeimpfte	Geimpfte	Nichtgeimpfte	
—	—	54	178	—	—	4	25	—	—	1:13,5	1:7	—
—	—	80	592	—	—	5	74	—	—	1:16	1:8	—
—	—	15	70	—	—	1	10	—	—	1:15	1:7	—
—	—	47	301	—	—	4	26	—	—	1:11,9	1:11,8	—
—	—	764	3374	—	—	63	510	—	—	1:12	1:6,6	—
28	13	7	3	25	23	0	1	0	7	0:7	1:3	5 der Geimpften hatten nur sehr leichte Anfälle.
59	25	4	4	6,8	16	0	0	—	—	0:4	0:4	—
32	72	3	7	9,3	9,7	0	0	—	—	0:3	0:7	—
21 87 } 108 —	110 47 } 276 119	5 11 } 16 —	44 13 } 93 36	14,8	33,5	0 1 } 1 —	8 2 } 16 6	0,9	5,8	1:16	1:5,8	Die Beobachtungsperiode erstreckt sich über die Zeit „der großen Epidemie“.
70	12	2	4	2,8	33,3	1	1	1,4	8,3	1:2	1:4	In der I. Abteilung, die aus 77 doppelt geimpften und 2 nichtgeimpft. Personen bestand, waren keine Erkrankungen zu verzeichnen. Abt. III, bestehend aus 20 Geimpften, blieb ebenfalls frei.

(Fortsetzung.) **Statistiken über**

Serien-Nummer	Gruppe unter Beobachtung	Intervall zwischen Inokulation u. Beginn d. Injektionschance	Ort	Beobachtungszeit laut Statistik	Berichtet durch	Publikationen und andere Informationsquellen
19	FünftesBataillon, Manchester-Regiment	einige Wochen	Winburg, Südafrika	Juli 1901 bis Febr. 1902	Leutnant J. W. West R. A. M. C.	British Medical Journal und The Lancet, 5. April 1902, berichtet durch Prof. E. A. Wright
20	City Imperial Volunteers	wahrscheinlich einige Wochen	Südafrika	1900	Surgeon-major R.R. Sleman C. J. W.	Privatbericht
21	Patienten im Richmond Asyl, Dublin	kein Intervall	Dublin	Sept. 1900 bis Dez. 1900	Mr. H. M. Cullinan	British Medical Journal, 26. Okt. 1901, berichtet durch Prof. A. E. Whrigt
22	Invaliden aus Südafrika (Offiz. erste Serie)	einige Wochen	Südafrika	keine Daten	Colonel A.Crombie J. M. S.	The Lancet, 3. Mai 1902
23	Invaliden aus Südafrika (Offiziere) (zweite Serie)	In den meisten Fällen nur ein paar Wochen	„	keine Daten	„	The Lancet, 16. August 1902
24	7 Husaren aus Südafrika	einige Wochen	„	20. Dez. 1901 bis 20. Juni 1902	Captain W. A. Ward R. A. M. C.	Offiziell. Bericht
25	Britische Armee in Indien	1 bis 2 Jahre	Indien	Januar bis Dez. 1901	Offizielle Berichte	British Medical Journal, 10. Okt. 1903
26	Lord Methuens Division Modder River	keine Daten	Südafrika	Dez. 1889 bis März 1900	Surg.-Gen. Townsend C. B.	ibid.
27	Nr. 7, General-Hospital. Natal	unter einem Jahr	Estcourt, Natal	April bis Aug. 1900	Dr. Watkins-Pitchford	Vorlesung in der South African Medical Association

Antityphusinokulationen.

Zahl der Geimpften und Nichtgeimpften pro Gruppe		Zahl der Typhusfälle		Prozentuale Morbidität der Krankheit		Zahl der Typhustodesfälle		Prozentuale Morbidität bei Typhus		Letalität		Bemerkungen
Geimpfte	Nichtgeimpfte	Geimpfte	Nichtgeimpfte	Geimpfte	Nichtgeimpfte	Geimpfte	Nichtgeimpfte	Geimpfte	Nichtgeimpfte	Geimpfte	Nichtgeimpfte	
200	547	3	23	1,5	4,2	0	7	0	1,3	0:3	1:3,3	Bei den 3 Geimpften waren die Anfälle sehr leicht. Einige d. Geimpften waren z. Z. der Berichterstattung noch nicht außer Gefahr.
700	494	60	39	8,5	7,9	9	11	1,3	2,2	1:6,7	1:3,5	—
329	298	6	30	1,8	10,0	1	4	0,3	1,3	1:6	1:7,5	Die Beobachtungszeit fand mit dem Ende der Epidemie ihren Abschluß.
112	109	3	24	28,5	22,0	—	—	—	—	—	—	—
102	85	34	28	33,3	32,9	—	—	—	—	—	—	Das Verhältnis der Typhusrekonvaleszenten war: unter den Gimpften unter 26 Jahren 1:3, unter den Nichtgeimpften 2:3, unter 13 doppelt Geimpften 1:1,3, unter 89 einmal Geimpften 1:3,7.
307	244	9	20	2,9	8,2	0	3	0	1,2	0:9	1:6,7	Die Morbidität unt. 73 einmal Geimpften war 4,1 Prozent. unter 234 doppelt Geimpften 2,3 Proz.
4833	55 955	32	774	0,66	1,33	3	199	0,06	0,36	—	—	—
2535	10 981	26	257	1,0	2,3	—	—	—	—	1:11	1:3,5	—
—	—	137	1017	—	—	3	58	—	—	1:46	1:12	Der Prozentsatz der leichten Fälle war 46 unter den Geimpften, 23,99 unter den Nichtgeimpften, der schweren Fälle 19,7 unt. Geimpften, 21,92 unter den Nichtgeimpften.

Die Morbidität erfährt nach Wrights Zahlen eine Herabminderung mindestens um die Hälfte, in einzelnen Serien selbst um das 6—28fache.

Die Mortalität ist gleichfalls um mehr als die Hälfte herabgesetzt. Unter 1758 geimpften Patienten betrug die Zahl der Todesfälle 142 = 8,0%. Unter 10980 nicht geimpften Patienten 1800 Todesfälle = 16,6%

Entsprechend dem leichteren Verlauf des Typhus bei den Schutzgeimpften ist auch die Letalität eine bedeutend geringere. Die minimalste Reduktion ist eine zweifache, sehr häufig aber beträgt sie mehr als das Vierfache des Wertes bei den Nichtgeimpften.

Dauer des Schutzes.

Die Dauer des Schutzes infolge der Impfung bewertet Wright auf Grund des statistischen Berichtes über die britische Kolonialarmee in Indien und Afrika für das Jahr 1900 (s. Tab. Serie 6 und Serie 25) auf zwei bis drei Jahre.

Für die Impfungen nach Wright sprechen sich mehr oder weniger uneingeschränkt aus: Foulerton[33]), Osborne[72]), Wilson[105]), Smith[97]), Marsden[64a]), Cagley[18a]), Gaffky[44]) u. a.

Einwendungen gegen die Wrightsche Statistik.

Die günstigen Resultate Wrights haben jedoch nicht von allen Seiten eine Bestätigung erfahren. Elliot und Wahburn[30]) erheben Einwendungen. Auch Melville[64]) fand bei 295 Typhusfällen in einem Lazarett in Ladysmith (s. Tab. Serie 7), daß unter 30 Geimpften Todesfälle häufiger waren, mehr Komplikationen auftraten, das Fieber von längerer Dauer war als bei den Nichtgeimpften.

	Zahl der Fälle	Komplikationen Zahl d. Fälle	Komplikationen Prozent	Fieberdauer	Todesfälle Zahl	Todesfälle Prozent
Geimpfte	30	12	40,00	24,57	2	6,67
Ungeimpfte	205	55	21,38	21,38	5	1,89

Das Material von Melville ist zu gering. Auch fehlen Angaben über die Zeit, die seit der Impfung verflossen ist, so daß man seinen Zahlen kein großes Gewicht beilegen darf.

Crombie[23]) (s. Tab. Serie 22, 23) stellte bei 250 aus Südafrika zurückgekehrten Offizieren Nachforschungen betreffs vorhergegangener Schutzimpfung und Typhuserkrankung an.

Von diesen 250 Mann waren 112 = 44,8% Schutzgeimpfte (Gruppe I)
29 = 11,0% hatten früher Typhus durchgemacht (Gruppe II)
109 = 43,6% waren weder jemals geimpft, noch jemals typhuskrank (Gruppe III).

Die Erkrankungen an Typhus während des südafrikanischen Krieges bei diesen drei Gruppen von Offizieren sind aus folgender Tabelle ersichtlich:

	Zahl der Individuen	Zahl der Fälle	Prozent
Einmal Geimpfte	102	30	29,4
Zweimal Geimpfte	10	2	20,0
Geimpfte überhaupt	112	32	28,5
Frühere Typhusfälle	29	3	10,3
Nicht Geimpfte	109	24	22,0

CROMBIE hebt jedoch hervor, daß nach einmütiger Ansicht der Militärärzte in Südafrika der Typhus einen bedeutend milderen Verlauf bei den Geimpften zeigt und daß durch die Tatsache, daß unter ihnen die Mortalität eine viel geringere ist, die höhere Zahl von Erkrankungen bei den Geimpften unter diesen 250 Individuen zustande käme, indem hier der scheinbare höhere Prozentsatz an Krankheitsfällen nur bedingt sei durch den höheren Prozentsatz an Genesungen gegenüber den Nichtgeimpften.

Bezüglich der Dauer des Impfschutzes fand CROMBIE während der sechs ersten Monate nach der Impfung günstigere Zahlen bei den Geimpften; von da ab aber war die Prozentzahl der Erkrankungen unter den Nichtgeimpften bedeutend geringer als unter den Geimpften.

Auffallend ist die von CROMBIE gelegentlich einer weiteren Statistik[24]) allerdings an einem sehr geringen Zahlenmaterial beobachtete Tatsache einer höheren Empfindlichkeit bei den zweimal Geimpften.

Dieses Resultat steht mit den übereinstimmenden Ergebnissen anderer Autoren in direktem Widerspruch (siehe vor allem die Tabelle von KUHN[55a]) pag. 755), es läßt sich auch weder durch die Ergebnisse des Tierversuches noch durch theoretische Erwägungen erklären und zeigt, wie bedenklich es ist, aus einem zu kleinen Zahlenmaterial Schlüsse zu ziehen.

WRIGHT führt die höhere Erkrankungszahl unter den Geimpften auch auf ihr geringeres Alter und die dadurch bedingte höhere Empfindlichkeit zurück. Die Altersdifferenz betrug jedoch nach CROMBIE durchschnittlich nur fünf Jahre. Die Einwendungen von WRIGHT veranlaßten ihn, genauere Untersuchungen über den Einfluß des Alters in Zusammenhang mit dem Impfschutz anzustellen.

Er kam zu dem Resultat, daß bis zum Alter von 30 Jahren der Erfolg der Schutzimpfung ein sehr ausgesprochener ist. 27 % Erkrankungen gegen 51 % unter den Nichtgeimpften. Nach 30 Jahren ist das Verhältnis jedoch ein umgekehrtes (27,4 % Erkrankungen gegen 14,3 % bei den Nichtgeimpften). Das Zahlenmaterial, auf das CROMBIE diese Resultate stützt, ist in den einzelnen Gruppen ein viel zu spärliches, um die allgemeine Gültigkeit seiner Beobachtung anzuerkennen.

Eine kurze Zusammenfassung über die Methode und die Resultate WRIGHTS haben NATHAN-LARVIER[67]) und J. FOORD-CAIGER[32]) gegeben.

Eine sehr eingehende Darstellung findet sich in dem vortrefflichen Referat über Typhusschutzimpfung von NETTER[70]).

Die Resultate von WRIGHT haben ferner eine bestätigende Nachprüfung erfahren durch DZIERKOVSKY[26]) und durch GAFFKY, KOLLE, HETSCH und KUTSCHER[44]) (12 Versuchspersonen).

Die Herstellung des Bouillonimpfstoffes und die Dosierung weicht allerdings bei HETSCH und KUTSCHER von der WRIGHTschen Methode in einzelnen Punkten ab. Während WRIGHT als Dosis für den Menschen bei seinem älteren, von HETSCH und KUTSCHER nachgeprüften Verfahren, die für 100 g Meerschweinchen bei subkutaner Injektion tödliche Dosis verwendet, haben HETSCH und KUTSCHER nur die Menge gegeben, die die Dosis letalis für 100 g Meerschweinchen bei intraperitonealer Infektion darstellt.

Als Resultat ergab sich bei der Austitrierung der Sera von fünf Versuchspersonen, daß der bakteriolytische Titer am 10. Tag nach der dreimaligen Injektion mit $^1/_{100}$ seinen Maximalwert erreichte.

Die örtlichen und allgemeinen Erscheinungen waren analog den von WRIGHT angegebenen.

Neue Resultate mit der Methode Pfeiffer-Kolle.

Nächst den Impfungen nach der Methode von Wright liegen eine größere Zahl von Beobachtungen nur nach dem Verfahren von Pfeiffer und Kolle aus der jüngsten Zeit vor.

Diese älteste Methode der Typhusschutzimpfung besteht in der Einverleibung von bei 60° abgetöteten Agarkulturaufschwemmungen in einer indifferenten Suspensionsflüssigkeit (früher Bouillon, jetzt physiologische Kochsalzlösung) (siehe pag. 729).

Der Vorteil der Impfstoffbereitung liegt hier in der Möglichkeit einer bequemen und doch exakten und gleichmäßigen Dosierung, einem besseren Schutz vor Verunreinigung und einer bequemeren Kontrolle der Reinheit des Impfstoffes.

Die Unschädlichkeit der Methode und die Wirkung eines derartigen Vaccins auf die Bildung von Antikörpern beim Menschen waren durch die Laboratoriumsversuche von Pfeiefer-Kolle, Pfeiffer und Marx, Bassenge und Rimpau dargetan.

Die Impfungen einer größeren Zahl sich freiwillig meldender Teilnehmer am Feldzuge gegen die Herero, sowie einer Reihe von Mitarbeitern und Dienern des Berliner Instituts für Infektionskrankheiten, gaben Gelegenheit, die Methode weiterhin auszuarbeiten, zu prüfen und mit anderen bezüglich des antigenen Effektes des Impfstoffes zu vergleichen. Diese Arbeiten wurden durch Gaffky, Kolle, Hetsch und Kutscher[44]) im Institut für Infektionskrankheiten in Berlin ausgeführt.

Es kamen neben der Methode Pfeiffer-Kolle, die von Wright (siehe oben), Bassenge und Rimpau[3]), Neisser-Shiga[68]), sowie Wassermann[61]) zur Anwendung.

Als Kultur zur Impfstoff-Bereitung sowohl für die Methode Pfeiffer-Kolle als für die anderen zum Vergleich herangezogenen Methoden wurde ein Stamm benutzt, der bei einer mittleren Virulenz ($^1/_8$ Öse) ein hohes Bindungsvermögen in vitro besaß. Kolle und seine Mitarbeiter legen auf die Auswahl eines Stammes mit starker Bindungskraft einen besonderen Wert, weil nach Wassermanns[103]) Untersuchungen derartigen Stämmen auch eine hohe antigene Qualität innewohnt.

Durch die Untersuchungen von Friedberger und Moreschi[43]) ist jedoch der Beweis erbracht, daß das hohe Bindungsvermögen nicht unbedingt mit einer starken Antikörper bildenden Kraft im Organismus zusammenhängt. Die Autoren haben auch bei Stämmen, die im Reagenzglas keine Antikörper bindende Fähigkeit besaßen, quantitativ gleiche antigene Qualität nachweisen können, wie bei Stämmen mit einem reichen Rezeptorenapparat.

Wenn somit auch das Bindungsvermögen nicht als ausschließlicher Maßstab der antigenen Qualität anzusehen ist, so war doch der von Kolle und seinen Mitarbeitern gewählte Stamm zur Immunisierung wegen der reichen Antikörperproduktion sehr geeignet. Man wird aber bei der Auswahl einer Kultur für die Immunisierung ohne Rücksicht auf ihr Bindungsvermögen gut tun, rein empirisch durch die Methode der Immunisierung von Tieren mit kleinen Dosen nach Friedberger[38]) eventuell auch mittels einiger Vorversuche am Menschen mit kleinen Dosen (Friedberger und Moreschi[42])) zunächst die antigene Qualität, die ja offenbar bei den einzelnen Stämmen sehr verschieden sein kann, zu eruieren, um einen Stamm von geeigneter Beschaffenheit zur Immunisierung zu erhalten.

Bereitung des Impfstoffes.

Als Einheitsdosis wurde eine Öse frischen Agarimpfstoffes (Öse von 2 mg Fassungsgewicht) benutzt.

Bei Bereitung größerer Impfstoffmengen wurde die Ernte eines gleichmäßig geimpften, 24 Stunden bei 37° gehaltenen Agarröhrchens von bestimmter Oberfläche zu 10 Ösen angenommen.

Die Oberfläche von 10 derartigen gleichmäßig bewachsenen Röhrchen wurde in 45 ccm physiologischer Kochsalzlösung gleichmäßig aufgeschwemmt, Die Aufschwemmung wurde durch ein steriles Gazefilter in einem Erlenmeyerkolben filtriert, welcher alsdann 45 ccm Impfstoff = 100 Normalösen enthielt. Sterilisation des Impfstoffes durch $1\frac{1}{2}$- bis 2stündiges Einstellen der Kolben in den 60°-Schrank. Darnach Prüfung auf Sterilität (Anlegen von Agar und Bouillonkulturen) und Zusatz von 5 ccm 5% (später 3%) Phenollösung zu jedem Kolben.

Waren nach 24 Stunden die Sterilitätskontrollen positiv, so wurden der Impfstoff in sterile braune Fläschchen von 15—20 ccm abgefüllt; Verschluß mit ausgekochten und in 5%iger Phenollösung aufbewahrten Gummipfropfen und mit Staniolkapsel und Plombe.

Darnach nochmalige $\frac{1}{2}$stündige Erwärmung im 60°-Schrank und Signierung.

1 ccm dieses Impfstoffes = 2 Ösen 24stündiger Agarkultur.

Dosierung des Impfstoffes.

Die Dosierung des Impfstoffes geschah bei einer Gruppe von Individuen nach der ursprünglichen Methode von Pfeiffer-Kolle (große Dosen), bei einer zweiten Gruppe nach Bassenge und Rimpau mit kleinen Dosen.

Nach dem Verfahren Pfeiffer-Kolle wurde verwendet:

Zur ersten Injektion:	1 Öse	= 0,5 ccm	des Impfstoffes.
„ zweiten „	2 „	= 1,0	„ „ „
„ dritten „	3 „	= 1,5	„ „ „

Wegen der Heftigkeit der Symptome bei einer Reihe von Geimpften wurde vom Mai 1905 ab die Impfdosis herabgesetzt. Es wurde gegeben:

Zur ersten Injektion	0,3 ccm	des Impfstoffes
do	0,8 ccm	„ „
do .	1,0 ccm	„ „

Nach dem Verfahren von Bassenge-Rimpau wurde verwendet:

Zur ersen Injektion	$\frac{1}{30}$ Öse
„ zweiten „	$\frac{1}{15}$ „
„ dritten „	$\frac{1}{5}$ „

Modus der Impfung.

Als Injektionsstelle bevorzugen die Autoren die Mitte zwischen Brustwarze und Schlüsselbein, die erste Injektion erfolgt links, die zweite rechts, da zweimalige Injektion an der gleichen Stelle stärkere lokale Beschwerden verursacht. Man darf die Injektion jedoch nicht zu nahe dem Schlüsselbein machen. In derartigen Fällen kann die nachfolgende Schwellung sich bis in die Halsregion ausbreiten und zu Schluckbeschwerden Veranlassung geben.

Die von Wright gewählte Injektionsstelle am Rücken wird wegen der Störungen, die die Schwellung der Umgebung besonders beim Liegen veranlaßt, verworfen.

Bei Injektion in das straffe Gewebe des Unterarms, wie sie von Bassenge und Rimpau bis auf einen Fall durchgehends angewendet wurde, wurde gleichfalls eine erhöhte Spannung und Schmerzhaftigkeit beobachtet.

Injektion erfolgt mit ½ Stunde in Sodalösung ausgekochter Spritze nach vorangegangener Desinfektion der Hautstelle mit Äther und Thymoxol. Verschluß der Stichwunde mit Kollodium.

Symptome beim Menschen.

a) Lokale Symptome.

Die lokalen Symptome unterscheiden sich nach Hetsch und Kutscher von denen bei Verwendung des Wrightschen Impfstoffes durch ein schnelleres Eintreten und dadurch, daß die Schwellung meist härter, zirkumskripter ist, während sie sich bei den nach Wright geimpften Individuen teigig anfühlt.

Die Dosis scheint auf die Intensität der lokalen Symptome keinen deutlichen Einfluß zu haben; diese waren bei dem Verfahren Pfeiffer-Kolle und Bassenge-Rimpau die gleichen.

Bei dem Versuchsmaterial (97 Individuen mit großen, 6 mit kleinen Dosen) traten die lokalen Symptome nach der ersten Impfung in der 3.—12. Stunde, bei der zweiten nach 4—6 Stunden auf. Schwellung zumeist handtellergroß, selten stärker, intensiv scharf begrenzt, während der ersten 24 Stunden druckempfindlich, selten diffuse Schwellung.

Regionäre Lymphdrüsen häufig schmerzhaft und geschwollen, Abklingen der lokalen Symptome meist nach 36—48 Stunden, selten erst nach 60—84 in einem Falle sogar erst nach 90 Stunden.

Bei Wiederholung der Injektion sind die Beschwerden geringere.

Auch Hetsch und Kutscher konnten den ungünstigen Einfluß des Alkoholgenusses auf die lokalen Erscheinungen bestätigen. Nach Alkoholgenuß sahen sie in zwei Fällen die bereits abgeklungenen lokalen Beschwerden wieder auftreten.

b) Allgemeine Symptome.

Auch diese begannen bei Verwendung des Pfeiffer-Kolleschen früher als bei Wrights Impfstoff. Sie treten bei kleinen Dosen ganz in den Hintergrund (leichte Abgeschlagenheit und Temperatursteigerung bis höchstens 37,8 in 2 Fällen).

Das hervorstechendste Symptom bei der Verimpfung großer Dosen ist die Temperatursteigerung, die nach den Beobachtungen von Flemming betrug.

1 mal =	6,91 % der Fälle	40,5 °		15 mal =	16,55 % der Fälle	38,6—39,0 °
6 „ =	6,66 % „ „	39,6—40 °		30 „ =	33,0 % „ „	38,1—38,5 °
13 „ =	14,33 % „ „	39,1—39,5 °		19 „ =	20,94 % „ „	37,5—38,0 °

7 mal = 7,37 % der Fälle nicht über 37,4 °

Beginn des Fiebers nach 2—4, seltener 6—12 Stunden, aber einmal erst nach 36 Stunden.

Fieberdauer ca. 12, seltener 24—36, in zwei Fällen 48, einmal sogar 60 Stunden.

Der Charakter des Fiebers ist verschieden; über die vorkommenden Typen geben die umstehenden 4 Kurven (nach Hetsch und Kutscher) Aufklärung (Fig. 6—9).

Das Fieber begann in der Regel mit Schüttelfrost und war mit Kopfschmerzen und Gefühl der Abgeschlagenheit verbunden.

In 19 % trat nach einigen Stunden Erbrechen ein, darnach ließen die Beschwerden nach.

In einem Falle kurz dauernder Dyspnöe einige Stunden nach der Impfung.

In 20 % der Fälle bläschenförmiger Ausschlag an der Lippe, zweimal an der Zunge, einmal an der Hand.

In zwei Fällen leichte bis zu 36 Stunden anhaltende Albuminurie.

Fig. 6.

Fig. 7.

Fig. 8.

Fig. 9.

Fig. 6—9. Kurven bei Impfungen mit Typhusimpfstoff PFEIFFER-KOLLE nach HETSCH und KUTSCHER.

Dauer der Reaktion in toto:

In 20,0 % der Fälle . . .	6 Stunden	In 5,5 % der Fälle . . .	36 Stunden
In 30,4 % „ „ . . .	12 „	In einem Falle	60 „
In 27,4 % „ „ . . .	24 „		

Die Reaktion nach der wiederholten Injektion war i. R. bedeutend milder, häufig jedoch nicht in den Fällen, in denen die erste Impfung eine schwache Reaktion ausgelöst hatte.

Spezifische Blutveränderungen.

Acht Tage nach den einzelnen Injektionen wurde das Serum auf seinen Antikörpergehalt untersucht; in zahlreichen Fällen zur Kontrolle auch das Normalserum.

Die Bestimmung des Agglutinationsgrades wurde makroskopisch vorgenommen.

Die Bakteriolysine wurden nach der Methode von Pfeiffer mit Einschluß aller nötigen Kontrollversuche bestimmt.

Im nachstehenden folgen die Maximalwerte für Agglutination und Bakteriolyse am achten Tage nach der Injektion gegenüber Typhusstamm W.

1. Bei großen Dosen und zweimaliger Injektion*):

Agglutination	Bakteriolyse
dreimal 1 : 1000	dreimal $^1/_{1000}$
einmal 1 : 500	zweimal $^1/_{500}$
dreimal 1 : 200	zweimal $^1/_{200}$
einmal 1 : 100	einmal $^1/_{100}$

2. Bei großen Dosen und einmaliger Injektion:

Agglutination	Bakteriolyse
einmal 1 : 200	einmal $^1/_{1000}$
viermal 1 : 100	einmal $^1/_{500}$
einmal 1 : 50	zweimal $^1/_{200}$
einmal 1 : 20	viermal $^1/_{100}$
einmal fehlt.	

3. Bei kleinen Dosen und zweimaliger Injektion:

Agglutination	Bakteriolyse
einmal 1 : 200	zweimal $^1/_{50}$
viermal 1 : 50	viermal $^1/_{20}$
einmal 1 : 20.	

Kutscher und Hetsch betonen wiederholt, daß zwischen Titerhöhe und Stärke der Reaktion des Organismus ein Zusammenhang besteht. Sie führen einen Fall an (l. c. pag. 159), in dem erst mit der Fieberreaktion bei der zweiten Einspritzung die Titersteigerung begann. Es ist im übrigen aber aus ihren Zahlen nicht deutlich zu ersehen, worauf sie ihre Ansicht stützen. Von allen anderen Autoren (Wright[107]), Bassenge und Rimpau[3]), Friedberger und Moreschi[42]), Bischoff[9]) wird ein derartiger Zusammenhang geleugnet.

Vergleichen wir die Resultate, die Kutscher und Hetsch mit kleinen Dosen im Vergleich zu Bassenge und Rimpau selbst erhalten haben, so ergeben sich nicht unbeträchtliche Unterschiede.

Bezüglich der lokalen Symptome stimmen die Autoren überein, dagegen sehen Bassenge und Rimpau bei ihren acht Fällen häufiger schwere allgemeine Erscheinungen, die Kutscher und Hetsch vermißten. Von dem ersten Falle mit besonders stürmischem Verlauf ist

*) Kutscher und Hetsch beobachteten auch nicht selten im Verlauf der Immunisierung jenes Phänomen, das Wright als negative Phase bezeichnet hat, einen Abfall des Titers im unmittelbaren Anschluß an die Wiederimpfung.

dabei wegen der offenbar begünstigenden Komplikation mit Malaria abzusehen.

Die Titerwerte für Agglutination und Bakteriolyse weichen erheblich von den von Hetsch und Kutscher gefundenen ab.

Einmal ist wohl hier für die Tatsache verantwortlich zu machen, daß Bassenge und Rimpau zur Immunisierung und Agglutination einen ganz anderen Stamm benutzt hatten und ferner leider bei der Bestimmung der Bakteriolysine im Tierversuch nicht unerheblich von der üblichen Methodik abwichen.

Daher ist auch eine zahlenmäßige Vergleichung mit den Resultaten von Kutscher und Hetsch nicht möglich.

Der Agglutinationstiter zeigte bei Bassenge und Rimpau im Verlauf der Immunisierung gegen die Norm durchschnittlich eine Erhöhung um das 100—1000fache.

Auch der bakteriolytische Titer erfuhr eine beträchtlichere Steigerung, die aber wegen der Verschiedenartigkeit der Dosierung in den Einzelversuchen sich nicht in einheitlichen Zahlen ausdrücken läßt (s. darüber im Original). Von Bedeutung erscheint die Beobachtung von Bassenge und Rimpau, daß sich die Schutzkräfte wenigstens monatelang auf einer gewissen Höhe erhalten.

Statistik.

Über den Erfolg der auf Veranlassung von Gaffky, Kolle, Hetsch, Kutscher ausgeführten Impfungen liegen bislang nur vorläufige Mitteilungen vor, die aber ein recht günstiges Urteil gestatten.

Auf dem deutschen Kolonialkongreß in Berlin im Jahre 1905 vertraten Steudel[98]) und Schian[91]) bereits die Ansicht, daß durch die Typhusschutzimpfung die Mortalität und Morbidität gesunken sei; allerdings weist Schian auch darauf hin, daß bereits vor Einführung der Typhusschutzimpfung durch die allgemeinen hygienisch prophylaktischen Maßnahmen ein Rückgang zu verzeichnen war.

Eine allerdings gleichfalls nur vorläufige, jedoch sich auf ein großes Zahlenmaterial stützende Mitteilung ist von dem Oberkommando der Schutztruppe veröffentlicht[71]). Durch Morgenroth wurden 424 Typhusfälle beobachtet, von denen 100 nach dem Verfahren von Pfeiffer-Kolle geimpft waren und zwar 30 einmal, 52 zweimal und 18 dreimal. Der Bericht hebt hervor, daß der Verlauf der Erkrankungen ein besonders schwerer war bei denjenigen Individuen, die kurze Zeit nach der Impfung erkrankten, im übrigen liegen aber die Verhältnisse für die Geimpften bedeutend günstiger, wie aus folgender Zusammenstellung hervorgeht:

324 Nichtgeimpfte:		100 Geimpfte:	
Todesfälle	36 (=11,1 %)	Todesfälle	4 (= 4 %)
schwere Fälle	82 (=25,3 %)	schwere Fälle	10 (=10 %)
		davon einmal geimpft	6
		„ zweimal „	3
		„ dreimal „	1
mittlere Fälle	69 (=21,3 %)	mittlere Fälle	20 (=20 %)
		davon einmal geimpft	3
		„ zweimal „	13
		„ dreimal „	4
leichte Fälle	137 (=42,3 %)	leichte Fälle	66 (=66 %)
		davon einmal geimpft	18
		„ zweimal „	35
		„ dreimal „	13
Komplikationen . . .	113 (=34,9 %)	Komplikationen	20 (=20 %).

Allgemein wurde von den beobachtenden Sanitätsoffizieren hervorgehoben, daß bei den Geimpften das Fieber geringer und von kürzerer Dauer war; das Sensorium freier, Kopfschmerzen seltener, ebenso Nachschübe. Als Gesamtergebnis geht aus dem Berichte hervor, daß die gegen Typhus Geimpften, auch wenn sie einen vollen dauernden Schutz gegen die Ansteckung nicht erlangten, beim Überstehen der Krankheit entschieden im Vorteil gegenüber den Nichtgeimpften sind, und dieses um so mehr, je öfter sie sich den Impfungen unterworfen haben.

In neuester Zeit hat auch Eichholz[28]) über den Verlauf der Typhuserkrankung bei einer Reihe von Geimpften im Vergleich zu Nichtgeimpften berichtet. Im ganzen handelt es sich um 68 Fälle (34 Geimpfte, 34 Nichtgeimpfte), die unter gleichen äußeren Verhältnissen im Lazarett von Windhuk behandelt wurden.

	Nicht Geimpfte	Geimpfte
Todesfälle	8,8 %	0 %
Schwere Komplikationen	22,6 %	8,8 %
Fieber über 40°	79,2 %	48,3 %
Dauer des Fiebers im Durchschnitt . .	14,8 Tage	12,5 Tage

Über das ausgedehnteste Material verfügt nunmehr Kuhn[55a]), der die Zählkarten von 7287 Mann verarbeiten konnte, von denen 1950 = 27,3 % einmal, 3615 = 50,6 % zweimal und 1578 = 21,1 % dreimal geimpft waren (bei 144 Mann ist die Anzahl der Injektionen noch nicht festgestellt). Diesen 7287 Geimpften stehen 9204 Ungeimpfte gegenüber, wobei die Typhusgenesenen nicht mitgezählt sind.

Im Verlauf des Feldzuges hat die Zahl det Typhus- und Todesfälle eine fortschreitende Abnahme erfahren, die Kuhn in Übereinstimmung mit Steudel zum Teil wenigstens den Impfungen zuschreibt.

		Prozent der Erkrankgn.	Prozent der Todesfälle
Von Mai bis Dezember	1904	4,2	0,46
Erstes Halbjahr	1905	2,3	0,15
Zweites „	1905	1,2	0,05
Erstes „	1906	1,0	0,07
Zweites „	1906	0,6	0,04
Januar, Februar	1907	0,5	0,08

Von April 1905 bis Ende 1906 sind nach den Zählkarten 1280 Typhusfälle vorgekommen, davon sind 906 nicht geimpfte, 371 geimpfte Fälle (3 Zählkarten waren ungenau). Es waren erkrankt bzw. gestorben von den:

	Geimpften	Ungeimpften
Leicht	186 (50,13 %)	331 (36,55 %)
Mittelschwer	96 (25,88 %)	225 (24,85 %)
Schwer	65 (17,52 %)	234 (25,80 %)
Es starben	24 (6,47 %)	116 (12,80 %)
	371 (100,00 %)	906 (100,00 %)

Der Schutz gegen die Typhusinfektion nimmt mit der Zahl der Impfungen zu. Es erkrankten von den:

	Einmal Geimpften 6,31 %	Zweimal Geimpften 4,81 %	Dreimal Geimpften 4,69 %
darunter leichte Fälle	31,72 %	48,93 %	19,35 %
mittlere „	23,95 %	48,96 %	27,09 %
schwere „	41,54 %	43,09 %	15,04 %
Tote	58,33 %	33,33 %	8,33 %

Die Dauer des Impfschutzes bewertet Kuhn auf 1 Jahr, wie sich aus folgender Tabelle nach den Kuhnschen Zahlen ergibt:

Zeit nach der Impfung	Leichtkranke	Mittelschwer Kranke	Schwerkranke	Tote
2.— 6. Monat	105 (56,04 %)	44 (23,65 %)	28 (15,05 %)	9 (4,85 %)
6.—12. „	45 (48,91 %)	25 (27,17 %)	15 (16,31 %)	7 (7,61 %)
über 12 Monate	26 (32,91 %)	27 (34,88 %)	18 (22,78 %)	8 (10,13 %)

Impfstoffbereitung nach Löffler[60]).

Während Pfeiffer und Kolle, sowie Wright bei der Bereitung des Impfstoffes aus lebenden Typhusbakterien etwa die niedrigste Temperatur wählten, die zur sicheren Abtötung der Bakterien ausreicht, weil bei ihr naturgemäß die Antigene am wenigsten geschädigt werden, hat Löffler einen anderen Weg zur Impfstoffbereitung aus lebenden Bakterien beschritten, der ihm die Abtötung bei bedeutend höheren Temperaturen ermöglichte und einen Impfstoff lieferte, der mancherlei Vorteile gewährte.

Ausgehend von der Tatsache, daß Fermente, die in Lösung gegenüber höheren Temperaturen sehr wenig widerstandsfähig sind, in absolut trockenem Zustand viel höhere Wärmegrade vertragen, hat Löffler die antigene Fähigkeit von bis zur Gewichtskonstanz getrockneten und dann stark erhitzten (120—150°) Antigenen verschiedener Art, darunter auch von pathogenen Bakterien untersucht.

Das Material von Agarkulturen wurde auf Glasplatten ausgebreitet, bis zur Gewichtskonstanz im Exsikkator getrocknet und im Mörser zermahlen. Abgewogene Mengen in Kochsalzlösung gleichmäßig verteilt, dienten als Impfstoff. Löffler fand, daß derartig behandelte Bakterien beim Tier noch ein bakterizides und agglutinierendes Serum lieferten.

Friedberger und Moreschi[41]) haben durch quantitative vergleichende Tierversuche festgestellt, daß das Löfflersche Antigen bezüglich der Antikörperausbeute mit dem Pfeiffer-Kolleschen gleichwertig ist.

Dies veranlaßte Friedberger und Moreschi, das Verfahren auch beim Menschen zu erproben und zwar unter direkter Injektion des Impfstoffes in die Blutbahn.

3. Methode Friedberger-Moreschi[42]).

Die Darstellung des Impfstoffes geschah nach der Methode Löffler, jedoch wurden die Bakterien nur bei 120° abgetötet, da bei 150° bereits eine beträchtliche Zerstörung der Antigene zu verzeichnen war. Auch

ließ sich das so erhitzte Vaccin nicht mehr homogen in physiologischer Kochsalzlösung verreiben, während bei 120° erhitzt das Vaccin seine Homogenisierungsfähigkeit vollständig bewahrte. In der Dosierung sowohl wie in der Injektionsweise des Impfstoffes wichen Friedberger und Moreschi von der seither üblichen Methode gänzlich ab.

Friedberger[38]) hat zuerst für Cholera im Anschlusse an Untersuchungen von Mertens[51a]) über den Unterschied zwischen subkutaner und endovenöser Injektion gezeigt, daß die intravenöse Injektion minimalster Mengen abgetöteter Bakterien eine ungemein intensive Antikörperbildung bei Kaninchen hervorruft. Dabei stellt sich das paradoxe Verhalten heraus, daß zwischen Impfstoffmenge und Intensität der Antikörperbildung in weiter Grenze keine Beziehungen bestanden, so daß z. B. durch $^1/_{100}$ Öse Impfstoff die gleiche Antikörperproduktion erzielt wurde wie durch eine Öse. Friedberger und Moreschi[33]) haben dann in zahlreichen vergleichenden Tierversuchen dieses parodoxe Phänomen speziell bei Typhus-Immunisierung weiterhin beobachtet. Es schien von Interesse zu sein, auch bei Menschen den Erfolg der Immunisierung mit kleinsten Mengen abgetöteter Bakterien bei intravenöser Injektion zu studieren.

Hierzu wurde der nach Löffler bereitete Impfstoff benutzt. Die Versuche wurden an 13 gesunden Personen angestellt, die früher niemals Typhus durchgemacht hatten. Der Löfflersche Impfstoff wurde homogen in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und dann sogleich zur Impfung benutzt. Die Injektionsmenge schwankte zwischen $^1/_{50}$ Öse = 0,0156 mg und $^1/_{4000}$ Öse = 0,000 195 mg Bakteriensubstanz. Die Injektion geschah in die Vena mediana des linken Armes nach vorheriger Sterilisation der Haut. Man ließ zunächst aus der Kanüle vor der Injektion etwas Normalblut abfließen, um Material für die Auswertung des Normalserums zu erhalten. Dann erfolgte die Injektion; die Impfstoff-

Fig. 10. Fall VII der Tabelle.

Dosis des Impfstoffes = $^1/_{1000}$ Oese Sprung = 0,00078 mg.

Fig. 11. Fall X der Tabelle.

Dosis des Impfstoffes = $^1/_{100}$ Oese Gießen = 0,0078 mg.

Fieberkurven bei intravenöser Typhusschutzimpfung nach Friedberger-Moreschi.

dosis war stets in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung enthalten. Die Impfungen führten zu dem Endresultate, daß selbst noch Mengen von $^1/_{4000}$ Öse Typhusbakterien nach Löffler abgetötet = 0,000 195 mg Bakteriensubstanz, starke antigene Qualität zeigten. Auch die toxische Wirkung dieses nach Löffler bereiteten Impfstoffes ist eine außerordentlich intensive. Mengen von $^1/_{1000}$ Öse = 0,000 78 mg riefen noch Fiebersteigerungen bis über 38° hervor, wie sich aus den beiden obenstehenden Temperaturkurven Fig. 10 und 11 ergibt. Das Fieber begann meistens mit einem Schüttelfrost. Ein Zusammenhang zwischen Fieberreaktion und Intensität der Antikörperbildung, wie er von Kutscher

und HETSCH behauptet wird, tritt bei den Versuchen von FRIEDBERGER und MORESCHI in Übereinstimmung mit WRIGHT, BASSENGE und RIMPAU, sowie BISCHOFF nicht zutage.

Über die Stärke der Reaktion in den einzelnen Fällen und die Titerveränderung gegen die Norm gibt die nachstehende Tabelle Aufschluß.

Nr. der Versuchsperson	Impfstoffmenge in		Maximum der Körpertemperatur	Agglutination		Bakteriolyse	
	Ösen	mg		Normalserum	Immunserum	Normalserum	Immunserum
I	$^1/_{50}$ Sprung	0,0156	38,5	10 —	160 ±	> 0,1	0,005 — 0,001
II	$^1/_{500}$ „	0,00156	39,1	10 —	40 +	0,01 0,05	0,005 — 0,01
III	$^1/_{500}$ „	0,00156	38,3	10 ±	10 +	> 0,1	> 0,01
IV	$^1/_{500}$ „	0,00156	39,0	10 —	40 ±	—	—
V	$^1/_{1000}$ „	0,00078	kein Fieber	10 —	160 ±	0,05 — 0,1	0,001 — 0,005
VI	$^1/_{1000}$ „	0,00078	38,4	10 ±		> 0,05	— 0,01
VII	$^1/_{1000}$ „	0,00078	38,1	10 —	10 —	—	—
VIII	$^1/_{50}$ Gießen	0,0156	Schüttelfrost Temperatur nicht gemessen	10 —	40 +	—	0,001 — 0,005
IX	$^1/_{100}$ „	0,0078	38,8	—	—	—	—
X	$^1/_{100}$ „	0,0078	39,1	—	—	—	—
XI	$^1/_{1000}$ „	0,00078	38,3	10 —	1280 +	0,01 — 0,05	0,001 — 0,005
XII	$^1/_{2000}$ „	0,00039	37,8	10 —	80 ±	—	—
XIII	$^1/_{2000}$ „	0,00039	37,6	10 —	80 +	—	—
XIV	$^1/_{4000}$ „	0,000195	kein Fieber	10 —	80 +	0,01 — 0,05	0,001 — 0,005

Über die Dauer des Impfschutzes wurden bei Fall I und VIII Untersuchungen angestellt. 2 $^1/_2$ Monate nach der Impfung hatte das Serum der Versuchsperson I noch einen Titer von 1—5 mg, das von VIII einen Titer von 5—10 mg.

Die Methode liefert, obwohl über 6—24000 mal geringere Bakterienmengen verwendet wurden als nach dem Verfahren PFEIFFER-KOLLE, im Durchschnitt die gleichen Werte wie jenes Verfahren und weit höhere wie die WRIGHTsche Methode. Ob die Methode auch für die Praxis dem Verfahren von PFEIFFER-KOLLE als gleichwertig zu erachten ist, darüber könnten erst ausgedehnte Erfahrungen einen Aufschluß geben. Ein wesentlicher Vorteil der Methode dürfte darin bestehen, daß bei dem nach LÖFFLER bereiteten Impfstoff Veränderungen infolge Autolyse bei längerer Aufbewahrung ausgeschlossen sind. Es ist dies auch der einzige Impfstoff, bei dem infolge der Möglichkeit einer exakten Wägung eine exakte und gleichmäßige Dosierung möglich ist. Die Injektion in die Blutbahnen ist zwar technisch etwas umständlich, aber dafür bietet sie den unbestreitbaren großen Vorteil, daß die störenden lokalen Reaktionen gänzlich wegfallen, die allgemeinen Reaktionen sind in ihrer Intensität etwa die gleichen, wie sie durch den Impfstoff von PFEIFFER-KOLLE hervorgerufen werden.

1. Verfahren der Impfstoffdarstellung nach Levy und Blumenthal[57]).

Die Tatsache, daß konzentrierte Zuckerlösungen (geprüft wurde Traubenzucker und Galaktose) die Wuchsformen der Bakterien abtöten, legte Levy und Blumenthal nahe, aus derartig abgetöteten Bakterien einen Impfstoff zu bereiten. Sie glaubten, bei dieser Methode ein Präparat zu erhalten, bei dem tiefgehende Veränderungen der Bakterienleibessubstanzen, mit welcher ja eine Beeinträchtigung der Antigene verknüpft sei, vermieden werden.

Detaillierte Angaben über die Bereitung des Impfstoffes liegen nicht vor.

Die mit einer Galaktoselösung-Typhusbakteriensuspension gefüllten Röhrchen werden im Schüttelapparat bei 37 ° geschüttelt. Das Material wird dann getrocknet zur Impfung benutzt.

Meerschweinchen vertragen subkutan 20—30 mg des „Galaktosepulvers“ (auf feuchte Bakteriensubstanz berechnet). Subkutan vorbehandelte Meerschweinchen und Kaninchen (1—4 mg) sind gegen ein mehrfaches Multiplum der Dosis letalis geschützt.

Levy, Blumenthal und Marxer[58]) verwenden neuerdings auch an Stelle des Zuckers Harnstoff in konzentrierter Lösung, da dessen Extrahierungsvermögen ein höheres als das des Zuckers ist.

Die Typhusbakterien werden im Schüttelapparat bei 37 ° 24 Stunden mit 25 % Harnstofflösung behandelt, sodann im Vakuum bei niederer Temperatur getrocknet. 1—2 mg subkutan (auf feuchte Agarkulturmasse berechnet) schützt gegen die intraperitoneale Infektion mit 5—10 letalen Bakteriendosen.

Methoden, die wirksamen Antigene aus den Vollbakterien zu extrahieren.

Eine Reihe von Autoren haben versucht, die wirksamen Antigene aus den Bakterien zu extrahieren. Sie gingen dabei von der Erwägung aus, daß die Vollbakterien neben dem eigentlichen immunisierenden Prinzip eine Menge von Ballast enthalten, den bei der Injektion der Körper verarbeiten muß und der wohl zum Teile an den hier als überflüssig erscheinenden unangenehmen Reaktionen schuld ist. Vor allem war aber dabei die Überlegung leitend, daß die giftigen Bestandteile des Bakterienleibes vielleicht von dem immunisierenden Anteile ganz verschieden sein könnten. Von diesen Gesichtspunkten aus wurde eine Reihe von Verfahren empfohlen, bei denen an Stelle der Vollbakterien verschieden verarbeitete Bakterienprodukte Auszüge usw. zur Verwendung kamen.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß ein derartiger Modus procedendi gerade für die Bereitung eines bakteriolytischen Serums a priori recht wenig rationell erscheint.

Das bakteriolytische Serum ist ein solches, das sich gegen dem Bakterienleib in toto richtet und es enthält natürlich auch entsprechend dessen komplexer Konstitution eine ganze Reihe von Partiallysinen. Es wird aber um so wirksamer sein, je mehr es von diesen Partialantikörpern behält und am wirksamsten dann sein, wenn es sie alle enthält, d. h. durch Behandlung mit allen Bakterienbestandteilen i. e. mit Vollbakterien erzeugt ist. Solange wir über die wahre Natur der Antigene noch nichts

wissen, dürften Methoden, die eine Isolierung der Antigene erstreben, für die Praxis verfrüht erscheinen und kaum zu empfehlen sein, zumal bei einer Infektion wie dem Typhus, bei dem man ja nicht durch direkte Infektionsversuche den Erfolg der Impfung kontrollieren kann, um damit ein solches Verfahren auf eine sichere Basis zu stellen.

Noch auf einen Punkt ist ferner hinzuweisen. Offenbar löst das extrahierte Bakterienprotoplasma wegen der erleichterten Resorption und des dadurch bedingten starken Reizes eine sehr hohe Antikörperproduktion, aus, wie dies wenigstens aus den hohen Titerwerten von NEISSER und SHIGA[68]), MACFADYEN und ROWLAND[62]), BRIEGER und MAYER[15]) hervorzugehen scheint. Wie sich aber aus den Resultaten von MACFADYEN und ROWLAND, von BRIEGER und MAYER ergibt, ist dieser hohe Schutzwert von auffallend geringer Dauer. Bei einem Kaninchen z. B. von BRIEGER und MAYER zeigte sich acht Tage nach Schluß der Vorbehandlung ein Titer von $^1/_{25000}$; nach weiteren acht Tagen nur noch $^1/_{15000}$, nach zwei Monaten $< ^1/_{200}$. Es gewinnt aus derartigen Versuchen den Anschein, als ob die erleichterte Resorption in praxi gar keinen wesentlichen Vorteil darstellt. Denn die allmähliche Resorption von Vollbakterien scheint eine längere Dauer der Immunität zu garantieren. Für die Praxis aber kommt eben nicht nur einmaliger hoher Titerwert, sondern auch eine gewisse zeitliche Dauerhaftigkeit der Immunität in Frage. Es ist daher für gewöhnlich ein Verfahren zu wählen, das nicht nur einen momentan hohen. sondern auch einen zeitlich ausgedehnten Schutz gewährt. (Diese Verhältnisse zeigen, wie bedenklich es unter Umständen sein kann, nur aus den kurze Zeit nach der Impfung beobachteten Titerzahlen sich ein Urteil über den Wert eines Verfahrens zu bilden.)

1. Methode von HAHN.

Das älteste in diesen Abschnitt gehörige Produkt und zugleich dasjenige, das in seiner Zusammensetzung und seinen Bestandteilenden Vollbakterien noch am nächsten stehen dürfte. sind die mittels der BUCHNERschen Presse gewonnenen Bakterienpreßsäfte von HAHN[46]).

Bezüglich der Beschreibung der BUCHNERschen Presse und Herstellung der „Bakterienplasmine" sei auf das Kapitel XVI dieses Bandes verwiesen.

Hier sei nur kurz erwähnt, daß HAHN durch Vorbehandlung mit geringen Mengen von Preßsaft bei Meerschweinchen eine lang andauernde Immunität erzeugen konnte. Er empfiehlt das Typhusplasmin sowohl zu prophylaktischer Impfung wie auch zu therapeutischen Zwecken.

2. Methode von MACFADYEN und ROWLAND.

MACFADYEN und ROWLAND[62]) haben gleichfalls, durch die Untersuchungen von BUCHNER angeregt, Preßsäfte aus Typhusbazillen hergestellt und zur Erzeugung bakterizider und agglutinierender Sera benutzt.

Ihr Verfahren das in manchen Punkten von dem BUCHNERschen abweicht, ist folgendes:

Die 36stündige Ernte von 100 Agaroberflächen (jede zu 220 qcm), die automatisch mittels eines Sprayapparates von einer 24 Stunden alten Bouillonkultur aus geimpft waren, wird mit geringen Mengen physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt; die Emulsion kommt in einen Metallzylinder (14,5 × 8 cm), der in der Mitte eine vertikal gestellte Scheidewand hat, die um ihre vertikale Achse mit 18000 Umdrehungen in der Minute

gedreht werden kann. Dabei legen sich die Bazillen als eine kohärente Schicht an die Innenwand des Zylinders und können nach Abgießen der geklärten Kochsalzlösung mit einem Spatel abgenommen werden. Durch mehrmaliges Wiederholen der Ausschleuderung mit frischer Kochsalzlösung gelingt es, die Bakterien ganz von anhaftenden fremden Bestandteilen zu befreien. Die gereinigte Bakterienpaste kommt nun, vermischt mit trockenem sterilem Silbersand, in einen Metallzylinder; dieser ist von einem Mantel umgeben, durch den Kochsalzlösung oder Wasser zirkulieren kann. Der Zylinder ist durch einen sorgfältig angepaßten Deckel geschlossen, durch den seinerseits eine vertikale Stahlachse in den Zylinder geführt ist. Diese Achse ist mit horizontal gestellten Flügeln armiert, die in die Mischung von Sand und Bakterien hineinragen. Die Flügel können mit einer Geschwindigkeit von 5000 Umdrehungen in der Minute in Bewegung gesetzt werden. Durch die dabei erzielte schnelle Zirkulation und Reibung der Sandbakterienmischung werden die Mikroorganismen innerhalb 3—4 Stunden total zertrümmert. Um die Bakterienbestandteile vom Sand zu trennen und eine reine Lösung von Typhusbazillenleibessubstanzen zu erzielen, wird durch ein Kieselgurfilter unter Druck filtriert. Die dann resultierende Flüssigkeit bezeichnen die Autoren als „ersten Preßsaft“ (first pressing).

Der Rückstand wird mit Soda oder Glyzerin ausgelaugt und mehrmals filtriert (II. und III. Preßsaft). Alle drei Preßsäfte haben antigene Fähigkeit.

Dosen von 1,0—0,1 der Preßsäfte (subkutan oder intraperitoneal) waren für Meerschweinchen ungiftig (zum Teil nur leichte Gewichtsabnahmen). Derartige Tiere waren damit gegen die sechsfache tödliche Dosis von Typhus geschützt. Dauer des Schutzes nur vier Wochen. Dagegen blieben die hohen Agglutinationswerte (Maximalwert ca. 500) länger, beim Meerschweinchen drei, beim Kaninchen neun Monate, erhalten.

Kaninchen erreichten einen bakteriziden Titer von $^1/_{50}$ (Prüfung am Meerschwein). Auch bei Affen rief die Impfung das Auftreten von Bakteriolysinen hervor.

Die geringen Folgeerscheinungen führen die Autoren auf die leichte Resorbierbarkeit des von den Bakterienmembranen befreiten, nur aus dem Zellplasma bestehenden Impfstoffes zurück, dem sie deshalb den Vorrang vor Vollbakterienvaccin geben wollen.

Der Impfstoff hält sich mit Thymolzusatz in der Kälte mindestens vier Monate.

Bereits in dieser Arbeit, ausführlicher aber in einer späteren Publikation, berichten Macfadyen und Rowland[63]) alsdann über eine weitere Methode zur Gewinnung eines Typhusimpfstoffes, bei dem die Bakterien nicht unter Verwendung von Kieselgur, sondern ohne jeden Zusatz in gefrorenem Zustand bei einer Temperatur von — 190° (Temperatur der flüssigen Luft) zermalmt werden.

Da der so resultierende Impfstoff neben Antigenen für Bakteriolysine*) im wesentlichen „Toxine“ enthält, so sei hier von einer ausführlichen Beschreibung der Methode abgesehen. (Nachprüfung durch Bassenge-Mayer[1]) und Lüdke[61]).

---

*) Es wurden Affen mit Mengen von 0,5—1,0 4—6 Wochen lang in dreitägigen Intervallen subkutan behandelt.

3. Methode Neisser-Shiga.

Neisser und Shiga haben aus Typhus- (und Dysenterie-, siehe daselbst) Bazillen ein Präparat extrahiert, dem in gleicher Weise agglutinogene und lysininogene Eigenschaft zukommt.

Verfahren von Neisser und Shiga: eine eintägige Agarkultur wird in 100 ccm 0,8% Kochsalzlösung aufgeschwemmt, eine Stunde bei 60° abgetötet, zwei Tage bis 37° der Autolyse unterworfen*) und keimfrei filtriert.

Den bei dieser Prozedur durch das Filter gegangenen Bakterienbestandteilen („freie Rezeptoren“ nach Neisser und Shiga) kommt immunisierende Fähigkeit beim Kaninchen in hohem Grade zu.

Shiga[72]) hat das Verfahren in zwei Fällen am Menschen erprobt.

Zur Bereitung des Impfstoffes wurde die Kultur in 5 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt, sonst wurde wie oben angegeben verfahren.

Shiga, der 10 Jahre zuvor einen Typhus durchgemacht hatte, aber keine spezifischen Stoffe mehr im Blut aufwies, injizierte sich in achttägigem Intervall 0,05 und 0,25 Filtrat subkutan, minimale Reaktion.

Die zweite Versuchsperson (0,1 und 0,15 Filtrat in 12 tägigem Invervall) verhielt sich ebenso.

Agglutination bei Fall I nach 8 Tagen 640 (Normal 0)
345 „ 160
Agglutination bei Fall II nach 12 Tagen $^1/_{80}$ (Normal $^1/_{10}$ 0)
90 „ $^1/_{40}$.

Die Bakterizidie wurde in vitro nach der Methode von Neisser-Wechsberg ausgewertet; im ersten daraufhin untersuchten Falle hielt sich der Titer ein Jahr hindurch auf der maximalen Höhe.

Das Verfahren von Neisser und Shiga erfuhr eine Nachprüfung durch Hetsch und Kutscher.

Die Autoren nahmen nur eine Einspritzung mit der Maximaldosis von Shigas (0,5) an drei Versuchspersonen vor.

Die Resultate weichen erheblich von denen Neisser und Shigas ab. Im Gegensatz zu Shigas Befunden war die lokale Reaktion in allen drei Fällen eine sehr ausgesprochene (starke Entrückungserscheinungen und Schmerzhaftigkeit der Impfstelle).

Hetsch und Kutscher erklären die stürmische Reaktion gerade bei Verwendung dieses Impfstoffes mit der schnellen Resorption der bei der eigentümlichen Bereitungsweise des Vaccins in Lösung gegangenen Endotoxine. In einem der Fälle waren auch die Allgemeinerscheinungen sehr ausgesprochen (Fieber 39,5).

Für die Differenzen im klinischen Verhalten der Versuchspersonen bei Hetsch und Kutscher gegenüber Shiga dürfte zum Teil der Typhusstamm verantwortlich zu machen sein, zum Teil auch die Dosierung, indem die Autoren von vornherein jene Dosis anwandten, die Shiga als Maximum für die zweite Impfung gegeben hatte.

Die Titerwerte sind bei Hetsch und Kutscher relativ geringe; maximale Werte nach 10 Tagen gegen Stamm W.:

Agglutination		Bakteriolyse	
1. Fall	$^1/_{50}$	1. Fall	$^1/_{20}$
2. „	$^1/_{20}$	2. „	$^1/_{50}$
		3. „	$^1/_{100}$.

*) Conradi[82]) hatte bereits vorher durch aseptische Autolyse ein Gift aus Typhuskulturen dargestellt.

Mit einem ähnlichen von SCLAVO[95]) bereiteten Impfstoff haben alsdann TRIGLIA und MAZZUOLI[100]) in Poggibonsi, einem von Typhus stark heimgesuchten Ort des Val d'Elsa Impfungen angestellt.

27 Individuen erhielten teils in der regio ileocoecalis, teils in der regio deltoidea sinistra in 8—10 tägigem Intervall $^1/_{10}$ und $^2/_{10}$ ccm des nach SCLAVO modifizierten NEISSER-SHIGAschen Impfstoffes.

Reaktion: Lokale Reaktion nur in geringem Maße in fast allen Fällen vorhanden.

Ausgesprochene Fieberreaktion (Maximum 39°) und stärkere Allgemeinerscheinungen wurden jedoch nur in drei Fällen beobachtet.

Serumveränderungen: Es wurde nur in einer Reihe von Fällen die Steigerung des Agglutinationswertes auf über $^1/_{50}$ konstatiert (in vielen Fällen noch nach vier Monaten).

Mit demselben Impfstoff hat COSTELLINI[22a]) in Certaldo, wo gleichfalls Typhus endemisch herrschte, 37 Personen behandelt. Die Erscheinungen waren etwa die gleichen wie sie von TRIGLIA und MAZZUOLI beobachtet wurden. Von den 37 Geimpften erkrankte einer 10 Tage nach Beginn der Vorbehandlung und sehr bald nach der zweiten Injektion an Typhus (es waren ebenso wie von TRIGLIA und MAZZUOLI nur solche Individuen geimpft worden, die, ohne selbst Typhus gehabt zu haben, in Familien lebten, in denen sich Typhuskranke befanden.

4. Methode von WASSERMANN[102]).

WASSERMANN bereitete zunächst einen Extrakt nach dem Prinzip des NEISSER-SHIGAschen Verfahrens, mit einigen Abweichungen in der Methodik. Er schwemmt die 24 Stunden alte Agarkultur in destilliertem Wasser auf (30 ccm Aqu. dest. auf eine Agarmassenkultur), tötet 24 Stunden bei 60° ab und autolysiert fünf Tage bei 37°.

Das keimfreie Filtrat verwendet er nicht direkt, sondern dampft es zunächst im Vakuumapparat zum Trocknen ein.

Das bei dieser Prozedur resultierende Pulver stellt den Impfstoff dar, der, in Glasröhrchen eingeschlossen, seine antigene Qualität nach Versuchen an Kaninchen mindestens drei Monate lang bewahrt und gute bakterizide Titer, bei Dosen von fünf Milligramm bis 0,02 erzeugt.

Einen Vorteil seines Impfpulvers sieht WASSERMANN in der Wägbarkeit, also genauen Dosierbarkeit.

Am Menschen wurde das WASSERMANNsche Verfahren durch HETSCH und KUTSCHER an sechs Personen (einmalige Injektion) geprüft.

Die örtlichen und allgemeinen Erscheinungen waren minimal. Die geringe lokale Rötung und Schwellung, die sechs bis acht Stundnn nach der Impfung eintrat, war in 24—48 Stunden vollständig geschwunden, nur in einem Fall trat eine leichte Temperatursteigerung ein (37,6).

Trotz dieser minimalen Reaktion war die Antikörperbildung nicht unbeträchtlich, was um so bemerkenswerter erscheint, als doch sonst HETSCH und KUTSCHER einen engen Zusammenhang zwischen Antikörperbildung und Fieberreaktion annehmen.

Maximale Werte gegenüber Stamm W. 10 Tage nach der Injektion.
Agglutination sechsmal 1/50. Bakteriolyse dreimal 1/100.
dreimal 1/50.

5. Methode von Brieger und Mayer[15]).

Der erste, der eine gänzliche Trennung der Bakteriolysin- und Agglutininantigene erreicht hat, war Brieger[10]). Allerdings gelang ihm nur die Isolierung der Agglutinine antigene, wie die Prüfung seines Präparates durch Schütze[92]) dartut. (Näheres s. im Kapitel Agglutinine.)

Später hat er durch Modifikationen seiner Methode in Gemeinschaft mit Mayer einen neuen Impfstoff gegen Typhus dargestellt.

Brieger und Mayer gingen bei der Bereitung ihres Impfstoffes von der Anschauung aus, daß bei einer Extraktion der Typhusbazillen mit destilliertem Wasser nur die Antigene für Bakteriolysine und Agglutinine in Lösung gingen, während die giftigen Endotoxine erst bei einer nachfolgenden Autolyse in Freiheit gesetzt würden.

Sie empfehlen deshalb eine schonende Behandlung der Typhusbakterien mit Aqu. dest. und baldige nachherige Abfiltrierung der in Lösung gegangenen Antigene von den Bazillenleibern durch keimdichte Kerzen.

Die Extraktion der Antigene fand schon bei niederer Temperatur statt, ist aber bei höheren Temperaturen stärker nnd besonders reichlich bei Verwendung des Schüttelapparates.

Die Schüttelextrakte sind im Gegensatz zu den Autolysaten für das Kaninchen sehr wenig giftig.

Die Titer, die beim Kaninchen mit derartigen Extrakten erzielt werden, sind sehr hohe, selbst bei Verwendung kleiner Dosen.

Das Verfahren von Brieger und Meyer wurde zuerst durch Bassenge und Meyer[2]) an neun Versuchspersonen praktisch angewendet.

Bassenge und Meyer nehmen an, daß der Pfeiffer-Kollesche Impfstoff infolge autolytischer Prozesse in den bei 60° abgetöteten Bakterien sich mit zunehmendem Alter in unkontrollierbarer Weise verändert (zunehmende toxische Wirkung infolge der Autolyse, welche überhaupt die Giftwirkung stärker hervortreten lassen soll), während sie ihren Impfstoff nach der Natur seiner Zubereitung für unveränderlich halten.

Aus mehreren verschiedenen Typhusstämmen hergestellte Impfstoffe fanden die Autoren weniger wirksam, weshalb sie im weiteren Verlaufe ihrer Versuche sowohl zur Impfstoffbereitung als zur Auswertung ausschließlich einen Stamm von ca. $^1/_{30}$ Ösen Virulenz benutzten.

Dosis des Impfstoffes: Ursprünglich wurde die Ausbeute aus $^1/_5$ Agarkultur benutzt, da diese jedoch zur Erzeugung eines genügenden Titers bei einmaliger Injektion als unzureichend sich erwies, wurde die Dosis auf das Sechsfache gesteigert.

Es ist gelungen, diese Impfstoffe derartig zu konzentrieren (Einengung im Vakuum, nähere Angaben fehlen), daß eine Dosis von 2 ccm die wirksamen Substanzen einer ganzen Kultur enthält. Es genügt einmalige Injektion.

Die Einspritzung wurde in den linken Vorderarm oder in die linke Brustseite, in einem Falle am Abdomen vorgenommen; doch erwies sich letztere Injektionsstelle als gänzlich ungeeignet.

Die lokalen Symptome (Schwellung und Röte) sind durchgehends vorhanden, aber sehr geringfügig.

Auch die Allgemeinerscheinungen sind relativ mild und fehlen zuweilen ganz. Ausgesprochene Temperatursteigerungen wurden nur in drei Fällen (38,4; 38,5; 37,8) beobachtet.

Serumveränderungen. Es wurden namentlich bei größeren Dosen (Ausbeute aus einer Agarkultur) sehr erhebliche Werte sowohl

für Agglutination (bis $^1/_{2500}$) wie auch für Bakteriolyse (einmal $^1/_{1000}$, zweimal $^1/_{2000}$, einmal $^1/_{10000}$) erzielt. (In den anderen fünf Fällen, in denen allerdings meist kleine Dosen des Impfstoffes mehrmals verabreicht wurden, waren die Werte bedeutend geringer.)

Auffallend ist die Tatsache, daß namentlich bei den ersten Fällen, in denen wiederholt mit kleineren Dosen geimpft wurde, die bakteriziden Titerwerte einen ganz allmählichen Anstieg erfuhren.

Z. B. in Fall 4 11 Tage nach der Injektion $^1/_{50}$
18 „ „ „ „ $^1/_{100}$
8—10 Wochen „ „ „ $^1/_{1000}$.

In einem Falle wurde noch nach sechs Monaten ein Titer von $^1/_{100}$ beobachtet.

Die Versuche von Bassenge und Meyer erfuhren in jüngster Zeit eine Nachprüfung durch Bischoff[9]) an 22 Versuchspersonen.

Es sei ausdrücklich hervorgehoben, daß Bischoff ausschließlich den von Bassenge und Meyer selbst hergestellten und auch von diesen Autoren benutzten Impfstoff in Anwendung zog.

Zum Vergleich wurden 14 Personen mit dem Impfstoff von Kolle (bezogen vom Institut für Infektionskrankheiten) geimpft.

Dosis des Impfstoffes von Kolle . . . . 0,3—0,5 ccm = 0,6—1 Öse
„ „ „ „ Bassenge und Meyer 2 ccm des eingeengten Impfstoffes.

Symptome. Namentlich lokale, aber auch die allgemeinen Reaktionen waren bei Injektion des Bassenge und Meyerschen Impfstoffes geringere als beim Pfeiffer-Kolleschen.

Die hohen Titerwerte, die Bassenge und Meyer gefunden hatten, konnte Bischoff nicht bestätigen.

Der bakterizide Titer lag bei seinen Versuchspersonen niemals über 200—500, meist war er erheblich geringer; bei einigen erreichte er noch nicht 50. Auch bezüglich der allmählichen Steigerung des Bakteriolysingehaltes der Sera und bezüglich der langen Dauer des Impfschutzes vermochte Bischoff die Angaben von Bassenge und Meyer nicht zu bestätigen.

6. Methode der Herstellung von Bakteriensubstanzen nach Bergell und Meyer[4]).

Bergell und Meyer glauben durch Behandlung von getrockneten Typhusbakterien mit wasserfreier Salzsäure bei niederer Temperatur (—86°) eine Methode gefunden zu haben, welche eine Isolierung „der Antigene durch partielle Zerstörung der einzelnen Stoffe bezweckt".

Vier große Schalen von je 300 ccm Flächeninhalt werden mit Asciteskieferagar gefüllt und mit Typhus geimpft. Bebrütung 8 Stunden bei 37°. Nach zwei Tagen wird die Ernte in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und sedimentiert; der Bodensatz wird zentrifugiert und mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Das Sediment wird im Vakuum bei $< 40^0$ getrocknet. Die getrockneten Bakterienleiber werden nunmehr mit wasserfreier Salzsäure, die durch flüssige Luft kondensiert war, behandelt. Das flüssige Gas wird unter Vermeidung von Wasserzutritt verdampft. Extraktion des Rückstandes mit physiologischer Kochsalzlösung auf der Schüttelmaschine. Filtration durch Berkefeldkerzen. (Genauere Angaben über das Mengenverhältnis der einzelnen Substanzen fehlen.)

Die Lösung wurde am Tier auf Giftigkeit und Antigengehalt (für Agglutination und Bakterizidie geprüft).

Von einer Lösung, von der 2 ccm der Ausbeute einer Platte entsprachen, waren intraperitoneal für Mäuse 0,5, für Meerschweinchen bis 5,0, für Kaninchen bis 10,0 unschädlich. Dosen von $^1/_2$—10 ccm machen beim Kaninchen nur geringe Temperatursteigerungen.

Agglutination: nach zwei intravenösen Injektionen $^1/_{100}$—$^1/_{1000}$ bei einem 12 mal mit größeren Mengen vorbehandelten Hammel $^1/_{3000}$.

Bakterizider Titer bei einem vorbehandelten Hammel $^1/_{1000}$.

Die Autoren empfehlen ihr Präparat, welches den Vorzug „großer Ungiftigkeit neben sicheren immunisatorischen Eigenschaften besitzt", auch zur aktiven Immunisierung des Menschen.

Versuche in dieser Richtung sind noch nicht angestellt.

7. Serumvaccination nach Besredka[5]).

Sowohl die aktive wie die passive Immunisierung haben gewisse Nachteile. Bei der passiven Immunisierung tritt der Schutz sehr bald nach Einverleibung des Immunserums ein, ist aber, wie das aus den Untersuchungen von A. Schütze[93]) sowie Pfeiffer und Friedberger[77]) sich ergibt, besonders bei Verwendung heterologer Immunsera nur von sehr kurzer Dauer.

Andrerseits wird zwar bei aktiver Immunisierung ein Schutz für lange Zeit hin erzielt, doch treten die Schutzkörper erst relativ spät nach stattgehabter Impfung auf, ja der Impfung soll nicht selten zunächst eine Periode erhöhter Empfindlichkeit folgen (negative Phase).

Diese Umstände veranlaßten Besredka, auch für die Typhus-Schutzimpfung eine Methode der Immunisierung zu suchen, die die Vorteile beider Prinzipien ohne ihre Nachteile darbot.

Er fand sie in der Kombination beider Verfahren, d. h. in der Serovaccination, die ja schon zuvor für andere Infektionskrankheiten mit Erfolg angewandt war. (Lorenz, Leclainsche und Morel.)

Dabei beschränkte er sich darauf, nur soviel vom Immunserum gleichzeitig mit dem Impfstoff zu injizieren, als von den Bakterien bei vorherigem Kontakte mit dem Serum gebunden wurde.

Aufschwemmung 48 stündiger Agarkulturen in möglichst wenig physiologischer Kochsalzlösung. Zusatz des homologen Immunserums. Nach 12 stündigem Kontakt (Agglutination) wird das Serum abgegossen, die Bakterien werden mehrmals in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (die Waschung darf nach Besredka nicht zu lange dauern, da die lange Mazeration in physiologischer Kochsalzlösung die Wirksamkeit des Impfstoffes beeinträchtigt), darnach eine Stunde bei 56° abgetötet.

Ein derartig präparierter Impfstoff ruft zunächst beim Versuchstier selbst in großen Dosen bei subkutaner Injektion nicht die Entzündungserscheinungen hervor, wie die gleiche Menge unbeladenen Impfstoffes.

Bereits 24 Stunden nach der subkutanen Injektion der beladenen Bakterien (eine Kultur) ist das Meerschweinchen immun.

Die Dauer der Immunität beträgt sicher wenigstens fünf Monate.

Auch durch Triglia und Mazzuoli (l. c.) wurde die Serovaccination mit einem Präparat von Sclavo in 98 Fällen ausgeführt (s. auch pag. 764). Der Impfstoff bestand aus einer Lösung „freier Receptoren", die zu gleichen Teilen mit Serum eines immunisierten Schafes versetzt war. Es wurde zweimal in 8—10 tägigen Intervallen in der regio deltoidea 0,5 ccm subkutan gegeben (junge Leute weniger).

Die Entzündungserscheinungen waren i. R. nicht sehr heftig; bemerkenswert ist aber das häufige Auftreten eines Serumexanthems. SCLAVO führt es auf das artfremde Schafserum zurück und hofft es bei Verwendung eines für den Menschen geeigneteren Immunserum vom Esel vermeiden zu können.

Allgemeinerscheinungen fehlten in vielen Fällen und waren nur in wenigen heftiger ausgesprochen.

Der Erfolg der Serovaccination war wie bei der vorher besprochenen Impfung mit dem SHIGAschen Impfstoff ein zufriedenstellender, wenigstens erkrankte keiner der Geimpften an Typhus, obwohl sie in einem verseuchten Gebiete lebten.

Verfahren der aktiven Immunisierung zu therapeutischen Zwecken.

Es sei hier anhangsweise noch kurz eine Reihe von Verfahren besprochen, bei denen die Impfung nicht zur Erzeugung eines Schutzes gegen die Infektion erstrebt wurde, sondern eine Bildung von Antikörpern im Organismus zu dem Zwecke beabsichtigt wurde, um durch die künstliche Immunisierung den an und für sich sehr langsam verlaufenden Infektionsprozeß bei Typhus zu überholen und damit zum Schwinden zu bringen, also eine Immunisierung nicht vom prophylaktischen, sondern vom therapeutischen Gesichtspunkt aus. Der erste, der diese Methode anwendete, war E. FRÄNKEL [35]). Er berichtet über die Impfung bei 57 Patienten, mit einem nach BRIEGER, WASSERMANN und KITASATO bereiteten und bei 63° abgetöteten Impfstoff. Die Injektion geschah in der Glutäalgegend. Lokale Reaktion war nicht zu verzeichnen. Dosis am ersten Tage $^1/_2$ ccm Bouillonkultur-Impfstoff, am folgenden Tage 1 ccm. Darauf erfolgte Temperaturabfall. Sobald ein neuer Anstieg der Temperatur zu verzeichnen war, wurden 2 ccm des Impfstoffes gegeben. War der Verlauf der Temperaturkurve noch nicht befriedigend, so wurden in zweitägigen Intervallen steigende Dosen verabfolgt. FRÄNKEL sah bei dieser Behandlung eine günstige Beeinflussung der Temperatur und des Allgemeinbefindens.

Der von FRÄNKEL [28]) behauptete günstige Effekt der Impfung ist von anderer Seite angezweifelt worden. BUCHNER [17]) führt ihn zum Teil wenigstens auf den Einfluß der Thymusbouillon allein zurück, die auf die Leukozyten eine ausgesprochen chemotaktische Wirkung haben soll. RUMPF [86]), sowie RUMPF und WILKENS [87]) erhielten die gleichen Resultate bei Typhus, wenn sie statt Typhuskulturen Poycyneus verwendeten. Ja, PRESSER [85]) sah mit Pyocyneus bessere Resultate.

Verfahren von PETRUSCHKY [73]). PETRUSCHKY nimmt an, daß in den Anfangsstadien der Krankheit die Verteilung des „Typhustoxins" (er meint wohl Endotoxin) im Organismus keine gleichmäßige ist, daß vor allem Milz und Darm damit belastet sind, noch nicht aber das Knochenmark.

Er injiziert deshalb seinen Typhusimpfstoff („Typhoin"), der in 1 ccm etwa 100 Millionen abgetötete Typhusbazillen enthält (nähere Angaben über die Bereitung fehlen), in die untere Extremität an drei aufeinander folgenden Tagen Vormittag und Nachmittag.

Dosen:						
	Vormittag . . .	0,05	Vormittag . . .	0,15	Vormittag . . .	0,2
	Nachmittag . . .	0,1	Nachmittag . . .	0,2	Nachmittag . . .	0,3

In einzelnen Fällen wurde der Impfstoff mit Serum gemischt gegeben (Serovaccination). Eine deutliche Beeinflussung des Krankheitsverlaufes ist aus den mitgeteilten 17 Krankengeschichten nicht ersichtlich. Eine Nachprüfung der Methode scheint nicht erfolgt zu sein.

Jez[47]) erstrebte eine Art von Immunisierung während des Krankheitsprozesses durch eine antitoxische und antibakterielle Organotherapie.

Er geht dabei von den Versuchen von Pfeiffer und Marx[82a]), sowie von Wassermann[103a]), über die Bildungsstätte der Antikörper bei Typhus und Cholera aus und verfüttert an typhuskranke Menschen diejenigen Organe immunisierter Tiere, welche nach diesen Autoren als die Bildungsstätte der Antikörper anzusehen sind.

Herstellung des Präparates.

Immunisierung von Kaninchen durch intraperitoneale Injektion von Typhusbazillen (ältere Kulturen in mehrtägigen Intervallen). Waren die Tiere gegen ein Multiplum der tödlichen Dosis sicher geschützt, so werden sie zwei bis drei Tage nach der letzten Vorbehandlung getötet. Thymus, Milz, Knochenmark, Gehirn, Rückenmark werden fein zerschnitten, im Mörser mit einer Lösung, bestehend aus Kochsalz, Alkohol, Glyzerin und einer kleinen Menge Karbol verrieben, eventuell unter Zusatz geringer Pepsinmengen. Detaillierte Angaben über die Mengenverhältnisse der einzelnen Bestandteile fehlen gänzlich. Später hat Walker nähere Angaben in dieser Richtung gemacht. Am 13. Tage nach einer sechsmaligen spezifischen Vorbehandlung in zweitägigen Intervallen, verrieb er die zerstückelten Organe mit der 10fachen Menge einer Flüssigkeit von folgender Zusammenstellung:

Pepsin . . . . . 2 g Glyzerin . . 30 Tropfen
Kochsalz . . . . . 6 g Alkohol . . . . 100 g
Destilliertes Wasser . . 900 g.

Die Masse bleibt 24 Stunden auf Eis stehen, wird dann filtriert, die klare Filtrationsflüssigkeit stellt den Antityphusextrakt dar.

Bei der Verabreichung per os (zweistündlich einen Kinder- bis Eßlöffel voll, bis zur Gesamtmenge von 200—300 ccm), war die Einwirkung auf den Typhusprozeß nach Jez eine sehr günstige.

Jez und Kluczicki[48]) bestätigten in einer späteren Mitteilung die früheren günstigen Resultate. Auch Eichhorst[29a]) spricht sich anerkennend aus, desgleichen Esslinger[31]), wenn auch nicht uneingeschränkt. Bei einem Teile der Fälle versagte der Extrakt gänzlich.

Prometta[83]) sah keine eindeutig guten Resultate.

Markl[64]) kommt bei seinen Untersuchungen mit Extrakt im Tierversuch zu dem Resultat, daß die Schutzstoffe in den Organextrakten in geringerer Menge vorhanden sind, als im Serum der betreffenden Tiere und daß ihre Wirkung keine antitoxische, sondern eine antiinfektiöse sei.

Literatur.

1) Bassenge und Meyer, Zur Toxingewinnung aus gefrorenen Typhusbazillen. Centralbl. für Bakt. Abt. I, Bd. XXXVI, p. 332.
2) Dies., Zur Schutzimpfung gegen Typhus. Deutsche med. Wochenschr. 1905, pag. 697.
3) Bassenge und Rimpau, Über aktive Immunisierung des Menschen gegen Typhus. Festschr. zum 60. Geburtstag R. Kochs 1904, pag. 315. Jena, Fischer.
4) Bergell und Meyer, Über eine neue Methode zur Herstellung von Bakteriensubstanzen, welche zu Immunisierungszwecken geeignet sind. Med. Klinik 1906, Nr. 16.

5) Besredka, De l'Immunisation active contre la peste, le Choléra et l'infection typhique. Annales-Inst. Pasteur 1904, Tome XVI, p. 918. Cfr. auch Compt. rend, de l'Acad. des Sciences 1902, p. 1330.
6) Besserer und Jaffé, Über Typhuskulturen, die sich den Immunitätsreaktionen gegenüber atypisch verhalten. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 51.
7) Beumer und Peiper, Bakteriologische Studien über die ätiologische Bedeutung der Typhusbazillen. Zeitschr. für Hyg. 1886, Bd. I, pag. 489. Ibid. Bd. II, pag. 110.
8) Dies., Über die immunisierende und heilende Wirkung antitoxischen Hammelserums gegen das Typhusgift. Zeitschr. für klin. Med., Bd. XXVIII, p. 328.
9) Bischoff, Das Typhusimmunisierungsverfahren nach Brieger. Zeitschr. für Hygiene 1906, Bd. LIV, p. 262.
10) Bitter, Über die Festigung von Versuchstieren gegen die Toxine der Typhusbazillen. Zeitschr. für Hygiene 1892, Bd. XII, p. 398.
11) Brieger, Über die Darstellung einer spezifisch wirkenden Substanz aus Typhusbakterien. Deutsche med. Wochenschr. 1902, p. 477.
12) Ders., Über Schutzimpfungen gegen Typhus und Cholera. Verhandlungen des deutschen Kolonialkongresses 1905, p. 182.
13) Brieger, Kitasato und Wassermann, Über Immunität und Giftfestigung. Zeitschrift für Hygiene 1892, Bd. XII, p. 137.
14) Brieger und Ehrlich, Beiträge zur Kenntnis der Milch immunisierter Tiere. Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIII, pag. 336.
15) Brieger und Meyer, Weitere Versuche zur Darstellung spezifischer Substanzen aus Bakterien. Deutsche med. Wochenschr. 1903, p. 309.
16) Bruschettini, Sulla immunita contra il tifo. Riform. med. 1892, Vol. VIII, p. 361.
17) Buchner, Referat der Fränkelschen Arbeit (Nr. 35). Münchener med. Wochenschrift 1893, pag. 814.
18) Bulloch, Transact. of Path. Soc. London 1901.
18a) Cagley, A note on the value of inoculation against cuteris fever. Brit. med. Journ. 1901, pag. 84.
19) Chantemesse et Vidal, De l'Immunité contre le virus de la fièvre typhoide. Ann. de l'Inst. Pasteur 1888, Tome II, pag. 54.
20) Dies., Étude expérimentale sur l'infection typhique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, Bd. IV, p. 755.
21) Cloetta, Über die Ursache der Angewöhnung an Arsenik. Arch. für exper. Pathol. und Pharm., Bd. LIV, p. 196.
22) Conradi, Über lösliche und durch aseptische Autolyse erhaltene Giftstoffe von Ruhr- und Typhusbazillen. Deutsche med. Wochenschr. 1903, p. 26.
22a) Costellini, Prove di vaccinatione antitifica nell' Momo. Rivista critica di Clinica med. 1905, Nr. 40—42.
23) Crombie, Some statistics regarding the effect of inoculation against typhoid fever in South Africa. Lancet 1902, 3. Mai,p. 1241.
24) Ders., Some further statistics regarding the effect of inoculation against typhoid fever in South Africa. Lancet 1902, 16. Aug., p. 426.
25) Curschmann, Der Unterleibstyphus. Nothnagels spezielle Pathologie u. Therapie, Bd. III.
26) Dziergowski, Sitzungsbericht der mikrobiolog. Gesellschaft zu St. Petersburg 1904, 31. Mai.
27) Dungern, v., Die Antikörper. Jena 1903, G. Fischer.
28) Eichholz, Einige Erfahrungen über den Typhusverlauf bei geimpften und nichtgeimpften Mannschaften der Schutztruppe für Deutsch-Südwestafrika. Münch. med. Wochenschr. 1907, p. 777.
29) Eichhorst, Die Typhusepidemie in Zürich während des Sommers 1884. Deutsches Arch. für klin. Med., Bd. XXXIX, pag. 271.
29a) Ders., Über die Diät bei Abdominaltyphus. Therapeut. Monatshefte 1900.
30) Elliot und Washburn, Sitzung der med. Soc. 1901, 28. Okt.
31) Esslinger, Behandlung des Abdominaltyphus mit dem Antityphusextrakt Jez. Inaug.-Diss. Zürich 1901.
32) Foord-Caiger, The Bradshaw lecture on the treatment of enteric fever. Lancet 1904, 26. Nov., Nr. 19, pag. 1467.
33) Foulerton, Preventive inoculation against typhoide fever. Lancet 1900, Bd. I, p. 1578.
34) Ders., On the Serum treatment of Enteric fever and Bacterial prophylactic. inoculation. Middesex. Hosp. Journ. 1899, Nr. 4.
35) Fränkel, E., Über spezifische Behandlung des Abdominaltyphus. Deutsche med. Wochenschr. 1893, Nr. 41.

36) Fränkel und Simmonds, Die ätiologische Bedeutung des Typhusbazillus. Hamburg 1886.
37) Friedberger, Über die Agglutininreceptoren eines frisch aus dem Stuhl gezüchteten Typhusstammes. Festschrift zum 60. Geburtstag von E. Salkowski. Berlin 1904, p. 471.
38) Ders., Über die Immunisierung von Kaninchen gegen Cholera durch intravenöse Injektion minimaler Mengen abgetöteter Vibrionen. v. Leyden-Festschr. Bd. II.
39) Ders., Die spezifischen Blutveränderungen bei Cholerabazillenzwischenträgern. Centralbl. für Bakt., Abt. I, Bd. XL, p. 405. Siehe auch Verhandl. der ersten Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie.
40) Ders., Verhandlungen des deutschen Kolonialkongresses 1905, p. 211.
41) Friedberger und Moreschi, Vergleichende Untersuchungen über die aktive Immunisierung von Kaninchen gegen Cholera und Typhus. Centralbl. f. Bakt., Abt. I 1905, Bd. XXXIX, p. 453.
42) Dies., Beitrag zur aktiven Immunisierung des Menschen gegen Typhus. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 49.
43) Dies., Über Rassendifferenzen von Typhusstämmen. Berliner klin. Wochenschr. 1905, p. 1409.
44) Gaffky, Kolle, Hetsch, Kutscher, Über Typhusschutzimpfungen. Klinische Jahrb. 1905, Bd. XIV, pag. 124.
45) Gottschlich, F., Über Cholera und choleraähnliche Vibrionen unter den aus Mekka zurückkehrenden Pilgern. Zeitschr. für Hyg. 1906, Bd. LIII, pag. 281.
46) Hahn, Immunisierungs- und Heilversuche mit plasmatischen Zellsäften von Bakterien. Münchener med. Wochenschr. 1897, p. 1347.
46a) Harrison, Reports on the results of experiments in connection with antityphoid vaccine. Journ. of the Royal Army med. corp. 1907. Mai. Zit. nach Deutsche militärärztl. Zeitschr. 1907, pag. 713.
47) Jez, Über Typhusbehandlung (Abdominaltyphus) mit einem Antityphusextrakt. Wiener med. Wochenschr. 1899, pag. 346.
48) Jez und Kluczicky, Zur Therapie des Abdominaltyphus mit Jez' „Antityphusextrakt“. Wiener klin. Wochenschr. 1902, Bd. XIV, pag. 4.
49) Isaeff, Untersuchungen über die künstliche Immunität gegen Cholera. Zeitschr. für Hygiene 1894, Bd. XVI, p. 287.
50) Jörgensen und Madsen, The Fote of thyphoid and choleraagglutinins during active and passive immunisation. Festschr. zur Einweihung des Seruminstitutes, Kopenhagen 1902.
51) Jürgens, Uber die Entstehung der Typhusimmunität. Berliner klin. Wochenschr. 1905, p. 141.
52) Kolle und Lentz, zit. nach Lentz in Handbuch der pathog. Mikroorg. von Kolle-Wassermann, Bd. IV, p. 881.
53) Kolle und Meineke, Untersuchungen an den in El Tor isolierten Vibrionenkulturen. Klin. Jahrb. 1906, Bd. XV, p. 151.
54) Kraus, v. Volk, Verhandl. des internationalen Dermatologenkongresses in Bern.
55) Kraus und Pribram, Zur Frage der Toxinbildung des Choleravibrion. Wiener klin. Wochenschr. 1905, p. 999 und Centralbl. für Bakt. 1906, 1907.
55a) Kuhn, Weitere Beobachtungen über die Ergebnisse der Typhusschutzimpfung in der Schutztruppe für S.-W.-Afrika. Deutsche militär. Zeitschr. 1907, H. 8.
56) Leishmann, Harrison, Smalmann und Tuloch, An investigation upon Blood changes folowing Antityphoidinoculation. Journ. of Hyg. 1905, Vol. V, p. 380.
56a) Leishmann, The progress of antityphoid inoculation in the Army. Journ. of the Royal Army med. corp. 1907. Mai Zit. nach Deutsche militärärztliche Zeitschr. 1907, pag. 713.
57) Levy und Blumenthal, Über die bakterizide Wirkung des Zuckers; Immunisierung vermittels trockener, durch Galaktose abgetötete Typhusbazillen. Med. Klinik 1906, p. 411.
58) Levy, Blumenthal und Marxer, Abtötung und Abschwächung von Mikroorganismen durch chemisch indifferente Körper. Centralbl. für Bakt. 1906, 1. Abt., Bd. XLII, pag. 265.
59) Löffler, Über Immunisierung per os. v. Leuthold-Gedenkschrift, Bd. I, p. 1.
60) Ders., Über ein neues Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern. Deutsche med. Wochenschr. 1904, p. 1913.
60a) Luxmoore, Report on the outbreak of enteric fever and effect of antityphoid inoculation among the 17th Lancer-Meerut India. Journ. of the Royal Army med. corp. 1907. Mai. Cit. nach Deutsche militärärztl. Zeitschr. 1907, p. 713.
61) Lüdke, Untersuchungen über die bazilläre Dysenterie. 1. Über das Dysenteriegift. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII, pag. 289.

62) Macfadyen und Rowland, Upon the intracellular constituents of the typhoid bacillus. Centralbl. für Bakt., Abt. I, Bd. XXX, p. 753.
63) Dies., Upon the intracellular constituents of the typhoid bacillus. Centralbl. für Bakt. 1903, Abt. I, Bd. XXXIV, p. 618.
64) Markl, Experimentelle Untersuchungen über das Typhusextrakt Jez'. Wiener klin. Wochenschr. 1902, pag. 65.
64a) Marsden, Inoculation with typhoid vaccine as a preventive of typhoid fever. Brit. med. Journ. 1900, Vol. I, pag. 1017.
64b) Melville, Report on 295 Cases of enterir fever general hospital „Tin Town" Ladysmith. Brit. med. Journ. 1901, 20. April, p. 952.
65) Mertens, Beiträge zur Immunitätsfrage. Deutsche med. Wochenschr. 1901, pag. 181.
66) Morgenroth, Über den Antikörper des Labenzyms. Centralbl. für Bakt. 1901, 1. Abt., Bd. XXVI, pag. 349.
67) Nathan Larvier, Prophylaxie de la fièvre typhoide par le Vaccin de Wright. Presse médicale 1904, pag. 779.
68) Neisser und Shiga, Über freie Receptoren von Typhus- und Dysenteriebazillen und über Dysenterietoxin. Deutsche med. Wochenschr. 1903, p. 61.
69) Neisser und Wechsberg, Über die Wirkungsart bakterizider Sera. Münchener med. Wochenschr. 1901, p. 697.
70) Netter, Les inoculations préventives contre la fièvre typhoide. Bulletin des Annal. Inst. Pasteur, Tome IV, No. 21—24, p. 873.
71) Oberkommando der Schutztruppen. Beobachtungen über Ergebnisse der Typhus-Schutzimpfung in der Schutztruppe für Südwestafrika. Archiv f. Schiffs- und Tropenhygiene 1905, Bd. IX, p. 527.
72) Osborne, Hospital arrangements in the South African rar. Lancet 1900, 21. April, p. 1158.
73) Petruschky, Versuche zur spezifischen Behandlung des Typhus abdominalis. Zeitschr. für Hygiene, Bd. XL, p. 567.
74) Pfeiffer, R., Untersuchungen über das Choleragift. Zeitschr. für Hygiene 1899, Bd. XI, p. 393.
75) Pfeiffer und Wassermann, Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität. Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIV, pag. 46.
76) Pfeiffer, Weitere Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität und über spezifisch bakterizide Prozesse. Zeitschr. für Hygiene 1894, Bd. XVIII, pag. 1. — Weitere Mitteilungen über die spezifischen Antikörper der Cholera. Ibidem, Bd. XX, pag. 198.
77) Pfeiffer und Friedberger, Über den Verbleib der bakteriolytischen Immunkörper im tierischen Organismus nach der passiven Immunisierung. Centralbl. für Bakt. 1904, 1. Abt., Bd. XXXVII, pag. 131.
78) Pfeiffer und Isaeff, Über die Spezifität der Choleraimmunisierung. Deutsche med. Wochenschr. 1894, Nr. 13, p. 305.
79) Dies., Über die spezifische Bedeutung der Choleraimmunität. Zeitschr. für Hygiene 1894, Bd. XVII, p. 355.
80) Pfeiffer und Kolle, Über die spezifische Immunitätsreaktion der Typhusbazillen. Zeitschr. für Hyg. 1896, Bd. XXI, p. 203.
81) Dies., Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Schutzimpfung des Menschen gegen Typhus abdominalis. Deutsche med. Wochenschr. 1896, p. 735.
82) Pfeiffer und Marx, Über Schutzimpfungen gegen Cholera und Typhus mit konserviertem Impfstoff. Deutsche med. Wochenschr. 1898, p. 489.
82a) Dies., Die Bildungsstätte der Choleraschutzstoffe. Zeitschr. für Hygiene 1898, Bd. XXVII, pag. 272.
83) Pometta, Zur Behandlung des Abdominaltyphus mit dem Antityphusextrakt von Jez. Wiener med. Wochenschr. 1901, Nr. 28, pag. 1351.
84) Ders., Bemerkungen zur Behandlung des Abdominaltyphus mit dem Antityphusextrakt von Jez. Korrespondenzbl. für Schweizer Ärzte 1901, pag. 757.
85) Presser, Über die Behandlung des Typhus abdominalis mit Injektionen von Kulturflüssigkeiten des Bacillus typhi und Bacillus pyocyaneus. Zeitschr. für Heilkunde 1895, Bd. XVI, pag. 113.
86) Rumpf, Die Behandlung des Typhus abdominalis mit abgetöteten Kulturen des Bacillus pyocyaneus. Deutsche med. Wochenschr. 1893, Nr. 43.
87) Rumpf und Wilkens, Jahrbuch der Hamburger Staatskrankenanstalt 1893—94, Bd. II, pag. 77.
88) Sachs, Über die Vorgänge im Organismus bei der Transfusion fremdartigen Blutes. Archiv für Anat. und Physiol. 1903.
89) Salomonsen und Madsen, Recherches sur la marche de l'immunisation active contre la Diphthérie. Ann. de l'Inst. Pasteur 1897, pag. 315.

90) Sanarelli, Études sur la fièvre typhoide expérimentale. Ann. de l'Inst. Pasteur 1894, Tome VIII, p. 193 u. 353.
91) Schian, Die Bekämpfung des Typhus im Hererofeldzug.
92) Schütze, Über die spezifische Wirkung einer aus Typhusbakterien gewonnenen Substanz im tierischen Organismus. Deutsche med. Wochenschr. 1902, p. 478.
93) Ders., Über das Verschwinden verschiedenartiger Immunsera aus dem tierischen Organismus. Festschrift zum 60. Geburtstag R. Kochs, pag. 657.
94) Shiga, Über aktive Immunisierung von Menschen gegen den Typhusbazillus. Berliner klin. Wochenschr. 1904, p. 79.
95) Sclavo, Di un primo experimento publico di vaccinazzione antitifica eseguita in Italia. Rivista critica di Clinica medica 1905, Nr. 40.
96) Sirotinin, W., Die Übertragung von Typhusbazillen auf Versuchstiere Zeitschr. für Hygiene, Bd. I, p. 465.
97) Smith, Six month with a military hospital in South Africa. Med. Chronicle 1901. Zit. nach Lancet 1901, Vol. I, p. 508.
98) Steudel, Über die Entstehung und Verbreitung des Typhus in Südwestafrika, sowie über die bisher erzielten Erfolge der Schutzimpfung. Verhandlungen des deutschen Kolonialkongresses 1905, p. 191.
99) Stern, R., Über Immunität gegen Abdominaltyphus. Deutsche med. Wochenschr. 1892, Nr. 37, p. 827. — Über die Wirkung des menschlichen Blutserums auf die experimentelle Typhusinfektion. Zeitschr. für Hygiene 1894, Bd. XVI, p. 458.
100) Triglia und Mazzuoli, Trove di vaccinatione anti tifira nell nomo. Clin. med. Ital. 1905, p. 114.
101) Walker, On the production and specific treatment of typhoid infection in Animals. Journ. of Pathol. and Bakt. 1901, Vol. VII, pag. 375.
102) Wassermann, Zur aktiven Immunisierung des Menschen. Festschr. zum 60. Geburtstag von R. Koch, pag. 527. Fischer, Jena 1904.
103) Ders., Mode d'action et origine des substances actives des serums préventifs et des serums antitoxiques. Compt. rend. d. XIII. Congr. d'hygiène. Brüssel 1903, Tome II.
103a) Ders., „Weitere Mitteilungen über Seitenkettenimmunität". Berliner klin. Wochenschr. 1898, pag. 209.
104) Wassermann und Citron, Die lokale Immunität der Gewebe und ihre praktische Wichtigkeit. Deutsche med. Wochenschr. 1905, p, 572. — Über die Bildungsstätte der Typhusimmunkörper. Zeitschr. für Hygiene 1905, p. 331.
105) Wilson, Antityphoid-Vaccine. Brit. med. Journ. 1900, Vol. I, p. 1018.
106) Wooldridge, Note on protection in Antrax. Proceed. of the R. Soc. London 1887, Vol. XLII, p. 312. — Wünsche über Schutzimpfung auf chemischem Wege. Archiv für Anat. u. Physiol. 1888, Bd. III, p. 527.
107) Wright, Kurze Abhandlung über Antityphusinokulation. G. Fischer, Jena 1906.
108) Ders., On the association of serous haemorrhages with conditions of defective blood-coagulability. Lancet 1896, 19. Sept., p. 807.
109) Ders., On the changes effected by antityphoid inoculation in the baktericidal power of the blood with remarks on the probable signification of these ganges. Lancet 1901, 14. Sept., p. 715.
110) Ders., On Some new Procedures for the examination of the blood and of bacterial cultures. Lancet 1902, 5. July, p. 11.
111) Ders., On a Method of measuring the baktericidal power of the blood for clinical and experimental uses. Lancet 1900, p. 1556.
112) Ders., On the quantitative estimation of the baktericidal power of the blood. Lancet 1901, 2. März, p. 609.
113) Ders., Note on the results obtained by antityphoid inoculation in the case of an epidemie of typhoid fever. Brit. med. Journ. 1901, p. 1226.
114) Ders., On the results wich have been obtained by antityphoid inoculation. Lancet 1902, 6. Sept, p. 651.
115) Ders., On the protectiv effect achieved by antityphoid inoculation as exhibited in two new statistical reports. Brit. med. Journ. 1903, 10. Okt., p. 906.
116) Wright and Leishmann, Remarks on the results wich have been obtained by the antityphoid inoculation. Brit. med. Journ., 20. Jan. 1900, p. 122.
117) Wright and Semple, Remarks on vaccination against typhoid fever. Brit. med. Journ. 1897, p. 256.

XXI.

Die Methoden der Schutzimpfung gegen Cholera, Darstellung der Impfstoffe.

Resultate beim Menschen.

Von

E. Friedberger

in Königsberg.

Vergleich zwischen der Methodik der Immunisierung gegen Typhus und Cholera.

Die Immunität bei Cholera entspricht ihrem Charakter nach vollkommen der Typhusimmunität und die Ergebnisse der Forschung, die bei der einen Krankheit gewonnen wurden, ließen sich stets alsbald auf die andere Infektion übertragen; ja der Typus der Immunität, als einer im wesentlichen bakteriziden, tritt bei der Cholera noch mehr als bei Typhus zu Tage und wurde auch gerade hier zuerst durch die Untersuchungen die R. Pfeiffer z. T. in Gemeinschaft mit Wassermann, Kolle, Isaeff angestellt hat, erkannt. Der Krankheitsprozeß beruht auch hier nicht auf einer Vergiftung durch die im freien Lumen des Darmes selbst befindlichen Vibrionen, sondern auf den in die Schleimhaut invadierten, wie das R. Pfeiffer im Anschluß an die Anschauungen von R. Koch weiter angeführt hat; nur dadurch aber erhält eine aktive Immunisierung auch bei der Cholera ihre Berechtigung.

Wenn wir bezüglich des Wesens der Choleraimmunität uns im allgemeinen auf die Ausführungen beziehen dürfen, die im Kapitel „Schutzimpfung gegen Typhus" niedergelegt sind, so bleibt uns doch noch die Aufgabe, gewisse Differenzen in den Qualitäten der bei den Mikroorganismen und der wechselseitigen Immunität kurz zu besprechen.

Einer der wesentlichsten Unterschiede in dem biologischen Verhalten beider Bakterienarten, der nicht ohne Einfluß auf die Methodik der Schutzimpfung bleiben konnte, ist der, daß der Typhusbazillus für den Menschen auch den Charakter eines septikämischen Bakteriums annehmen kann (dementsprechend bei der künstiichen Immunisierung auch von der Blutbahn und dem Unterhautbindegewebe aus infektiös wirken kann), während der Choleravibrio allein vom Intestinaltractus aus zu infizieren vermag.

Dadurch ist für die Cholera die Möglichkeit einer Schutzimpfung mit lebenden virulenten Bakterien, subkutan und endovenös gegeben

eine modus procedendi, der natürlich für den Typhus nicht in Betracht kommt.

Ein weiterer Unterschied in der Immunisierung bei Cholera und Typhus beruht auf dem verschiedenen Verhalten der beiderseitigen Antigene bezüglich des immunisatorischen Verhaltens. Für die Auswahl einer günstigen Antikörperausbeute liefernden Typhuskultur ist, wie die Untersuchungen von WASSERMANN und STRONG [75]) dartun, nicht die Virulenz maßgebend, aber auch nicht, wie sich aus den Untersuchungen von FRIEDBERGER und MORESCHI [19]) ergibt, die Bindungsfähigkeit in vitro.

Im Gegensatz dazu ergaben für Cholera die Untersuchungen von PFEIFFER und FRIEDBERGER [65]), die durch STRONG [76]) eine Bestätigung erfuhren Tatsachen, wonach antigene Fähigkeit, Bindungskraft in vitro und Virulenzgrad parallel zu gehen schienen. Die allgemeine Giltigkeit dieser Verhältnisse ist jedoch durch weitere Untersuchungen von MEINICKE, JAFFE und FLEMMING [55a]) wieder in Frage gestellt.

Es besteht aber hier nicht nur ein qualitativer Unterschied zwischen beiden Bakterienarten, sondern zugleich ein quantitativer, derart, daß die antigene Fähigkeit des Typhusbazillus für den Menschen absolut eine stärkere zu sein scheint als die des Choleravibrio.

Wie die Versuche von FRIEDBERGER [17]) sowie FRIEDBERGER und MORESCHI [18]) mit der Injektion kleinster Mengen abgetöteter Bazillen in die Blutbahn es dartun, ist eine Menge von 0,00079 mg toter Typhusbakterien (nach LÖFFLER) noch imstande eine starke Antikörperbildung zu bewirken, während bis zu 80 mal größere Cholerabakterienmengen von einer virulenten und im Tierversuch erprobten Kultur versagen.

Sodann wäre noch auf den verschiedenen Grad der Giftigkeit des Choleraimpfstoffes im Vergleich zum Typhusvaccin hinzuweisen. Schon PFEIFFER und KOLLE heben die geringe Giftigkeit der Cholerabakterien für den Menschen hervor; diese ergibt sich auch, wie im Nachstehenden noch gezeigt wird, aus dem geringen Grad der klinischen Symptome nach erfolgter Choleraimpfung selbst mit lebenden Bakterien, wenn wir damit den oft stürmischen Verlauf bei Typhusimpfungen vergleichen.

Nach den oben erwähnten Arbeiten von FRIEDBERGER [17]) und FRIEDBERGER-MORESCHI [18]) rufen Minimaldosen des Typhusimpfstoffes von $^{1}/_{1000}$ Öse (= 0,00078 mg) unter Umständen noch schwere Störungen des Allgemeinbefindens und hohes Fieber hervor, während vom Choleraimpfstoff $^{1}/_{100}$ und selbst $^{1}/_{50}$ Öse fast reaktionslos vertragen wurde.

Durch äußere Momente war es bedingt, daß die Methoden der Choleraschutzimpfung, obwohl die älteren noch weniger eine methodologische Durchbildung erfuhren als die der Typhusvaccination.

Da die Impfungen fast ausschließlich in den Tropen selbst — speziell in Indien — unter wenig günstigen äußeren Verhältnissen durchgeführt wurden, so fehlen genaue vergleichende Versuche über die einzelnen Impfstoffe, ihre Dosierung, detaillierte Angaben über die klinischen Folgen der Injektionen und vor allem genaue Angaben über die infolge der Impfung auftretenden spezifischen Veränderungen des Blutes.

In dieser Beziehung sind nur einige Laboratoriumsversuchsreihen zu verzeichnen, von denen eigentlich nur die von KOLLE [49]) den Anforderungen, die an eine exakte Methodik zu stellen sind, voll entsprechen.

Auf diese Weise sind wir bei der Wertung der Choleraschutzimpfungen noch mehr wie beim Typhus auf die Statistik angewiesen, deren allgemeine Mängel für die Beurteilung der Methode aber bereits im Kapitel Typhusschutzimpfung eingehend gewürdigt sind.

Methoden der Immunisierung gegen Cholera.

Vorversuche.

Wie bei der Geschichte der Typhusimmunisierung sehen wir auch bei den Immunisierungsbestrebungen gegen Cholera die Praxis der Theorie voraneilen, indem längst, bevor das Wesen der Choleraimmunität aufgedeckt war, die Immunisierung mit Erfolg experimentell sowohl im Tierversuch wie am Menschen ausgeführt wurde.

Gestützt auf Versuche an Meerschweinchen, die nach Vorbehandlung mit einer nichttödlichen Dosis von Cholerabouillon (subkutan) gegen die nachherige Infektion mit tödlichen Dosen geschützt waren, hat Ferran[11—16]) anläßlich der Choleraepidemie in Spanien im Jahre 1885 als erster beim Menschen Schutzimpfungen vorgenommen und hat mit seinem Verfahren bis zum Jahre 1897 nach seinen Angaben[16]) über 200 000 Einspritzungen am Menschen ohne Schaden durchgeführt.

Er verfuhr so, daß er in drei Sitzungen in 6—8 tägigen Intervallen steigende Mengen lebender Cholerabouillonkulturen subkutan in die Tricepsgegend injizierte (das erste Mal acht Tropfen, die folgenden Male 0,5 ccm).

Durch die Vorbehandlung wird nach seiner Annahme ein genügender Schutz erreicht.

Das Vorgehen Ferrans war weder durch Tierversuche genügend fundiert, noch scheint seine Kultur technisch völlig einwandsfrei gewesen zu sein und ebensowenig war es seine Statistik. So ist es begreiflich, daß seine Veröffentlichungen Widerspruch auf den verschiedensten Seiten hervorriefen. Lara[14]), Solá[74]), Brouardel, Charrin und Albarran[7]), Gibier und v. Ermengem[24]), Nicati und Ritsch[58]), Rossbach[69]) haben sich sowohl gegen seine Methode, wie mehr oder weniger auch gegen die wissenschaftliche Berechtigung der Choleraschutzimpfung überhaupt ausgesprochen.

Die spätere Zeit hat dargetan, daß wenigstens die letzteren Einwände nicht zu Recht bestehen und so bleibt Ferran ohne Rücksicht auf die mangelhafte Art der Ausführung doch das Verdienst, als erster auf die Möglichkeit einer Immunisierung gegen Cholera hingewiesen zu haben.

Die Resultate anderer Forscher haben die prinzipielle Berechtigung seines Vorgehens dargetan, indem sie vor allem durch entsprechend zahlreiche exakte Tierversuche die Zuverlässigkeit der Immunisierung erwiesen und uns über das Wesen der Immunität bei Cholera Aufklärung verschafften.

Der erste, der im Tierexperiment die Frage der Immunisierung gegen Cholera wieder aufnahm, war Gamaleia[21—23]). Er versuchte Meerschweinchen und Tauben (!) durch Vorbehandlung mit abgeschwächten lebenden Kulturen und durch abgetötete virulente Kulturen gegen Cholera zu immunisieren. Die Tatsache, daß der Stamm, mit dem er seine Versuche anstellte, hochgradig taubenpathogen war, zeigt jedoch, daß es sich in den Immunisierungsversuchen Gamaleias nicht um echte Choleravibrionen gehandelt hat. Der gleiche Einwand läßt sich gegenüber den Meerschweinchenversuchen von Zäslein[85]) erheben (Immunisierung mit geringen Mengen lebender Bouillonkultur vom Peritoneum aus).

Als die ersten Immunisierungsversuche an Meerschweinchen mit einwandsfreien Kulturen dürften die von Brieger, Kitasato und Wassermann[46]) zu betrachten sein.

Sie benutzten dreitägige Thymusbouillonkulturen, deren Bereitung im Kapitel Typhusimpfstoffe näher auseinandergesetzt ist. Zur Bereitung des Impfstoffes wurde die Thymuscholerabouillon 15′ auf 65° erhitzt. „Die Toxizität war alsdann fast völlig geschwunden, während die immunisierende Kraft noch wohl erhalten blieb.“ Es genügte die Vorbehandlung von Meerschweinchen mit 1 ccm dieses Impfstoffes, um bereits innerhalb von 24 Stunden einen „Giftschutz“ zu erzielen. (Offenbar handelt es sich aber in dieser kurzen Zeit noch nicht um eine echte spezifische Immunität, sondern um einfache Resistenz, deren Bedeutung damals noch unbekannt war.)

Fedoroff [9,10]) hat mit der Methode von Brieger, Kitasato, Wassermann gleichfalls gute Resultate erzielt; er wich in der Technik der Impfstoffbereitung insofern von den erwähnten Autoren ab, als er statt 3tägige, 7—10tägige Thymusbouillonkultur benutzte, und nach dem Erhitzen zur Konservierung im Verhältnis 1:9 Glyzerin zusetzte. Mit Glyzerin versetzt, hielt sich der Impfstoff im Dunkeln mindestens zwei Monate. Eindampfen im Vakuum bei 40° zerstörte seine Wirksamkeit nicht. Der Niederschlag, der bei der Ausfällung mit Alkohol auftrat, war jedoch gänzlich unwirksam.

Die Vorbehandlung der Meerschweine geschah subkutan; nach 20 Stunden noch nicht aber nach 7 Stunden war ein Impfschutz eingetreten.

Fedoroff [10]) stellte mit seinem „Antitoxin“ auch Heilversuche an sechs Cholerakranken an; es wurden subkutan am Bauch Dosen von durchschnittlich 30 ccm (im ganzen bis 120—180 ccm) gegeben, ohne daß lokale Störungen eintraten. Die Injektionen sollen eine Besserung des Pulses und Allgemeinbefindens zur Folge gehabt haben.

Klemperer [46]) benutzte zur Immunisierung von Meerschweinchen durch dreitägiges Wachstum bei 40,5° abgeschwächte Bouillonkulturen. Die Tiere erhielten an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 1,0, an zwei weiteren Tagen je 1,5 ccm des Impfstoffes intraperitoneal. Fünf Tage nach dieser Vorbehandlung sind sie gegen die tödliche Dosis virulenter Cholera geschützt (auch hier ist der Einfluß der Resistenz nicht berücksichtigt).

In gleicher Weise und mit gleichem Erfolg führte Klemperer die Vorbehandlung an Meerschweinchen durch, mit achttägigen zwei Stunden auf 70° erhitzten und mit eintägigen 24 Stunden lang mit einem konstanten elektrischen Strom von 20 Milliampère behandelten Bouillonkulturen.

Klemperer [47, 48]) war auch der erste, der nach Ferran wieder Immunisierungsversuche am Menschen angestellt hat und durch eine Auswertung des Serums im Tierversuch den Beweis einer tatsächlich erzielten Immunität zu erbringen bestrebt war. (Allerdings ist seine Methode der Titration nicht ganz einwandsfrei gewesen.)

Er behandelte anfangs subkutan mit dreitägigen, zwei Stunden bei 70° abgetöteten Bouillonkulturen (es wurden Dosen von 0,25—0,5 in den Arm injiziert). 0,75 rief noch keine nachweisbare Blutveränderung hervor, dagegen wohl eine Gesamtmenge von 3,6 ccm.

Später ging Klemperer [48]) noch zur Immunisierung mit lebender Kultur über. Die lokalen (Injektion subkutan am Arm) und allgemeinen Symptome waren gering (Temperatur ca. 38, bei einer Dosis von 0,25 ccm virulenter Kultur). Durch forciertere Behandlung (3,1 ccm vollvirulenter und 0,5 ccm abgeschwächter Kultur in fünf Sitzungen) wurde ein Titer von 0,005 gegen 1,5 normal erzielt.

Über erfolgreiche Immunisierung im Tierversuch berichten ferner noch Haffkine[29,30]), Gruber und Wiener[26]), Jawein[44]), Tamancheff[77]), Pfeiffer und Wassermann[68]), Pawlowsky und Buchstab[59]). (Versuche an Meerschweinchen und Hunden mit 56° Vibrionen, schwachvirulenten und schließlich vollvirulenten.)

Die Methode der Schutzimpfung gegen Cholera nach Haffkine.

Systematische Immunisierungen des Menschen wurden in größerem Umfang ausschließlich durch Haffkine vorgenommen.

Die Versuche, die Haffkine zunächst zur Immunisierung von Tieren anstellte, lieferten die Grundlage für sein Immunisierungsverfahren des Menschen[38–42]).

Haffkines erste Tierversuche, in denen er Kaninchen und Tauben[31]) (!) mit Erfolg immunisiert haben wollte, vermögen der Kritik kaum standzuhalten.

Wichtiger ist seine Arbeit über die Cholera des Meerschweinchens[32]), die ihm die Wege zur Herstellung eines wirksamen virulenten Impfstoffes für den Menschen lieferte.

Er hat es richtig vermutet, daß ein hoher Virulenzgrad der Kultur für die Erzeugung eines wirksamen Impfstoffes notwendig sei, eine Annahme, die später durch die vergleichenden Bindungs- und Immunisierungsversuche von Pfeiffer und Friedberger[65]) mit Cholerastämmen verschiedener Virulenz ihre wissenschaftliche Begründung gefunden hat.

Dagegen ging er dabei von der falschen Vorstellung aus, daß zur Erzielung einer wirksamen Immunität ein lebender Impfstoff nötig sei, eine Vorstellung, deren Unrichtigkeit, abgesehen von den Arbeiten der vorher zitierten Autoren, die Untersuchungen von Jawein und Tamamcheff und vor allem die exakten Impfversuche Kolles erwiesen haben.

Bereitung des Impfstoffes für die Schutzimpfung am Menschen.

Haffkine empfahl anfangs nach Pasteurs Vorgang bei der Milzbrandimpfung die Behandlung mit zwei verschiedenen Impfkulturen, einer abgeschwächten und daran anschließend mit einem Virus fixe.

Bereitung des Virus fixe (II. Vaccin).

Wenn man nach Impfung eines Meerschweinchens mit einer tödlichen Dosis einer Choleraagarkultur das Peritonealexsudat, durch einfache Passagen von Tier zu Tier weiterimpfen will, so verliert es bald seine Infektiosität und die geimpften Meerschweine bleiben am Leben. Durch Stehenlassen des Peritonealexsudats an der Luft während ca. 16 Stunden nimmt jedoch, wie auch Gruber und Wiener[26]) beobachtet hatten, seine Infektiosität zu. Auf diese Weise kann man ohne Dazwischenschaltung von Agarkultur eine weitgehende Steigerung der Virulenz erzielen, bis diese in der 20.—30. Passage eine maximale und konstante Höhe erreicht, die die Virulenz der Ausgangskultur um mehr als das 50fache übertreffen kann. Man hat bei den Passagen noch darauf zu achten, daß kleine Meerschweine ein spärliches konzentrierteres Exsudat liefern, größere Tiere ein dünnflüssiges. Um ein Abreißen des Fadens bei den Passagen zu verhüten, muß man die konzentrierten Exsudate durch größere Tiere schicken und umgekehrt. Das resultierende

„Virus fixe“ („II. Vaccin“) tötet Meerschweine in kleinen Dosen bei intraperitonealer und intramuskulärer Impfung.

„Die Krankheit nimmt den Charakter einer Infektion an Stelle einer Intoxikation an.“ Bei Impfung unter die Haut entstehen beim Meerschweinchen starke Nekrosen.

Dieser Umstand veranlaßte HAFFKINE eine Vorbehandlung mit einem abgeschwächten Virus vorausgehen zu lassen.

Bereitung des schwächeren Vaccins.

Das schwächere Vaccin wird aus Virus fixe-Bouillonkulturen folgendermaßen bereitet:

Nach der von ROUX und YERSIN zuerst für den Diphtheriebazillus empfohlenen Methode werden derartige Kulturen unter konstanter Sauerstoffdurchleitung bei 39° gehalten. Auf diese Weise sterben allerdings die Cholerakulturen in wenigen Tagen ab; um jedoch eine derartige Behandlung längere Zeit fortsetzen zu können, werden täglich von der 39° Sauerstoffbouillon Agarkulturen angelegt. Sobald die Bouillonkultur kein Wachstum mehr zeigt, wird die zuletzt gewonnene Agarkultur in Bouillon eingesät und wieder mit Sauerstoff behandelt. Nach mehreren Generationen erhält man auf diese Weise eine abgeschwächte Kultur, die auch in größeren Dosen von der Subcutis aus beim Meerschweinchen keine Nekrose mehr macht.

Die Vorbehandlung mit diesem abgeschwächten Vaccin schützt das Meerschweinchen gegen die nekrotisierende Wirkung des Virus fixe.

Bereitung des Impfstoffes für den Menschen.

Stärke und Dosierung.

Als Ausgangsmaterial für die Bereitung des Impfstoffes dienen 24stündige bei 37° gewachsene Agarkulturen des I. und II. Vaccins, deren Erntefläche mit gekochtem Wasser abgeschwemmt und darin gleichmäßig emulsioniert wird. Bei der geringen Giftigkeit der Cholerabazillenleiber, im Vergleich zu den Typhusbazillen, ist das Bestreben nach einer möglichst exakten Standardisierung und Dosierung, wie wir es dort finden, in der Ausbildung der Methoden nicht hervorgetreten und man begnügte sich mit approximativen Dosierungen, die ja für die vorliegenden Verhältnisse vollauf genügen.

Als Standardkultur dient die 24stündige Ernte der Agarfläche eines 16 cm langen, $1^1/_2$ cm breiten, zu zwei Drittel mit Agar gefüllten Reagenzglases. Bei den ersten Impfungen HAFFKINES betrug die Dosis $^1/_{20}$ einer derartigen Kultur. Da jedoch bei einer für Cholera relativ so kleinen Menge kaum eine Reaktion von seiten des Organismus erfolgte, und HAFFKINE die Ansicht vertritt, daß zwischen der Stärke der Reaktion und dem Grad der Immunität und dementsprechend auch der Impfstoffdosis direkte Beziehungen bestehen, so steigerte er sukzessive die Dosis bis auf $^1/_4$—$^1/_6$ Kultur für Erwachsene.

HARE[40, 41]) verfährt bei der Standardisierung etwas abweichend, kommt dabei jedoch annähernd zu den gleichen Dosen. Der Inhalt eines gut bewachsenen Standardröhrchens wird bis $^1/_3$ resp. $^1/_2$ der Agarhöhe mit gekochtem Wasser gefüllt, die in dieser Wassermenge emulsionierten Bakterien stellen die Standardemulsion dar. Die Dosis dieser Emulsion beträgt für den Erwachsenen 0,5 ccm, für ein Kind von 10 Jahren 0,25, für ein Kind von 6 Monaten 0,05.

Dies sind die Dosen für das I. Vaccin. Die Dosen für die zweite Impfung mit Virus fixe sind bestimmt durch die Stärke der Reaktion, speziell durch die Höhe des Fiebers infolge der ersten Impfung. Steigt das Fieber innerhalb 12 Stunden nach der Inokulation nicht über 38,5° bis 39,5°, so wird dieselbe Dosis gegeben. Überstieg das Fieber 40°, so beträgt die Dosis für die zweite Impfung nur $^2/_3$ der ursprünglichen; bleibt das Fieber unter 38°, so wird die Dosis des I. Vaccins überschritten.

Behandlungsweise des Menschen mit den beiden Impfstoffen.

Die Impfung erfolgt zuerst mit der abgeschwächten Kultur subkutan an der linken Körperseite in der Mitte zwischen untersten Rippen und Hüftbein (die Haut wird zuvor mit 5 % Karbollösung an der Injektionsstelle abgerieben); nach fünf Tagen Impfung mit dem Virus fixe an der entsprechenden Stelle rechts.

Später haben Powel[68]) sowie Brown[43]) nach glücklich verlaufenen Selbstversuchen in einer größeren Anzahl von Fällen die Impfung von vornherein mit dem Virus fixe vorgenommen, ohne daß ernstere Störungen auftraten; auch Simpson[71]) empfiehlt dieses Verfahren.

Symptome nach der Impfung.

Es ist bereits wiederholt darauf hingewiesen, daß die Symptome nach der Choleravaccination leichter sind als nach der Typhusimpfung.

Dieser Umstand dürfte dazu beigetragen haben, daß, trotzdem die Impfung völlig fakultativ war und trotz des angeborenen Mißtrauens der Indier gegen derartige Eingriffe, trotz religiöser und anderer Vorurteile, eine relativ große Zahl der Eingeborenen in den einzelnen Distrikten sich der Impfung unterzog und ein nicht geringer Prozentsatz (bis zu $^2/_3$) auch zur zweiten Impfung erschien.

Simpson sowie Brown[8]) berichten, daß viele Personen sich direkt zur Impfung drängten. In dem „Darbhanga Jail“, wo bei Ausbruch einer Choleraepidemie nur jeder zweite Gefangene geimpft wurde, ersuchten die Nichtgeimpften fast alle um die Impfung (Brown, l. c.).

Lokale Symptome.

Nach den Angaben, die Haffkine bei seinem ersten Selbstversuche[31]) gemacht hat und nach den sorgfältigsten Beobachtungen von Hare[40]) u. a., beginnt eine Schwellung und Schmerzhaftigkeit der Injektionsstelle, besonders bei Berührung, schon 5 Stunden nach der Impfung; auch die regionären Lymphdrüsen zeigen leichte Schwellung. Die lokalen Beschwerden nehmen bis ca. 8—10 Stunden zu, dann nehmen die Symptome ab und nach 36 Stunden ist i. R. wieder völlige Arbeitsfähigkeit vorhanden, nur bei Berührung oder schneller Bewegung ist die Injektionsstelle noch ein bis zwei Tage empfindlich.

Zuweilen dauert die Schwellung und Schmerzhaftigkeit auch bis zu fünf Tagen; in manchen Fällen, in denen die Schwellung schnell zurückgegangen ist, kehrt sie am siebenten bis achten Tage als eine schmerzhafte Beule wieder, die nur allmählich zurückgeht. Niemals, auch nicht in den Fällen, in denen das Virus fixe direkt injiziert wurde, kamen Hautnekrosen zur Beobachtung.

Im allgemeinen sind die lokalen Symptome bei der Injektion von Virus fixe nach voraufgegangener Impfung mit dem I. Vaccin nur sehr geringe (leichte lokale Schmerzhaftigkeit ohne Schwellungen). Bei Haff-

KINE selbst, der nach voraufgegangener zweimaliger Impfung nach einem Zwischenraum von 2 Jahren eine Wiederimpfung an sich mit dem dreifachen der üblichen Dosis subkutan vornahm, kam es zu erneuten lokalen Symptomen[36]; acht bis zehn Tage nach ihrem Ablauf bildete sich von neuem an der Injektionsstelle eine Beule, die allmählich zur Resorption gelangte.

Allgemeine Symptome.

Sie beginnen zugleich mit den lokalen etwa 5 Stunden nach der Impfung, erreichen ihren Höhepunkt gleichfalls ca. nach 12 Stunden und sind nach 25 Stunden in der Regel bereits wieder völlig zurückgegangen.

Als Folge der Impfung zeigt sich alsbald ein Gefühl von Übelkeit, Schwäche, Kopfschmerz, Trockenheit im Munde, zuweilen leichte Durchfälle, geringer Frost. Der Urin ist dunkel gefärbt.

Die Temperatur erreicht ihr Maximum etwa 8—10 Stunden nach der Impfung mit 38,5—39,5° und kehrt innerhalb 24 Stunden wieder zur Norm zurück. Selten hält sich das Fieber bis zur 18.—20. Stunde auf der Höhe. In zwei Fällen von HARE[40] (Europäer) stieg das Fieber bis auf 40,5 resp. 41. Überhaupt scheinen Europäer empfindlicher zu sein, wofür auch eine Angabe von BROWN[8] spricht.

Bei Personen, die früher an Malaria gelitten haben, kommt es noch in den auf die Impfung folgenden Tagen häufig zu periodischen Fieberanfällen.

Selten bleibt die Temperatursteigerung aus; in einzelnen Fällen kommt es aber auch zum Herabsinken der Temperatur unter die Norm im Anschluß an die Impfung.

Bei der zweiten Impfung tritt die annähernd gleiche Temperatursteigerung ein.

Bei sofortiger Impfung mit dem Virus fixe (BROWN) werden keine höheren Temperaturen erreicht als bei voraufgegangener Impfung mit I. Vaccin. Bei BROWN selbst stieg die Temperatur auf 40°, bei keinem der übrigen 109 geimpften (Gefängnisinsassen) jedoch über 39.

Die Wiederimpfung bei HAFFKINE, nach einem Zeitraume von zwei Jahren, hatte eine Steigerung der Temperatur auf 38,5 zur Folge.

Diarrhöen im Anschluß an die Impfung wurden nur in 1—2% der Fälle beobachtet, noch seltener Erbrechen.

Im ganzen wurden in der Zeit vom April 1893 bis August 1895[54] ca. 70000 Injektionen lebender Vibrionen an 42179 Individuen vorgenommen, ohne daß ernstere Störungen infolge der Impfung beobachtet wurden, obwohl auf die Körperkonstitution der Impflinge keine weitere Rücksicht genommen wurde; es kamen Individuen von 6 Monaten bis 80 Jahren zur Impfung, selbst mit chronischem Leiden behaftete.

Wenn wir demgegenüber die stürmischen Erscheinungen in Betracht ziehen, die die Typhusvaccination bei einigen Malariakranken (BASSENGE und MEYER[11], KOLLE[60], s. Kap. XX) hervorrief, so spricht das wiederum für die geringere Giftigkeit des Choleraimpfstoffes im allgemeinen.

Kontraindikation gegen die Choleravaccination geben nach HARE nur fieberhafte Erkrankungen und die letzten Stadien der Schwangerschaft. Auffallend ist die Notiz dieses Autors, wonach Säuglinge nach Inokulation der Mutter Fieber und zuweilen Durchfälle zeigen.

Die spezifischen Veränderungen des Blutes im Gefolge der Immunisierung sind von HAFFKINE und seinen Mitarbeitern nicht unter-

sucht worden, wofür wohl im wesentlichen die ungünstigen äußeren Verhältnisse verantwortlich sein dürften.

Dagegen hat sich Haffkine mit großem Eifer bemüht, durch eine möglichst umfangreiche Statistik die Brauchbarkeit seiner Methode darzutun.

Statistik der Schutzimpfung nach Haffkine gegen Cholera.

Die zahlreichen von Haffkine und seinen Mitarbeitern geimpften Personen (bis August 1895 waren es bereits 42 179 Fälle, darunter:

10 127 Soldaten und zwar:
294 englische Offiziere
3 206 „ Soldaten
6 627 indische „

32 070 Zivilisten und zwar:
889 Europäer
31 036 Indier
125 Mischlinge)

sind natürlich nicht in ihrer Gesamtheit für die Statistik verwertbar.

Namentlich stehen bei der indischen Zivilbevölkerung die Ungleichheit der Lebensbedingungen, die ständige Fluktuation und die damit verknüpfte Unmöglichkeit einer genügenden Beobachtung dem entgegen. Dazu kommt noch, daß in vielen Distrikten, in denen ausgedehnte Impfungen unter der Bevölkerung vorgenommen waren, die Cholera in den nächsten Jahren ausblieb.

Geeigneter für die Beurteilung des Verfahrens sind Statistiken, die gelegentlich kleiner Epidemien auf engbegrenzten Gebieten gewonnen wurden, an Individuen, die unter gleichen Lebensbedingungen standen, der Infektion in gleicher Weise ausgesetzt waren und die unter fortlaufender Überwachung durch staatliche oder militärische Behörden standen.

In dieser Beziehung geben die Berichte über Impfungen, die durch englische Regierungs- und Militärärzte bei 64 britischen Regimentern, in 9 Gefängnissen, in 45 Teeplantagen, ferner in Himalayadörfern, an der Pilgerstraße von Hardwar und in den „bustees" (Eingeborenenhütten) an den „Tanks" von Kalkutta vorgenommen wurden, brauchbare Werte.

Durch das persönliche liebenswürdige Entgegenkommen von Professor Haffkine war es mir ermöglicht, von einem Teil der Originalarbeiten dieser Autoren, die in den Jahrgängen 1893—96, der nur schwer zugänglichen „Indian medical Gazette" veröffentlicht sind, Kenntnis zu nehmen.

Diesen Publikationen, sowie dem offiziellen Bericht Haffkines an die indische Regierung vom Jahre 1895, ferner seinen zusammenfassenden Darstellungen in der „Indian medical Gazette" 1895 und im „Bull. Ann. Inst. Pasteur[37]" sind die nachstehenden Zahlenangaben entnommen.

Haffkine selbst teilt die Statistiken in drei Gruppen.

1. Statistiken, bei denen die geringe Zahl von Erkrankungen nach der Impfung keinen sicheren Schluß ermöglichen.

2. Statistiken, in denen die Erfolge der Impfung nur in geringem Grad zu Tage treten.

3. Statistiken, mit völlig einwandsfreien günstigen Resultaten.

1. Gruppe:

II. Bataillon Manchesterregiment in Dinapore, Ausbruch der Epidemie zwei bis sechs Tage nach den Impfungen:

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	729	6	0,28	3	0,41
Geimpfte	193	0	—	—	—

Englische Truppen in Cownpore, Epidemie 13 Monate nach der Impfung:

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	797	19	2,38	13	1,63
Geimpfte	75	0	—	—	—

Teeplantagen in Adam Tila:

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	657	0	—	—	—
Geimpfte	318	2	0,63	1	0,3

Teeplantagen in Kalachera, Chargola, Pallarbund, Lungla:

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	4747	12	0,25	9	0,18
Geimpfte	1374	1	0,07	1	0,07

2. Gruppe:

I. Bataillon East Lancashire-Regiment Lucknow (14—15 Monat nach der Impfung mit kleinen Dosen ($^1/_{20}$) Agarkultur). Die Reaktionen waren damals bei der Impfung nach Haffkine sehr milde gewesen. Nur in zwei Fällen war ausgesprochenes Fieber aufgetreten, in 77 Fällen war es sehr gering gewesen, 66 Geimpfte blieben überhaupt fieberfrei. Die spätere Epidemie war eine sehr schwere.

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	640	120	18,75	74	12,34
Geimpfte	133	28	13,53	13	9,77

3. Gruppe. Gefängnis von Gaya. Kleine Dosen, zweimalige Impfung.

Ausbruch der Epidemie am 9. Juli. Beginn der Impfung, nachdem sechs Erkrankungen mit fünf Todesfällen vorgekommen waren, am 18. Juli.

Die Hälfte der Gefangenen wurde geimpft und zwar in fünftägigem Intervall mit beiden Vaccins. Alle Lebensbedingungen waren für Ungeimpfte und Geimpfte so vollkommen identisch (Nahrung, Wasser, Wohnung, Arbeit usw.), daß diesen Impfungen nach Haffkine der Wert eines Laboratoriumsexperimentes zukommt.

Resultat während der fünf Tage nach der Impfung mit dem I. Vaccin.

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	210	7	3,3	5	2,38
Geimpfte	212	5	2,36	4	1,89

Resultat während der fünf Tage nach der Impfung mit dem II. Vaccin.

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	197	9	4,57	4	2,03
Geimpfte	206	3	1,46	1	0,48

Resultat während der vier letzten Tage der Epidemie.

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	192	4	2,09	1	0,51
Geimpfte	201	0	—	—	—

Gesamtstatistik.

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	202	20	9,90	10	4,95
Geimpfte	207	8	3,86	5	2,41

Die Sterblichkeit unter den Krankheitsfällen selbst ist bei den geimpften (62,5 %) höher als bei den ungeimpften (50 %).

Ähnlich günstig für eine Verwertung der statistischen Zahlen gestaltete sich die Epidemie im Gefängnis von Darbhanga, die von Brown beobachtet wurde. Einmalige Impfung der Hälfte der Insassen (sie wurden wahllos in Reihen aufgestellt und jeder zweite wurde geimpft) mit größeren Dosen des Virus fixe.

Ausbruch der sehr schweren (80 % Todesfälle) Epidemie 31. März, Termin der Impfungen 11. April, bis dahin 14 Fälle mit 10 Toten.

Brown nimmt an, daß der Schutz bei der Behandlung mit großen Dosen des II. Vaccins sehr schnell eintritt, schon in wenigen Stunden. Die Impfungen waren am Vormittag vorgenommen und am Nachmittag und Abend desgleichen Tages und am folgenden Tage kamen frische Fälle nur unter den nicht geimpften vor (sechs resp. zwei alle tödlich verlaufend).

Wenn auch hier bei der relativ geringen Zahl von Fällen sehr wohl ein Zufall vorliegen kann, so sprechen doch alle die Statistiken, bei denen die Impfungen erst nach dem Ausbruch einer Epidemie erfolgten, unbedingt gegen das Vorhandensein einer negativen Phase, wie sie bei der Typhusimpfung von Wright u. a. behauptet wird.

In jüngster Zeit von Pfeiffer und Friedberger angestellte Tierversuche zeigen gleichfalls zur Evidenz, daß wenigstens beim Meerschweinchen nach subkutaner Impfung eine negative Phase nicht besteht, weder für Typhus noch für Cholera, daß vielmehr die Tiere bereits unmittelbar nach der Impfung eine erhöhte (allerdings nicht spezifische) Widerstandskraft besitzen. Von diesen Gesichtspunkten aus erscheint auch der schnelle Schutz, wie ihn Brown beobachtet hat, vielleicht doch nicht als bloßer Zufall.

Die Gesamtstatistik im Darbhanga Jail ergibt folgende Zahlen:

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	99	11	11,1	11	11,1
Geimpfte	110	5	4,5	3	2,73

In den „Bustees“ an den Tanks von Kalkutta hat SIMPSON[44]) in der Zeit vom Juli 1894—1896 7690 Personen (darunter 5853 Hindus, 1476 Mohammedaner) geimpft.

Bei einer statistischen Verwertung dieses Zahlenmaterials wurden nur die Häuser berücksichtigt, in denen während der in Frage kommenden Zeit Cholerafälle vorkamen und gleichzeitig geimpfte neben nichtgeimpften Insassen vorhanden waren. Diese durften als unter gleichen Lebens- und Infektionsbedingungen stehend betrachtet werden.

Häuser, in denen Cholera ausbrach, ohne daß geimpfte Bewohner da waren, und Häuser, in denen geimpfte lebten, in denen aber keine Cholerafälle vorkamen, blieben bei der Statistik unberücksichtigt, da sie keine genügend zuverlässige Unterlage für den Vergleich boten.

Auf diese Weise sind 77 Wohnstätten in der Statistik verwertet, in denen alle Fälle durch die staatliche Medizinalbehörde auf sorgfältigste kontrolliert waren:

In diesen 71 Häusern lebten 1036 Personen die folgende Zahlen lieferten:

	Zahl	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	654	71	10,86
Geimpfte	402	12	2,9

Wir haben also eine Reduktion von 72,47 % oder in den Häusern die von Cholera heimgesucht waren und in denen sich geimpfte und ungeimpfte Personen befanden, kommen 11 Tote auf die Ungeimpften, 3 auf die Geimpften.

Über die Dauer des Impfschutzes gibt die nachstehende Zusammenstellung Aufschluß:

In den ersten vier Tagen nach der Impfung.

	Zahl	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	167	6	3,54
Geimpfte	259	5	1,93

(Zahl der Todesfälle unter den geimpften 1,86 mal geringer als unter den nichtgeimpften.)

In den folgenden 14 Monaten (437 Tage).

	Zahl	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	502	42	8,37
Geimpfte	269	1	0,37

(Zahl der Todesfälle unter den geimpften 22,6 mal geringer als unter den nichtgeimpften.)

Vom 437. bis 748. Tag.

	Zahl	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	238	23	9,66
Geimpfte	96	6	6,25

(Zahl der Todesfälle unter den geimpften 1,54 mal geringer als unter den nichtgeimpften.)

Von den hier aufgeführten sechs verstorbenen Geimpften waren nach SIMPSON fünf nur einmal mit einer kleinen Dosis eines Vaccins, einer zweimal mit kleinen Dosen beider Vaccins behandelt.

Die Angaben SIMPSONS über die Impfungen in Kalkutta sind durch SANDERS[67a]) einer Kritik unterworfen worden, die jedoch so wenig sachlich erscheint, daß sich ein näheres Eingehen auf sie erübrigt. SIMPSON wies zudem die Nichtberechtigung der SANDERSschen Angriffe nach.

Die relativ kurze Dauer des Impfschutzes wird von Haffkine auf die geringen Impfstoffdosen zurückgeführt (vgl. auch die Statistik des 1. Bataillon East Lancashire, Regiment Lucknow).

Bessere Resultate erhielt denn auch Powell[68a]) bei der Verwendung größerer Dosen des Virus fixe (bis zu $^1/_6$ Kultur) selbst ohne voraufgehende Impfung mit dem I. Vaccin.

Übersicht über die Impfungen auf den Theeplantagen von Catchar von April 1896 bis Dezember 1899 nach Powell.

	Zahl	Erkrankungen	Todesfälle
Ungeimpfte	6549	198	124
Geimpfte	5778	27	14

Aus den Zahlen der einzelnen Statistiken kommt Haffkine selbst zu folgenden Schlüssen über den Wert der Schutzimpfung:

Die schützende Wirkung der Choleravaccination beginnt bereits in den ersten Tagen nach der Impfung und wird durch eine Steigerung der Dosis innerhalb der angegebenen Grenzen vermehrt.

Die Dauer des Impfschutzes beträgt bei geringen Dosen etwa 14 Monate; danach deutliche Abnahme und wahrscheinlich gänzliches Verschwinden. Bei größeren Dosen scheint der Schutz länger zu dauern.

Während der Zeit ihrer Wirksamkeit vermag die Schutzimpfung die Zahl der Erkrankungen gegenüber den nicht geimpften um mehr als das 10fache herabzudrücken.

Durch die voraufgegangene Vaccinierung wird der Verlauf eines Choleraanfalles nicht nennenswert beeinflußt.“ Das ergibt deutlich eine Zusammenstellung von Morbiditäts- und Mortalitäszahlen aus den voraufgehenden Statistiken.

Ort der Statistik	Ungeimpfte Zahl der Erkrankungen	Ungeimpfte Zahl der Todesfälle	Geimpfte Zahl der Erkrankungen	Geimpfte Zahl der Todesfälle
Kulilager an der Eisenbahn Assam—Birmanil	33	29	4	4
Gefängnis von Darbhanga	11	11	5	3
„ „ Gaya . .	20	10	8	5
Teeplantagen von Assam	198	124	27	14
II. Bataillon East Lancashire, Regiment Lucknow	200	79	18	13

Darstellung der Haffkineschen Methode, resp. kurze Abhandlungen über das Verfahren sind außer von den erwähnten Mitarbeitern in Indien gegeben von Hankin[39]), Wright und Bruce[84]), von Gruber[27]), Haan[28]), Galeotti[25]), Kolle[51]), Sobernheim[72]), Voges[18]), Marx[55]), Hetsch[43]), Strong[77]).

Strong[76]) beobachtete bei seinen Impfungen auf Kuba im Gegensatz zu Haffkine starke lokale und allgemeine Reaktion, ebenso Kolle, nach dessen Beobchtungen die Reaktion erst nach 2—3 Tagen abläuft.

Modifiziert wurde die Methode von Haffkine durch Tamamcheff[35]). Die Kulturen der I. und II. Vaccine wurden genau nach

Haffekine hergestellt; doch wurden die Bakterien nachher nicht lebend verwendet, sondern vor der Injektion durch Phenol abgetötet. Im einzelnen verfuhr er bei der Herstellung des Impfstoffes folgendermaßen: Agarkulturen in Röhrchen von 1,5 cm Durchmesser und 16 cm Höhe (Höhe der Agarfläche 10 cm) wurden mit 6 ccm einer $^1/_2$ % igen Phenollösung übergossen und darin gleichmäßig emulgiert. Die Emulsion wurde in Dosen von 1 ccm (= $^1/_6$ Kultur) in Glasröhrchen eingeschmolzen. Derartige Emulsionen sind nach Tamamcheff selbst in 5 % igem Phenol mindestens 18 Tage haltbar. Aus späteren Untersuchungen von Pfeiffer und Marx[67a]) wissen wir, daß Emulsionen von Choleravibrionen in $^1/_2$ % igem Phenol ihre antigene Qualität sogar bei Brutschranktemperatur mindestens 10 Wochen bewahren.

Der Impfstoff von Tamamcheff bewirkt nach seinen Versuchen am Menschen geringere lokale Beschwerden; die Fieberreaktion ist die gleiche wie bei Verwendung lebender Vibrionen.

Die toxische Wirkung beim Meerschweinchen ist fünf- bis sechsmal geringer; der immunisierende Effekt ist der gleiche.

Zur Zeit da Haffkine seine ausgedehnten Impfungen in Indien begann, waren die Forschungen über Choleraimmunität noch nicht weit gediehen und seine zweifellosen Erfolge sind mehr die Früchte einer glücklichen Empirie.

Erst durch die Veröffentlichungen Pfeiffers in Gemeinschaft mit Wassermann[68]), Kolle und Isaeff[60–68]) wurde das Wesen der Choleraimmunität aufgedeckt. Es wurde vor allem der wichtige Nachweis erbracht, daß der Vaccinierte seinen Schutz dem Auftreten der gleichen bakteriziden Substanzen im Blutserum verdankt, wie sie beim Cholerarekonvaleszenten vorhanden sind und hier die natürlich erworbene Immunität bedingen. Durch diese Feststellung war die Möglichkeit geschaffen, die Methodik der Choleraschutzimpfung von dem schwankenden Boden der Empirie auf eine exakte wissenschaftliche Grundlage zu übertragen.

Die Steigerung des Gehaltes des Serums an bakteriolytischen Antikörpern und vor allem der Grad dieser Steigerung, lieferten fortan einen zuverlässigen und exakten Maßstab für die Bewertung eines Schutzimpfungsverfahrens, zuverlässiger jedenfalls und eindeutiger als eine Statistik, bei der die Resultate nur zu häufig durch ganz unkontrollierbare Nebenmomente völlig verschoben sein können.

In dem Pfeifferschen Laboratorium ist zum ersten Male ein Schutzimpfungsverfahren von diesen Prinzipien aus in exakter Weise mit Hilfe der von R. Pfeiffer angegebenen Prüfungsmethoden durch Kolle ausgearbeitet worden.

Methode der Schutzimpfung nach Kolle.

Kolle verwandte an Stelle der lebenden Kulturen Haffkines Aufschwemmungen virulenter Vibrionen in physiologischer Kochsalzlösung, die zuvor 10 Minuten lang bei 37° durch Chloroformdämpfe abgetötet waren oder 2—3 Minuten gekocht wurden. Es wurden im ganzen 15 Personen immunisiert:

Dosis dieser Impfstoffe: $^1/_5$—$^1/_{10}$ 24stündige Agarkultur.

Titersteigerung: Auftreten der vermehrten Antikörper im zirkulierenden Blut vom fünften Tage nach der Impfung; durch eine einzige Injektion von $^1/_{10}$ Kultur Titersteigerung bis zu 0,003 ccm gegen

0,6 normal. Durch die dreimalige Behandlung nach Haffkine hatte Kolle an sich selbst keinen höheren Titer erzielt. Er glaubt daher mit der einmaligen Injektion von $^1/_5$ abgetöteter Kultur den gleichen Effekt erreichen zu können wie Haffkine mit seinem bedeutend umständlicheren und gefährlicheren Verfahren.

In der Praxis ist das Verfahren von Kolle durch Strong[76]), Tsuzuki[79]) und Murata[56]) angewandt worden. Strong hält das Kollesche Verfahren in gleicher Weise wie das von Haffkine bezüglich des Schutzeffektes für durchaus brauchbar, verwirft aber beide Methoden wegen der starken lokalen und allgemeinen Reaktion und empfiehlt einen von ihm selbst hergestellten schonender wirkenden Impfstoff nach dem Prinzip von Neisser-Shiga.

Tsuzuki spricht sich nach seinen Erfahrungen an japanischen Soldaten und Kolonisten anläßlich einer Epidemie in Nordchina über das Kollesche Verfahren sehr günstig aus; im Gegensatz zu Strong findet er sowohl die lokalen wie allgemeinen Reaktionen sehr gering (vgl. auch die damit übereinstimmenden Erfahrungen der indischen Ärzte mit dem Impfstoff von Haffkine). Er impfte 1247 Japaner und 231 Chinesen mit $^1/_{10}$ abgetöteter Agarkultur, ohne daß nennenswerte Lokalsymptome auftraten. Selbst Fieber wurde nur bei schwächlichen und nervösen Personen beobachtet.

Die Impfungen wurden erst in einem späteren Stadium der Epidemie vorgenommen. Die Zahlenangaben der nachstehenden Tabelle geben daher in Anbetracht der spärlichen Cholerafälle kein sehr augenfälliges Resultat.

Tabelle über die Impfungen Tsuzukis.

1. Japanische Kolonisten.

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	912	5	0,54	2	0,22
Geimpfte	621	2	0,32	1	0,16

2. Japanische Soldaten.

	Zahl	Erkrankungen	Prozent	Todesfälle	Prozent
Ungeimpfte	1153	1	0,09	—	—
Geimpfte	485	—	—	—	—

Ein besseres Urteil gestattet der Bericht von Murata.

Murata hat während einer Choleraepidemie in Japan im Jahre 1902 im Regierungsbezirk Hiogo, wo die Epidemie vom 31. Juli bis 23. Dezember sehr heftig wütete (Mortalität 73,3 %), Impfungen nach Kolle vorgenommen.

Die Impfungen wurden vom 5. August an, also bald nach Ausbruch der Epidemie, begonnen.

Bereitung der Impfstoffe (im kaiserl. japan. Seruminstitut): 24stündige Agarkulturen wurden mit soviel physiologischer Kochsalzlösung emulgiert, daß jeder Kubikzentimeter 1 Öse Vibrionen = 2 mg enthielt. Abtötung durch $^1/_2$stündiges Erwärmen auf 60°. Zusatz von 0,5 % Karbol.

Dosis des Impfstoffs: anfangs 1 Öse; später 2 Ösen.

1 Öse verleiht nach Muratas Erfahrungen für den Erwachsenen keinen genügenden Schutz. Todesfälle unter den Geimpften betrafen

nur Individuen, die eine Öse erhalten hatten. Unter den mit 2 Ösen Behandelten war kein Todesfall zu verzeichnen.

Folgen der Impfung. Lokale Symptome: lokale Schmerzhaftigkeit beginnt nach 5—6 Stunden; Rötung und Schwellung unbedeutend; innerhalb 3 Tagen gänzlich schwindend; selten Urticaria beobachtet.

Allgemeine Symptome: Mattigkeit, Gefühl von Unwohlsein, Kopfschmerz. Fiebererhöhung meist auf 38 °, selten 39 °; nach 24 Stunden Rückkehr zur Norm; Frostgefühl sehr selten. Häufig Urinvermehrung in den ersten 12—16 Stunden nach der Impfung.

Diarrhoen am folgenden Tag in ca. 10 % der Fälle. Bei Frauen zuweilen Übelkeit und Erbrechen.

Über die Resultate der Impfung gibt die folgende Tabelle (nach MURATA) Aufschluß:

Städte und Kreise	Ungeimpft			Geimpft		
	Bevölkerung	Cholera		Bevölkerung	Cholera	
		Fälle	Tod		Fälle	Tod
Stadt Kobe . . .	244 081	753	559	14 959	20	6
„ Himeji . .	28 695	15	15	2 596	0	0
Kreis Kawabe . .	66 205	88	61	8 142	7	5
„ Muko . . .	80 775	62	48	2 440	0	0
„ Akashi . .	60 126	52	45	9 300	3	2
„ Kako . . .	54 895	10	5	2 730	1	0
„ Innami . .	49 952	8	6	657	0	0
„ Shikama . .	90 588	48	35	3 100	2	2
„ Ibo	86 033	1	1	9 590	3	1
„ Higami . .	74 472	1	1	3 173	0	0
„ Tsuna . . .	99 463	49	41	19 578	11	4
Summa	825 287	1152	863	77 907	47	20
Prozentsatz		0,13 %*)	75 %**)		0,06 %*)	42,5 %**)

In der Beurteilung dieser Statistik ist MURATA selbst sehr zurückhaltend, da er die Impfungen nicht durchgehend persönlich ausgeführt hat und kein Urteil darüber abzugeben vermag, inwieweit die Geimpften und Ungeimpften unter gleichen Lebensbedingungen und speziell gleichen Infektionsbedingungen standen.

Doch führt er zur Stütze der günstigen Statistik noch eine Reihe wertvoller Einzelbeobachtungen an.

In zwei, einem Choleraherd sehr nahe gelegenen Ortschaften, in denen alle Einwohner geimpft waren, erkrankte trotz regen Verkehrs mit dem durchseuchten Gebiet niemand.

In der Filiale des Formosa-Camphermonopolamts wurden bis auf drei, alle Personen (159) geimpft. Nur von den Nichtgeimpften erkrankte einer an Cholera und starb.

In einem „beschränkten Lokal“ in der Stadt Sumota wurde bis auf einen, das ganze Personal (100 Personen) geimpft; der Ungeimpfte erkrankte; eine ähnliche Beobachtung wurde in einer Familie erhoben, hier erkrankte die allein nicht geimpfte Frau.

*) Der Prozentsatz der Cholerafälle zur Bevölkerung (Morbidität).
**) Der Prozentsatz der Todesfälle zu den Erkrankten (Mortalität).

Besonders hervorgehoben zu werden verdient der Umstand, daß nach Muratas Angaben die Geimpften, soweit sie an Cholera erkrankten, bei gleicher Behandlung, einen viel milderen Verlauf der Infektion zeigten, als die Ungeimpften. Auch die Mortalität ist bei den Geimpften fast um die Hälfte geringer (siehe Tabelle).

Diese Angaben stehen mit den entsprechenden Zahlen Haffkines in direktem Widerspruch, der in dieser Beziehung zwischen Geimpften und Ungeimpften keinen Unterschied sah. Sollten sich die Resultate Muratas in dieser Richtung bei weiteren Impfungen bestätigen, so spräche das für eine entschiedene Überlegenheit des Kolleschen Verfahrens, indem dieses die Morbiditäts- und Mortalitätszahlen günstig beeinflussen würde, während das von Haffkine nur auf die Morbiditätszahlen von Einfluß ist.

Das Kollesche Verfahren hat sich nach dem Bericht von Mabry und Gemill [53]) auch bei dem Choleraausbruch unter der Mannschaft eines amerikanischen Schiffes vor Nagasaki aufs beste bewährt.

Friedberger und Moreschi [20]) haben im Tierversuch quantitativ bei Immunisierung mit abgetöteten Cholerabakterien den Einfluß verschiedener Abtötungsmittel auf die Antigene untersucht. Die Resultate sind von Interesse für die Darstellung von Impfstoffen aus abgetöteten Kulturen.

In der Erhaltung der antigenen Fähigkeit, sind die Verfahren von Pfeiffer-Kolle und Löfeler [52]) (näheres hierüber s. bei Typhusschutzimpfung, p. 757) gleichwertig. Beim Löffler-Verfahren darf über eine Temperatur von 120° zur Abtötung nicht hinausgegangen werden.

Erhitzen der in Kochsalzlösung aufgeschwemmten Bakterien auf 100° schädigt die Antigene.

Durch Chloroformdämpfe werden die Agglutininantigene bei Cholera sehr stark aber auch die Antigene für Bakteriolysine nachweisbar geschädigt.

Methode der Serovaccination nach Besredka [3]).

Die Methode sowohl wie die Resultate der Immunisierung stimmen vollkommen mit denen bei Typhus überein, so daß der Hinweis auf die betreffende Stelle im Kapitel Typhusschutzimpfung (p. 767) genügt.

Methoden der Immunisierung mit Vibrionenfiltraten und Vibrionenextrakten.

Die allgemeinen Bedenken, die sich von praktischen und theoretischen Gesichtspunkten gegen die Verwendung von Bakterienderivaten zur Immunisierung vorbringen lassen, sind bereits im Kapitel Typhus des näheren erörtert; es genügt hier auf diese Ausführungen hinzuweisen.

Für die Verwendung derartiger Produkte liegt hier um so weniger eine Berechtigung vor, als die Choleraimpfstoffe aus Vollbakterien ja viel weniger giftig sind als die entsprechenden Typhusvaccins.

Bezüglich der in Betracht kommenden Methoden, kann ich mich kurz fassen, da sie in Praxis bisher keine irgendwie nennenswerte Anwendung erfahren haben.

Methoden der Immunisierung mit Bakterienfiltraten.

Immunisierungen mit Bouillonfiltraten von Cholerakulturen sind bei Tieren zuerst von VINCENZI [80]) mit Erfolg ausgeführt wurden.

Später berichtet SOBERNHEIM [73]), daß ihm die Immunisierung von Meerschweinchen gegen die intraperitoneale Infektion durch Vorbehandlung mit 8 ccm 3tägiger resp. 3 ccm 30tägiger Bouillonkultur gelungen sei.

Auch das Verfahren von NEISSER-SHIGA [57]) (s. unter Typhusschutzimpfung, p. 763) ist für die Choleraimpfung von BERTARELLI versucht worden.

Die Bereitung des Impfstoffes erfolgte genau so wie es von NEISSER-SHIGA für Typhus angegeben war. Abgesehen von einigen Kaninchenversuchen, bei denen eine Steigerung des bakteriziden Vermögens (im Plattenversuch) und des Agglutinationstiters erfolgte, hat BERTARELLI [2]) nur einen Versuch am Menschen (Selbstversuch) angestellt. Viermalige subkutane (Rückenhaut) Vorbehandlung in sechstägigen Intervallen mit 0,3, 0,4, 1,0, 2,0 Impfstoff nach NEISSER-SHIGA. Nur die letzte Injektion rief geringe Reaktion hervor.

Titer des Serums 12 Tage nach der letzten Impfung:

Agglutination 1 : 40 gegen 1 : 2 normal; bakterizider Titer im Plattenversuch 1 : 20 gegen 1 : 5 normal.

BERTARELLI glaubt, daß die für den Menschen notwendigen großen Mengen des Impfstoffes, bei einer praktischen Verwertung beim Menschen Schwierigkeiten machen dürften.

Die relativ geringen Werte für Agglutination im Tierversuch sprechen jedenfalls doch nicht dafür, „daß die SHIGAsche Methode der freien Receptoren im allgemeinen und für Cholera im besonderen in Betracht gezogen zu werden verdient“ (l. c.).

Auch STRONG hat eine Reihe von Versuchspersonen mit einer der NEISSER-SHIGAschen entsprechenden Methode immunisiert. Er erhielt im Gegensatz zu BERTARELLI hohe Titerwerte bei sehr geringen lokalen und allgemeinen Erscheinungen.

Methode von BRIEGER-MAYER [5])

Diese für Typhus ausführlich beschriebene Methode (s. daselbst), ist von MAYER [54]) auch für die Choleraimmunisierung ausgearbeitet worden.

Im Gegensatz zu den Typhusimpfstoffen zeigten die Choleraaufschwemmungen im Ammoniumsulfat keine spontane Säuerung, so daß ein Nachalkalisieren meist unterbleiben konnte.

Nach achttägigem Verweilen der Bakterien im Ammonsulfat wurde durch gehärtete Filter filtriert, der Bakterienniederschlag in 20—30 ccm destillierten Wassers aufgeschwemmt (falls nötig mit verdünnter Sodalösung schwach alkalisiert).

Dreitägige Autolyse bei 37°. Mit den resultierenden Flüssigkeiten (teils durch Pukal filtriert, teils unfiltriert) hat SCHÜTZE Kaninchen immunisiert.

Im Gegensatz zu den Typhusversuchen wurden hoher bakterizider Titer $^{1}/_{10\,000}$ und geringe Agglutinationswerte erzielt.

Es gelang MAYER ferner durch einfaches 8—48stündiges Ausschütteln von Choleravibrionen in destilliertem Wasser aus den Bakterien ein wirksames Antigen zu extrahieren. Zu dem Zweck wurde die 24-

stündige Ernte von vier Agarröhrchen in 20 ccm destillierten Wassers 6 resp. 48 Stunden lang vor Licht geschützt, im Schüttelapparat gehalten.

Filtration durch Pukal. Intravenöse Injektion an Kaninchen.

30 ccm 48 Stunden geschüttelten Extraktes bewirkten Titersteigerung bis $^1/_{10000}$, Agglutination $^1/_{200}$.

Bei der Behandlung mit 6stündigen Extrakten wurden geringere Werte erzielt.

Methoden der Immunisierung mit Vibrionenextrakten.

Darstellung des „Anticholerins" nach Klebs[45]).

Massenkulturen von Choleravibrionen werden abgetötet, filtriert und auf dem Wasserbad eingeengt. Ausfällen mit Alkohol (zur Entfernung der „toxischen (!) Substanzen).

Die vom Niederschlag getrennte Flüssigkeit enthält das schützende und heilende Prinzip „Anticholerin" (!).

Dieses Mittel soll, zum Nährboden zugesetzt, entwicklungshemmend auf die Vibrionen wirken, der Kultur zugesetzt, das Wachstum aufheben.

Anticholerin ist unschädlich für Mensch und Tier; Meerschweine sind nach der Vorbehandlung mit diesem Stoff gegen die intraperitoneale Infektion geschützt. Auch beim cholerakranken Menschen will Klebs mit diesem Mittel Erfolge erzielt haben.

Auch Wassermann[83]) hatte in den ersten Zeiten der Cholera-immunisierung das Bestreben, das immunisierende Prinzip aus den Zellleibern zu gewinnen.

Methode von Wassermann[83]).

1000 ccm drei- bis fünftägige Bouillonkultur wurden bei 70—80° zur Syrupkonsistenz eingeengt. Der Rückstand wird in absoluten Alkohol eingeträufelt; es entsteht ein massiger Niederschlag. Dieser wird abfiltriert und im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

0,005 ccm dieses Präparates verleiht Meerschweinchen in 24 Stunden Schutz gegen die tödliche Infektion (Resistenz!), größere Dosen wirken toxisch für Meerschweinchen.

Methode der Immunisierung mit Choleranukleoproteid (Lustig-Galeotti) nach Heller[42]) und Schmitz[70]).

Heller und Schmitz haben analog der von Lustig für Pest angegebenen Methode auch bei Cholera eine Extraktion der wirksamen Stoffe aus den Bakterienleibern mittels chemischer Reagenzien versucht.

Der dabei resultierende Körper gehört nach seinen Eiweißreaktionen zu den Nukleoproteiden („Choleranukleoproteid").

Darstellung des Choleranukleoproteids. Die Ernte drei- bis viertägiger Agarmassenkulturen wird in 1 %iger Kalilauge abgeschwemmt. Die Kalilauge bringt die Bakterien zum Quellen und schließlich zur Auflösung; so entsteht nach zwei- bis dreistündiger Einwirkung eine fadenziehende opaleszierende Masse.

Allmähliches Ansäuern mit 1 %iger Essigsäure unter Umrühren: es fällt dabei das Nukleoproteid in dicken Flocken aus. Die Flüssigkeit wird abgegossen, der Niederschlag mit wiederholt gewechseltem, destilliertem Wasser so lange versetzt, bis die Reaktion nur noch schwach

sauer ist. Dann wird der Niederschlag auf ein steriles Filter gebracht und gewaschen bis das Waschwasser neutrale Reaktion zeigt.

Der Niederschlag wird im Vakuum in sterilen Schalen getrocknet und das resultierende hellbraune Pulver in dunklen Flaschen aufbewahrt.

Zur Injektion wird kurz vor der Verwendung das Pulver in 1 %iger Sodalösung aufgelöst.

Der Impfstoff selbst kommt (im Tierversuch) zweckmäßig in 1—2 %iger Lösung subkutan zur Verwendung; bei höherer Konzentration ist die Resorption langsam und ungenügend, auch entstehen Abszesse (keimfreie Darstellung nach SCHMITZ sehr schwierig). Die Giftigkeit des Nukleoproteids ist eine sehr hohe (Dosis letalis 10—15 mg pro 100 g Meerschweinchen; zuweilen gehen aber empfindliche Tiere schon an Dosen von 1 mg ein (!)).

Die Virulenz der Kultur ist nach SCHMITZ Versuchen mit zwei verschiedenen Stämmen dabei ohne Einfluß.

Immunisierende Dosis für Meerschweinchen (subkutan) 1—5 mg einmalige Injektion genügt.

Dauer der Immunität bis $^1/_2$ Jahr (gegen die einfache (!) letale Dosis). Bereits nach drei Stunden sind die Tiere gegen die einfache, nach 48 Stunden gegen die doppelte letale Dosis geschützt. Im Gegensatz zu den Versuchen bei Typhus und Rattenversuchen von CALMETTE und SALIMBENI bei Pest, ist auch von SCHMITZ bei Cholera eine negative Phase nicht beobachtet. (SCHMITZ läßt es unentschieden, ob die so schnell eintretende Widerstandsfähigkeit auf spezifischer Immunität oder Resistenz beruht.)

Durch längere Zeit fortgesetzte Behandlung mit Nukleoproteid gewinnt das Serum agglutinierende Eigenschaften bis etwa $^1/_{1000}$.

Auch Antikörper wurden mittels des Komplementablenkungsverfahrens (Versuchsanordnung BORDET-GENGOU) nachgewiesen.

Bei der Umständlichkeit der Darstellung der von SCHMITZ selbst zugestandenen Schwierigkeiten, ein keimfreies Material zu erhalten, bei der keineswegs übermäßigen Antikörperbildung, vor allem aber in Anbetracht der hohen Giftigkeit des Materials läßt sich sagen, daß das Verfahren gegenüber der Verwendung von Vollbakterien nur Nachteile aufweist.

Literatur.

1) BASSENGE und MAYER, Zur Schutzimpfung gegen Typhus. Deutsche med. Wochenschr. 1905, pag. 697.
2) BERTARELLI, Über aktive Immunisierung des Menschen gegen Cholera. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 33.
3) BESREDKA, De l'immunisation active contre la peste le choléra et l'infection typhique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, pag. 918.
4) BRIEGER, KITASATO und WASSERMANN, Über Immunität und Giftfestigung. Zeitschrift für Hyg. 1892, Bd. XII, pag. 137.
5) BRIEGER und MAYER, Weitere Versuche zur Darstellung spezifischer Substanzen aus Bakterien. Deutsche med. Wochenschr. 1903, pag. 309.
6) BRIEGER und WASSERMANN, Über künstliche Schutzimpfung von Tieren gegen Cholera asiatica. Deutsche med. Wochenschr. 1892, pag. 701.
7) BROUARDEL, CHARRIN u. ALBARRAN, Rapport sur les essais de vaccination cholérique entrepris en Espagne par M. le. Dr. Ferran. Annales d'hygiene 1885, Tome XIV.
8) BROWN, Cholera and its treatment by preventive inoculation in the Darbhanga Jail. Indian med. Gaz. 1896, pag. 247.

9) Fedoroff, Zur Frage der künstlichen Immunität bei Cholera asiatica. Medicinsk Obosrenie 1892, Bd. XXXVIII, pag. 523.
10) Ders., Zur Therapie der Cholera asiatica. Zeitschr. für Hyg. 1893, Bd. XIII, pag. 393.
11) Ferran, Bericht an die Akademie in Barcelona, 16. Juli 1884, cf. Guttmann. Deutsche med. Wochenschr. 1892, pag. 910.
12) Ders., Sur l'action pathogéne et prophylactique du bacillus-virgule 1885.
13) Ders., Sur la prophylaxie du choléra au moyen d'injections hypodermiques des cultures pures du bacille-virgule. Compt. rend. de l'Acad. des sciences 1885.
14) Ders., A propos de la communication de Mr. Haffkine sur la choléra asiatique. Compt. rend. de la soc. de Biol. 1892.
15) Ferran und Pauli, Le principe actif du comma bacille, comme cause de mort et d'immunité. Compt. rend. de l'Acad. des Sciences, Tome CII.
16) Ferran, Note pour revendiquer la priorité de la l'immunite de la vaccine contre le choléra. Barcelona 1897. Ref. Centralbl. für Bakt., Bd. XXII, pag. 489.
17) Friedberger, Über die Immunisierung von Kaninchen gegen Cholera durch intravenöse Injektion minimaler Mengen abgetöte Vibrionen. Festschr. z. 70. Geburtst. E. v. Leydens. Bd. II.
18) Friedberger und Moreschi, Beitrag zur aktiven Immunisierung des Menschen gegen Typhus. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 44.
19) Dies., Über Rassendifferenzen von Typhusstämmen. Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 45.
20) Dies., Vergleichende Untersuchungen über die aktive Immunisierung von Kaninchen gegen Cholera und Typhus. Centralbl. für Bakt., Abt. I 1905, Bd. XXXIX, pag. 453.
21) Gamaleia, Compt. rend. de l'Acad. des sciences. Paris 1888. August 20.
22) Ders., Vaccination préventive du choléra asiatique. Sem. med. 1888.
23) Ders., Sur la vaccination cholérique. Compt. rend. de la soc. de Biol. 1889.
24) Gibier und van Ermengem, Recherches expérimentales sur le choléra. Compt. rend. de l'Acad. des sciences, Tome CI.
25) Galeotti, Über den heutigen Stand der Frage über die Immunität und Bakteriotherapie gegen die asiatische Cholera. Centralbl. für allgem. Pathologie und pathol. Anatomie, Bd. VI, Nr. 12 und 13.
26) Gruber und Wiener, Cholerastudien. Arch. für Hygiene, Bd. XIV.
27) Gruber, Theorie der aktiven und passiven Immunität gegen Cholera, Typhus und verwandte Krankheitsprozesse. Münchener med. Wochenschr. 1896, Nr. 9.
28) Haan, Le choléra à Calcutta en 1894 et la vaccination anticholérique. Arch. génér. de Méd., pag. 202.
29) Haffkine, Le choléra asiatique chez le Lapins e le pigeon. Bull. méd. 1892, Nr. 58, pag. 1084.
30) Ders., Le choléra asiatique chez le cobaye. La Sem. méd. 1892, Nr. 36.
31) Ders., Inoculation de vaccins anticholériques à l'homme. Bull. med. 1892, Nr. 67, pag. 1113.
32) Ders., A lecture on anticholeraic inoculation. The Lancet 1893, 11. Februar.
33) Ders., Anticholera inoculation, Report to the Government of India. Calcutta, Thacker, Spink and Co. 1895. Indian med. Gaz. 1895. October.
34) Ders., A lecture on vaccination against asiatic cholera. Brit. med. Journ. 1895, 21. December 1895.
35) Ders., On the inoculation of coolies. Indian med. Gaz. 1896. July.
36) Ders., On preventive inoculations. Proc. of the Royal soc., Vol. LXV.
37) Ders., Les vaccinations anticholériques aux Indes. Bull. de l'Institut Pasteur, Tome IV, Nr. 17, 18.
38) Ders., A lecture on vaccination against Cholera. Indian med. Gaz. 1896, pag. 81.
39) Hankin, Annual Report of the Chemical Examiner and Bacteriologist to the Governments of the North Western Provinces and Oudh and of the Central Provinces for the year 1894. Allahabad, Government Prep 1895.
40) Hare, Technique of Haffkines Anti-Cholera inculations. Indian med. Gaz. 1896, pag. 193.
41) Ders., 1. Notes on Dr. Haffkines Anticholerainoculationes in Assam, Cachar and Sylhet from October 1904 to July 1895. Indian med. Gaz. 1896, pag. 9.
41) Heller, Versuche zur Schutzimpfung gegen Cholera mit Choleranukleoproteid. Centralbl. für Bakt., Abt. I, Orig., Bd. XXXIX, pag. 106.
42) Hetsch, Choleraimmunität in Kolle-Wassermann, Bd. IV, pag. 1041.
44) Jawein, Observations sur des cobayes immunisès par les vaccin, anticholériques vivants. Ann. de l'Institut Pasteur 1892, Nr. 10, pag. 708.

45) Klebs, Zur Pathologie und Therapie der Cholera asiatica. Deutsche med. Wochenschrift 1892, Nr. 43/44, pag. 975.
46) Klemperer, Untersuchungen über künstlichen Impfschutz gegen Choleraintoxikation. Berliner klin. Wochenschr. 1892, pag. 789.
47) Ders., Untersuchungen über Schutzimpfung des Menschen gegen die asiatische Cholera. Berliner klin. Wochenschr. 1892, Nr. 39, pag. 969.
48) Ders., Weitere Untersuchungen usw. Ebenda, pag. 1265.
49) Kolle, Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Schutzimpfung des Menschen gegen Cholera asiatica. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 1, pag. 4.
50) Kolle, zit. nach Lentz, Immunität bei Typhus. Handbuch von Kolle-Wassermann, Bd. IV, pag. 849.
51) Ders., Die aktive Immunisierung des Menschen gegen Cholera nach Haffkines Verfahren in Indien ausgeführt. Centralbl. für Bakt. 1896, Abt. I, Bd. XXIX, pag. 217.
52) Löffler, Über ein neues Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern. Deutsche med. Wochenschr. 1904, pag. 1913.
53) Mabry und Gemill, Cholera abound the u. s. army transport Sherman. Journ. of Americ. med. Assoc. 1902, 20. Dez.
54) Mayer, Weitere Versuche zur Darstellung spezifischer Substanzen aus Bakterien. Deutsche med. Wochenschr. 1904, pag. 56.
55) Marx, Diagnostik, Serumtherapie und Prophylaxe. Berlin 1907, II. Aufl., pag. 811.
55a) Meinicke, Jaffe und Flemming, Über die Bindungsverhältnisse der Choleravibrionen. Zeitschr. für Hygiene 1906, Bd. LII, pag. 416.
56) Murata, Über Schutzimpfung gegen Cholera. Centralbl. für Bakteriol. 1904, Bd. XXXV, pag. 605.
57) Neisser und Shiga, Über freie Receptoren von Typhus- und Dysenteriebazillen und über Dysenterietoxin. Deutsche med. Wochenschr. 1903, pag. 61.
58) Nicati und Rietsch, Recherches sur le choléra. Revue de médicin, Vol. V, Juni 1883.
59) Pawlowsky und Buchstab, Zur Immunitätsfrage und Blutserumtherapie gegen Cholerainfektion usw. Deutsche med. Wochenschr. 1893, pag. 516.
60) Pfeiffer, Studien zur Choleraätiologie. Zeitschr. für Hygiene 1894, Bd. XVI, pag. 268.
61) Ders., Weitere Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität und über spezifisch bakterizide Prozesse. Zeitschr. f. Hygiene 1894, Bd. XVIII, pag. 1.
62) Ders., Die Differentialdiagnose der Vibrionen der Cholera asiatica mit Hilfe der Immunisierung. Zeitschr. f. Hygiene 1895, Bd. XIX, pag. 75.
63) Ders., Weitere Mitteilungen über die spezifischen Antikörper der Cholera. Zeitschrift für Hygiene 1895, Bd. XX, pag. 198.
64) Ders., Ein neues Grundgesetz der Immunität. Deutsche med. Wochenschr. 1896.
65) Pfeiffer und Friedberger, Über das Wesen der Bakterienvirulenz nach Untersuchungen an Choleravibrionen. Berliner klin. Wochenschr. 1902, pag. 681.
66) Pfeiffer und Issaeff, Über die spezifische Bedeutung der Choleraimmunität. Zeitschr. für Hygiene 1894, Bd. XVII, pag. 355.
67) Pfeiffer und Kolle, Weitere Untersuchungen über die spezifische Immunitätsreaktion der Choleravibrionen im Tierkörper und Reagenzglase. Centralbl. für Bakt. 1896, Abt. I, Bd. XX, pag. 129.
67a) Pfeiffer und Marx, Schutzimpfungen gegen Cholera und Typhus mit konserviertem Impfstoff. Deutsche med. Woshenschr. 1898, pag. 489.
68) Pfeiffer und Wassermann, Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität. Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIV, pag. 46.
68a) Powell, Results of Mons. Haffkines Anti-Cholera-Inoculations in Carhor. Ind. med. Gaz. 1895. July.
69) Rossbach, Cholera indica und Cholera nostras. v. Ziemssens Handb. d. spez. Pathologie und Therapie. Leipzig (Vogel) 1886.
69a) Brigade-Surgeon Leutn. Col. Sander's Criticism on the Cholerainoculation of Calcutta and Serampur and Dr. Simpson's Reply.
Speech of the municipal Meeting. (Ohne Jahreszahl und Druckort.
70) Schmitz, Untersuchungen über das nach der Lustigschen Methode bereitete Choleravaccin. Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXII, pag. 1.
71) Simpson, Two Years of Anti-Cholerainoculations: being a report submitted to the Chairmon of the Calcutta corporation on July. Indian med. Gaz. 1896, pag. 275.
72) Sobernheim, Die Immunisierung gegen den Vibrio der Cholera asiatica. Hyg. Rundschau 1897, Nr. 411.
73) Ders., Experimentelle Untersuchungen über Choleragift und Choleraschutz. Zeitschrift für Hygiene 1893, Bd. XIV, pag. 485.

74) Sola, E., Fortschritte der Medizin 1885, pag. 114.
75) Strong, zit. nach Wassermann. Compt. rend. Tome XIII. Congr. d'hygiène, Brüssel 1903, Tome II.
76) Ders., Protectiv inoculation against asiatica cholera. Manila 1904. Ref. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVII, p. 286.
77) Tamamchfff, Expérienses sur les vaccins phéniqués de Haffkine. Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, p. 713.
78) Tenon de Lara, Bei Grawitz. Die Cholera. Virchow-Hirschs Jahresbericht 1885, p. 306.
79) Tsuzuki, Bericht über meine epidemiologischen Beobachtungen: Forschungen während der Choleraepidemie in Nordchina im Jahre 1902 und über die im Verlauf derselben von mir durchgeführten prophylaktischen Maßregeln mit besonderer Berücksichtigung der Choleraschutzimpfung. Arch. für Schiffs- u. Tropenhygiene 1904, Bd. VIII, pag. 71.
80) Vincenzi, Über Cholera. Vorläufige Mitteilung. Deutsche med. Wochenschr. 1892.
81) Voges, Die Choleraimmunität. Centralbl. f. Bakt. 1896, Abt. I, Bd. XIX, pag. 325.
82) Wassermann, Experimentelle Beiträge zur Frage der aktiven Immunisierung des Menschen. Festschr. zum 60. Geburtstag R. Kochs, Jena 1903, p. 527.
83) Ders., Untersuchungen über Immunität gegen Cholera asiatica. Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIV, pag. 35.
84) Wrigth und Surgeon-Captain D. Bruce, On Haffkines method of vaccination against asiatic cholera. Brit. med. Journal, 4. February 1893.
85) Zäslein, Sulla vaccinazione del cholera. Riv. clin. arch. ital. clin. 1890.

XII.

Die Methoden der Schutzimpfung des Menschen gegen Pest.

Von

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. A. Wassermann und Dr. J. Leuchs

in Berlin.

Der wichtigste Punkt für die Gewinnung jedes Pest-Antigens ist und bleibt die verwendete Pestkultur. Am besten benutzt man zu Schutzimpfungszwecken gegenüber Pest die Kulturmasse von jungen, etwa 48stündigen Agarkulturen. Aber auch bei der Verwendung von Bouillonkulturen ist es empfehlenswert, sich immer erst durch Ausstrich auf Agar von der Reinheit derselben zu überzeugen, ehe man dieselben zur Herstellung eines Pestimpfstoffes verwendet. Was die beste Zusammensetzung des Agars für das Wachstum der Pestbazillen angeht, so liegt darüber eine große Literatur vor. Die Entdecker des Pestbazillus KITASATO[1]), YERSIN[2]) geben dem Glyzerinagar den Vorzug vor dem gewöhnlichen. WILM[3]) schließt sich ihnen an. KOLLE[4]) fand, daß Traubenzuckerzusatz zu den Nährmedien ein üppiges Wachstum des Pestbazillus bedinge. Auch TERNI[5]) hält einen 3 %igen Glyzerinzusatz für wachstumbefördernd. Demgegenüber sehen dagegen WLADIMIROFF, KRESSLING[6]), sowie KASANSKI[7]), ALBRECHT und GHON[8]) keinen Vorteil, weder von Glyzerin noch von Traubenzuckerzusatz, ja ALBRECHT und GHON geben sogar an, daß der Zusatz von 5 % Glyzerin dem Wachstum schädlich sei. Betreffs der Reaktion des Nährbodens sind alle kompetenten Untersucher darüber einig, daß das Optimum in einer neutralen bezw. schwach alkalischen Reaktion besteht. In diesem Sinne äußern sich ALBRECHT und GHON a. a. O., weiterhin die Deutsche Pestkommission[9]), SEGANZA[10]), ZLATOGOROFF[11]), KOSSEL und OVERBECK[12]). Diese letzteren Autoren geben genaue Angaben über die Art der Alkalisierung des Nährbodens. Sie gehen dabei aus von der von MAASSEN[13]) angegebenen Methode zur Alkalisierung des Agars. Man versetzt den Agar mit soviel Natronlauge, daß blaues Lackmuspapier (auf Postpapier der Fabrik von E. Diedrich in Helfenberg bei Dresden) nicht mehr gerötet wird. Dann fügt man 0,5 g kristallisierten Soda auf 1 Liter Agar hinzu. Bei dieser Reaktion zeigt der Pestbazillus nach diesen Autoren das beste Wachstum. Der Peptonzusatz soll 1 % betragen, Kochsalz ½ %. Auch über das Temperaturoptimum liegen ausgedehnte Beobachtungen vor. Außer von den genannten Autoren seien in dieser Hinsicht noch die Arbeiten von LIGNIÈRES[14]), von MARKL[15]) genannt. Alle Autoren stimmen

darin überein, daß relativ niedere Temperaturgrade für das Gedeihen des Pestbazillus besser sind als höhere. Das Temperaturoptimum liegt etwa zwischen 30—35 °, 37 ° sind bereits zu vermeiden. Zwischen 30 und 35 ° wachsen die Pestkulturen gleich gut, so daß ein Optimum innerhalb dieser Temperaturgrenze nicht festzustellen ist. Doch gedeihen die Pestkulturen selbst bei einer Temperatur von 20—30 ° noch ausgezeichnet und manche der genannten Autoren geben sogar diesen Temperaturen den Vorzug. Als weiterer wichtiger Punkt für das Gedeihen von guten Agarkulturen ist die Feuchtigkeit des Nährmediums hervorzuheben. Der Agar darf nicht ausgetrocknet sein, sondern muß Kondenswasser enthalten, die Oberfläche desselben muß feuchtspiegelnd sein.

Für die Bouillonkulturen gelten, was Pepton, Kochsalz, Alkaleszenz und Temperaturoptimum angeht, dieselben Vorschriften. Auf besondere Zusätze, die der Bouillon seitens einzelner Autoren gemacht werden, wie z. B. Überschichten mit Fett, wird weiter unten noch zurückgekommen werden.

Zwecks Gewinnung wirksamer Impfstoffe gegenüber Pest wurden von den Autoren die mannigfachsten Methoden verwendet. Im allgemeinen lassen sich dieselben derart klassifizieren, daß eine Reihe von Autoren mit den abgetöteten Bazillen, andere mit abgeschwächten lebenden, wiederum andere mit vollvirulenten lebenden, eine weitere Anzahl mit den Leibessubstanzen, Endotoxinen, Toxinen, Nukleoproteinen der Pestbazillen immunisieren. Endlich wendet eine Anzahl Forscher die Simultanmethode, d. h. die gleichzeitige Injektion von Pestserum und Pestantigen zwecks Schutzverleihung an. Es dürfte sich empfehlen, nach dieser Einteilung die von den einzelnen Autoren verwendeten Methoden im einzelnen nachfolgend kurz zu besprechen.

I. Abgetötete Pestbazillen als Antigen zwecks Schutzimpfung gegen Pest.

Yersin, Calmette, Borrel[16]) benutzen abgetötete Bazillenleiber. Sie schwemmten Agarkulturen in wenig Bouillon auf und erhitzten diese Aufschwemmung für 1 Stunde auf 58 °. Eine einmalige oder einmal wiederholte intravenöse oder subkutane Injektion dieser erhitzten Bakterienmassen in Mengen, welche die Tiere krank machten, aber nicht töteten, vermochten Kaninchen gegen eine spätere Infektion mit virulent lebenden Pestbazillen zu schützen. Indessen mußte dabei stets beachtet werden, daß die Prüfung auf die erlangte Immunität genügend lange Zeit nach der letzten Schutzimpfung, wenn sich die Tiere vollständig von derselben erholt hatten, ausgeführt wurde. Sicherer wurde der Impfschutz erreicht, wenn mit dem gleichen Antigen die Tiere mehrmals, drei- bis viermal in ca. fünftägigen Zwischenräumen injiziert wurden. Es gelang dann ziemlich regelmäßig, Kaninchen gegen eine subkutane Infektion mit lebenden virulenten Bazillen zu schützen. Dagegen gelang dies selten bei Meerschweinchen. Kolle[17]) verwendete zur Schutzimpfung an Ratten und Meerschweinchen durch mehrstündiges Erhitzen auf 65 ° abgetötete Kulturmasse von Agarkulturen. Hiermit wurde subkutan geimpft und die Tiere überstanden 16 Tage nach der Impfung eine subkutane Infektion mit lebender Pestkultur. Kolle injizierte weiterhin zwei Menschen je eine in 2 ccm Bouillon aufgeschwemmte, mit 1 % Karbol versetzte und dadurch abgetötete Agarkultur subkutan. Es stellte

sich Fieber, Kopfschmerzen und schmerzhafte Infiltration an der Injektionsstelle ein.

WYSSOKOWITZ und ZABOLOTNY[17a]) konnten durch Präventivimpfungen mit auf 60° erhitzten Agarkulturen bei Affen eine Immunität erzielen, welche 7 Tage nach der Impfung in die Erscheinung trat und 21 Tage nach derselben noch nachzuweisen war.

Die ausgedehntesten Versuche über die praktische Anwendung abgetöteter Pestbazillen rühren von HAFFKINE[18]) her.

HAFFKINE ging von der Idee aus, daß neben den in den Bakterienleibern enthaltenen Giftstoffen auch etwaige sezernierte Toxine zur Wirksamkeit gelangen sollten.

Ein Kilo mageres Ziegenfleisch wird — von Sehnen und Bindegewebe usw. tunlichst befreit — in einer Fleischmühle fein zermahlen, sodann mit 125 g Salzsäure übergossen, im Autoktav bei drei Atmosphären Druck mehrere Stunden digeriert. Dann entsteht aus dem Ganzen eine gleichmäßige, dunkle, bernsteingelbe, dick-ölflüssige Masse. Diese wird filtriert und mit Wasser soweit verdünnt, daß ein 1 $^0/_0$ iger Pepton- resp. Albumingehalt der Bouillon resultiert (etwa die siebenfache Menge Wasser). Darauf Neutralisation der Bouillon mit Cal. carbon. und Kochsalzzusatz bis zum physiologischen Kochsalzgehalt. Sterilisation.

Diese Bouillon wird in große Glaskolben von ca. 20 cm Durchmesser mit flachem, breitem Boden eingefüllt und zwar zu je $2^1/_2$ Liter, so daß sie etwa drei bis vier fingerhoch im Kolben steht.

Sodann werden einige Tropfen Olivenöl oder sterilisiertes Butterfett hinzugefügt, welche selbstverständlich auf der Bouillon schwimmen. Dadurch wird erreicht, daß die in die Bouillon eingeimpften Pestbazillen von diesen festen Stützpunkten aus als Haut über die Oberfläche der Bouillon wachsen.

Die beimpften Kolben werden sechs Wochen lang bei 25—30° C bebrütet und jeden zweiten bis dritten Tag tüchtig umgeschüttelt, so daß die an der Oberfläche gewachsenen Bakterienmassen zu Boden sinken, wodurch dann immer wieder neues Oberflächenwachstum ermöglicht wird, solange ein solches in der betreffenden Quantität Bouillon überhaupt noch erfolgen kann. Hierbei wird die anfänglich klare Bouillon allmählich trübe, bis sie schließlich in eine kaum noch durchscheinende, etwas dicker als Wasser flüssige, geruchlose, harngelbe Flüssigkeit umgewandelt ist.

Nach Ablauf der sechs Wochen wird die Kultur eines jeden Kolbens durch Verimpfung auf Agar zunächst auf Reinheit geprüft, dann im Wasserbad bei 65° eine bis mehrere Stunden lang sterilisiert. Hat erneute Überimpfung auf Agar Sterilität ergeben, so wird soviel Karbolsäure zugesetzt, daß eine 0,5 $^0/_0$ ige Lösung entsteht. Hierauf erfolgt Abfüllung in Gläschen von 30 ccm Inhalt. Der Schutzwert wird schätzungsweise nach der Trübung der Flüssigkeit im Vergleich zu einer gleich großen Pestkultur festgestellt. Die zu Boden gefallenen Bazillenmassen müssen vor dem Gebrauche aufgeschüttelt werden.

Impfdosis bei subkutaner Injektion:

erwachsener Männer $3—3^1/_2$ ccm
Frauen $2—2^1/_2$ „
Kinder über 10 Jahren 1 „
kleine Kinder 0,1—0,5 „

Späterhin wurden weit größere Mengen (bis zu 20 ccm) gegeben. Die Impfung wird in der Regel am Oberarm oder am Bauch ausgeführt. Die der Impfung folgenden Reaktionen, bestehend in Temperatursteigerung bis zu 39° C, allgemeinem Unwohlsein, Schwellung, Infiltration und Schmerzhaftigkeit der Impfstelle, sind meist nach 24—48 Stunden wieder abgeklungen und können individuell recht verschieden stark, namentlich hinsichtlich der Temperatursteigerung, auftreten, so daß sie der einen Person recht starke Beschwerden verursachen können, während sie bei einer anderen manchmal gänzlich fehlen können. Nach 8—10 Tagen wird die Impfung womöglich mit einer stärkeren Dosis wiederholt.

Modifikation der Haffkineschen Impfungsmethode nach Mallannah[19]). Nach diesem Autor besitzt das Filtrat des Haffkineschen Impfstoffes genau solche immunisierenden Eigenschaften, wie die von Haffkine angewendete ganze, gut durchgeschüttelte Flüssigkeit, wobei noch ein Vorteil darin bestehe, daß dieses Filtrat keine Reaktion an der Injektionsstelle hervorruft.

Gabritschewsky[20]) verwendete Kulturen, die durch Glyzerinzusatz sterilisiert worden waren. Agarplatten (30—40 ccm Agar) wurden mit Bouillonkultur geimpft. Nach 24—48 Stunden Bebrütung bei 37° C war eine reichliche Entwicklung der Pestbakterien eingetreten. Die Kulturmasse wurde mit einem Platinspatel abgekratzt, und die so gewonnene Bakterienmasse in Röhrchen mit je zwei 2 ccm Glyzerin übertragen. Nach 24stündigem Verweilen dieser Aufschwemmung im Brutschrank bildet sich eine trübe, schleimige Masse. Diese mit gleichen Teilen Bouillon verdünnt, stellt den zum Gebrauch fertigen Impfstoff dar. Derselbe wurde Pferden subkutan injiziert. An der Impfstelle trat ein großes Infiltrat auf. Die Temperatur stieg bis 39,2° C. Bei intravenöser Injektion stieg die Temperatur bis 40° C, um nach 24—48 Stunden wieder zu sinken.

Diese Immunisierungsmethode eignet sich nur für Pferde, da für Mäuse das Glyzerin giftig ist und bei Kaninchen und Meerschweinchen lokale Nekrose eintritt.

Der Autor sucht durch sein Verfahren immunisierende und toxische Stoffe aus den Kulturen des Pestbazillus durch Plasmolyse zu erhalten.

Impfstoff der deutschen Pestkommission[21]). Vollentwickelte, zwei Tage alte Pestkulturen auf Agar werden in Bouillon aufgeschwemmt, durch einstündiges Erhitzen auf 65° sterilisiert und weil das eine Stunde erhitzte Vaccin, wenn es sich um größere Massen handelt, noch lebende Keime enthalten kann, mit $^1/_2$ % Phenol versetzt, wodurch die Sterilisierung absolut zuverlässig garantiert wird, während die Wirksamkeit des Vaccins sich dadurch nicht beeinträchtigt zeigt.

Die Karbolsäure darf erst nach dem Erhitzen des Pestimpfstoffes zugesetzt werden, läßt man sie auf die frischen noch lebenden Kulturen einwirken, so werden die immunisierenden Substanzen in den Pestbazillen zerstört.

Niedriger als 65° gewählte Temperaturen zur Abtötung, ergeben kein besser wirksames Vaccin, durch Kochhitze wird die immunisierende Wirkung schon in kürzester Zeit zerstört.

Die Virulenz der zur Herstellung des Vaccins benutzten Pestkultur ist von wesentlicher Bedeutung. Die deutsche Kommission sieht sich zu der Forderung veranlaßt, daß „Pestkulturen, welche zu Präventivimpfungen dienen sollen, entweder frisch aus der Pestleiche gezüchtet oder doch mindestens durch andauernde Tierpassagen auf der Höhe ihrer pathogenen Wirkung erhalten werden müssen."

Die Kommission machte ihre Versuche an Affen und Ratten.

Makaken, welche eine ganze zweitägige, durch vorsichtiges Erhitzen abgetötete Pestkultur subkutan injiziert erhalten hatten, vertrugen später fast ohne Reaktion die Einverleibung einer vollen Öse vollvirulenter, lebender, 24stündiger Pestagarkultur. Tiere, die in dieser Weise einmal vorbehandelt worden waren, widerstanden nur einer subkutanen, nicht jedoch einer intraperitonealen Infektion. Offenbar gelingt es jedoch, durch intraperitoneale Einverleibung größerer Dosen abgetöteter Pestagarkultur, den Tieren auch Schutz gegen eine spätere intraperitoneale Infektion zu verleihen. Während durch eine ganze abgetötete Pestagarkultur in allen Fällen ein ausreichender Schutz gegen eine nachherige subkutane Infektion erzielt worden war, vermochte die Vorbehandlung mit $^1/_5$ und $^1/_{10}$ Agarkultur die Tiere nicht mehr zu immunisieren. Des weiteren wurde an diesen Affen festgestellt, daß die aktiv erworbene Pestimmunität eine gewisse Zeit zu ihrer Entstehung bedarf. „Drei Tage nach der Schutzimpfung ist noch kaum eine Spur von Immunität vorhanden, nach fünf Tagen ist vielleicht schon eine Andeutung davon nachweisbar, aber erst nach sieben Tagen ist der Schutz vollständig entwickelt."

Auch bei den für Pest viel empfänglicheren grauen Affen (Semnopithecus entellus) ließ sich durch subkutane Injektion einer zweitägigen, abgetöteten Agarkultur wenigstens ein geringer Grad von Immunität erzielen. Es gingen zwar alle Tiere nach subkutaner Infektion mit 1 Öse virulenter Kultur ein, doch war der Tod entschieden sehr verzögert.

Wurden Ratten mit einer hinreichenden Quantität des Impfstoffes (zwei ganze üppig gewachsene Agarkulturen) vorbehandelt, so zeigten auch diese Tiere sich gegen eine sehr starke Infektion (1 Öse) von der Haut aus geschützt. Dagegen erlagen sie, wenn sie mit kleinen Mengen Pestkultur gefüttert wurden.

Die Dosis für die Immunisierung des Menschen soll nach der Kommission so hoch wie nur irgend möglich gewählt werden. Die Einverleibung einer zweitägigen, durch Erhitzen auf 65° und durch Zusatz von 0,5% Phenol sicher abgetöteten Pestagarkultur hatte in mehreren Fällen schon erhebliche lokale Entzündungserscheinungen und ziemlich hohes, wenn auch rasch vorübergehendes Fieber zur Folge. Meist wurde diese Dosis jedoch mit sehr geringen Reaktionen vertragen. Obwohl die Kommission mit der Möglichkeit rechnet, daß sich weiterhin die von ihr in Vorschlag gebrachte Impfdosis (eine Agarkultur für einen ausgewachsenen Menschen) als zu niedrig erweisen könnte, glaubt sie doch, daß man mit Rücksicht auf die vorher gar nicht zu berechnende individuelle Empfindlichkeit gegen die toxischen Produkte des Pestbazillus vorläufig nicht über dieselbe hinausgehen solle.

Kolle[21a]) bringt einige vorteilhafte Maßnahmen, namentlich für die Herstellung dieses Impfstoffes im großen in Vorschlag. Er empfiehlt, recht festen Agar zu benutzen, damit die Kulturmasse möglichst leicht von der Agarfläche abzustreichen sei. Um die Ausbeute an Kulturmasse möglichst groß zu gestalten, ist es zweckmäßig, ganz weite Agarröhrchen zu verwenden. Bei der Beimpfung empfiehlt es sich, die Agarfläche reichlich zu befeuchten, wodurch sich ein üppiges Wachstum erzielen läßt. Die Kulturmasse wird mit physiologischer Kochsalzlösung unter Benutzung eines ganz starken, 1 mm dicken Platinstabes abgestrichen. Bei sehr konzentrierten Aufschwemmungen läßt sich selbst durch mehrstündiges Erhitzen auf 65° C nicht immer ein sicheres Abtöten der

Bakterien erreichen. Dies gelingt mit Sicherheit, wenn man die Aufschwemmungen während der Zeit der Erhitzung auf 65° (1 Stunde) in einem Schüttelapparat stark schüttelt, wodurch auch die sämtlichen, in der Aufschwemmung enthaltenen Bakterienkonglomerate zersprengt werden. Der geübte Arbeiter kann bis zu 200 Dosen des Impfstoffes (Dose = 1 Agarkultur) in 1 Stunde herstellen.

Herstellung des Impfstoffes der deutschen Kommission nach Tavel[22]). Agarflaschen mit großer Kulturfläche werden mit zweitägigen virulenten Serumkulturen, die aus dem Herzblute einer mit Pest infizierten und daran gestorbenen Ratte gewonnen worden sind, geimpft, 3 Tage im Brutschrank bei 30° C belassen, hierauf mit steriler Bouillon aufgeschwemmt und die Aufschwemmung bei 65° C 1 Stunde lang im Heißluftschrank sterilisiert. Für je 10 qcm Kulturfläche verwendet man 3 ccm Bouillon zur Aufschwemmung. Die Dosis dieses Impfstoffes für einen erwachsenen Menschen beträgt 3 ccm, für eine Ratte von 200 g Gewicht 6 ccm.

Modifikation des Impfstoffes der deutschen Kommission nach Conçalves Cruz[23]). Conçalves Cruz benützt nach dem Vorgange der deutschen Kommission zur Herstellung eines Impfstoffes zur aktiven Immunisierung gegen Pest Pestagarkulturen. Er züchtet die durch Tierpassagen konstant virulent erhaltenen Pestbazillen auf 4% Glyzerinagar, welcher in Rouxsche Flaschen ausgegossen eine Oberfläche von 220 qcm darbietet. Die Beimpfung des Agars bewerkstelligt er mit Bouillonkultur, indem er sie über die ganze Oberfläche desselben fließen läßt. Nach dem Vorgange Markls und Lignières hält er diese beimpften Agarflaschen nicht bei Brutschranktemperatur, sondern bei Zimmertemperatur, um die Wirksamkeit der Pestbazillen nicht zu schädigen.

Das Wachstum einer jeden Flasche wird dann nicht mit Bouillon, sondern mit je 16 ccm physiologischer Kochsalzlösung (0,75%) vermittelst eines Platindrahtes abgeschwemmt. Man saugt die Aufschwemmung mit einer Kugelpipette auf, filtriert sie, um sie zur Erleichterung der Sterilisation möglichst homogen zu machen, durch ein engmaschiges, steriles Drahtnetz und bringt sie in kleine Pasteursche Kolben, dann folgt Sterilisation im Brutschrank von 65° C während einer Stunde. Gleichzeitig mit der Aufschwemmung bringt man einen gleichen, mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten und mit einem Thermometer versehenen Kolben in den Brutschrank. Erst von dem Zeitpunkt ab, an welchem die Kochsalzlösung eine Temperatur von 65° erreicht hat, rechnet man den Beginn der Sterilisation.

Nach beendeter Sterilisation folgt die Prüfung auf Sterilität, durch Anlegung von Kulturen und durch intraperitonale Impfung von für Pest empfänglichen Tieren mit der Aufschwemmung. Der Tod dieser Tiere darf nur durch Intoxikation, nicht durch Infektion mit Pestbazillen erfolgen. Zum Beweis dafür sind Kulturen aus dem Peritonealexsudat und aus der Milz anzulegen.

Zum Schlusse werden dem Impfstoff 0,5% Karbolsäure zugesetzt.

Als Impfdosis für den erwachsenen Menschen nimmt er nach der deutschen Kommission die Bazillenmenge an, die in einer bei 35° gewachsenen 48stündigen Agarkultur enthalten ist.

Um die Möglichkeit einer stets gleichmäßigen Dosierung des Impfstoffes zu besitzen, gibt er folgendes Verfahren an:

Zunächst bestimmte er das mittlere Gewicht der Bazillenmasse einer bei 35° gewachsenen 48stündigen Pestagarkultur und berechnet es zu 3 mg.

Die in der Aufschwemmung enthaltenen Bazillen werden zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um die aus dem Agar ausgelaugten Stoffe zu entfernen. Dann mißt er mit steriler Pipette z. B. 2 ccm dieser gewaschenen Emulsion ab, nachdem er sie vorher gut durchgeschüttelt hat. Diese 2 ccm Aufschwemmung werden in einer vorher gewogenen Platinschale im Wasserbad eingedampft, dann 24 Stunden über Schwefelsäure getrocknet. Der Rückstand, der somit aus Bazillenleibern und Kochsalz besteht, wird gewogen und soll z. B. 80 mg wiegen. Da eine 0,75 %ige Kochsalzlösung in Verwendung gelangte, bestehen diese 80 mg zu 15 mg aus Kochsalz und zu 65 mg aus Bazillenleibern. Es enthalten somit die 2 ccm Aufschwemmung 65 mg Bazillen und müßten diese 2 ccm Aufschwemmung, wie man durch eine einfache Rechnung finden kann, mit 41,22 ccm physiologischer Kochsalzlösung oder eine größere Menge Aufschwemmung (z. B. 16 ccm) mit entsprechend größeren Mengen Kochsalzlösung (330,66 ccm) verdünnt werden, damit in je 2 ccm der Verdünnung 3 mg abgetöteter Bazillen, d. h. die von der deutschen Kommission in Vorschlag gebrachte Impfdosis für einen erwachsenen Menschen enthalten ist.

In Brasilien wurden mit diesem Impfstoff Impfungen an Menschen mit gutem Erfolg ausgeführt.

Pestimpfstoff nach Calmette[24]). Der auf Agarröhrchen gewachsene Pestbazillenrasen wird auf dem Agar im Exsikkator eingetrocknet oder es werden Bouillonkulturen zuerst filtriert und der Rückstand eingetrocknet. Die gewonnene Masse wird pulverisiert und das Pulver in zugeschmolzenen Tuben aufbewahrt. Dasselbe kann leicht abgewogen, aufgelöst und injiziert werden.

Lebende voll virulente, sowie lebende abgeschwächte Pestbazillen als Antigen zwecks Schutzimpfung.

Versuche von Gaffky, Pfeiffer, Sticker, Dieudonné[25]). Eine derartige Immunisierung verbietet sich für Menschen von vornherein, da hier Hauptbedingung ist, daß die Impfung ungefährlich sei.

An Affen konnte die deutsche Kommission jedoch zeigen, daß „das einmalige Überstehen einer Pestinfektion einen fast absoluten Schutz gegen jeden, auch den schwersten Infektionsmodus verleihen kann. Ein Makakus radiatus verträgt nach einmaliger Impfung in eine Hauttasche am Arm, welchen Eingriff er nach mehrtägigem Kranksein überstand, eine weitere subkutane von einer Öse virulenter Pestkultur und drei intraperitoneale Injektionen von $1/4$, $1/2$ und 1 Öse, ohne daß er in seinem Befinden eine Störung zeigte.

Versuche von Yersin und Carré[26]). Yersin und Carré versuchten Ratten mit Hilfe von abgeschwächten Pestkulturen zu immunisieren. Sie benützten zu diesem Zweck eine Pestkultur, die so wenig virulent war, daß nur ein Fünftel der mit ihr geimpften Tiere an den Folgen der Impfung starb. In einer Versuchsreihe wurden 25 Ratten behufs Immunisierung mit dieser Kultur vorbehandelt. Drei davon gingen zugrunde. Als 21 Tage nach der Impfung die überlebenden 22 Ratten mit virulenten Pestbakterien infiziert wurden, starb nur ein Tier an Pest. Bei einer zweiten Versuchsreihe wurden 20 Ratten geimpft, von denen 10 der Impfung erlagen. Die überlebenden 10 erwiesen sich bei der nach einiger Zeit ausgeführten Prüfung mit virulenter Kultur als immun. Bei jeder dieser Versuchsreihen wurden je zwei Kontrolltiere infiziert.

Angaben über die Größe der Impfdosis, über die Stärke der Virulenz der Prüfungskultur und über den Infektionsmodus fehlen. Dadurch, daß Yersin und Carré diese schwach virulente Pestkultur dauernd auf künstlichen Nährböden 40—50 Tage wachsen ließen, wurde die Virulenz derselben noch weiter herabgesetzt. Von 30 mit dieser Kultur geimpften Ratten ging keine ein. 14 von den so vorbehandelten Tieren wurden einige Zeit darauf mit virulentem Pestmaterial infiziert. Es starben fünf an Pest.

Mit einer anderen abgeschwächten Kultur, die für Ratten noch eine solche Virulenz besaß, daß 40—50 der damit geimpften Tiere (wieviel wird nicht angegeben) zugrunde gingen, wurden sieben Affen vorbehandelt. Die Impfverluste waren gleich null. Nur zwei von diesen Tieren wurden später auf die erlangte Immunität geprüft. Die Einverleibung virulenter Pestbazillen hatte bei diesen die Entwicklung lokalisierter Bubonen zur Folge, die sich wieder zurückbildeten. Die Tiere blieben am Leben. Der Kontrollaffe starb jedoch ebenfalls nicht an Pest.

Yersin impfte auch einen Menschen (sich selbst?) mit der am meisten abgeschwächten Kultur. Über die Größe der Impfdosis wird nichts berichtet. Es stellten sich nur ganz leichte Krankheitssymptome ein. Von 10 Ratten, die zu gleicher Zeit mit der gleichen Kultur geimpft wurden, ging keine zugrunde.

Versuche von Albrecht und Ghon[27]. A. und G. immunisierten 8 Meerschweinchen und 27 Ratten durch mehrmalige Injektionen lebender, schwach virulenter Pestbazillen. Meerschweinchen bekamen bei subkutaner Impfung zunächst zwei Ösen und nach Verlauf von ca. drei Wochen vier Ösen lebender, schwach virulenter Pestbazillen injiziert. Derartig vorbehandelte Tiere reagierten auf eine nach einiger Zeit ausgeführte kutane Infektion mit vollvirulentem Material überhaupt nicht mehr, die subkutane Impfung mit einer Öse vollvirulenter Agarkultur wurde ohne besondere Reaktion vertragen. Es gelingt somit auf diese Weise, d. h. mit schwachvirulenten lebenden Pestbazillen, auch das für Pest hochempfängliche Meerschweinchen aktiv zu immunisieren. Die Immunität erhält sich bei diesen Tieren mehr als sechs Monate.

Bei intraperitonealer Vorbehandlung kam eine Öse 48 stündiger, schwach virulenter Kultur zur Verimpfung. Ein derartig vorbehandeltes (490 g schweres) Tier zeigte sich auch gegen die im Vergleich zur subkutanen zweifellos schwerere, intraperitoneale Infektion mit vollvirulenten Pestbazillen in einer Menge, die das Vielhundertfache der Dosis letalis minima betrug, widerstandsfähig.

Soll die Immunisierung befriedigende Resultate liefern, so muß in vorsichtiger Weise vorgegangen werden, namentlich ist die Größe und individuelle Disposition der Versuchstiere zu berücksichtigen. So gingen zwei in gleicher Weise, wie das eben angeführte Tier, vorbehandelte Meerschweinchen, die aber nur 202 bzw. 180 g schwer waren, nach intraperitonealer Infektion mit den gleichen Mengen vollvirulenten Pestmaterials zu Grunde, wenn auch in auffallend verzögerter Weise. Auch erhält man verschiedene Resultate, je nach der Prüfungsweise des erlangten Impfschutzes.

Bei grauen Ratten war eine aktive Immunisierung sowohl durch subkutane, kutane, als auch intraperitoneale ein- oder mehrmalige Einverleibung lebender, schwach virulenter (in einigen Versuchen auch vollvirulenter) Pestkulturen in verschieden großen untertödlichen Dosen zu erzielen. Auch bei diesen Tieren ließ sich feststellen, daß die erlangte

Immunität über viele Monate andauert. Sie hatten durch die Vorbehandlung nicht nur einen gewissen Grad von Impfschutz gegen die subkutane oder intraperitoneale Einverleibung vollvirulenter Pestbazillen in Mengen, welche die Dosis letalis minima vielfach überstiegen, erlangt, sondern auch einen gewissen Grad von Giftfestigkeit — (sie vertrugen anstandslos die intraperitoneale Einverleibung größerer Mengen eines hochwirksamen älteren Bouillonfiltrates) — die ebenfalls durch längere Zeit anhielt.

Von den 27 vorbehandelten Ratten blieben bei der Prüfung mit virulenten Pesterregern 21 am Leben.

Ein Affe (Makake) vertrug auffallend große Mengen vollvirulenten Pestmaterials anstandslos und erlangte dadurch einen recht hohen Grad von Immunität.

Versuche von Kolle und Otto[28]. Nach Ansicht der Verfasser stellen abgeschwächte Pestkulturen bei weitem das wirksamste und sicherste Mittel dar, um Tiere gegen die virulente Pestinfektion zu schützen.

Sie arbeiteten einerseits mit einer Anzahl verschiedener abgeschwächter Pestkulturen, über deren immunisierende Eigenschaften sie bei Anstellung ihrer Versuche noch nicht orientiert waren (alte Laboratoriumskulturen, die nahezu jede Pathogenität für Meerschweinchen verloren hatten), andererseits mit einer Kultur Ma V, die durch Züchtung bei 41—43° so stark abgeschwächt war, daß selbst ein bis zwei Agarkulturen derselben Meerschweinchen bei intraperitonealer und subkutaner Infektion nicht mehr tötete. Ratten vertrugen $^1/_2$ Agarkultur, Mäuse zwei bis drei Ösen derselben subkutan.

Bei den ersteren Versuchen mit verschiedenen Kulturen wurde die Impfung subkutan bzw. durch Verreiben auf der rasierten Bauchhaut ausgeführt, meist einmalig, in einer Versuchsreihe zweimalig. Die Impfdosis schwankte zwischen $^1/_{10}$ Öse und einer Öse ($^1/_2$ Kultur nur bei wiederholter Impfung) lebender, 24stündiger Agarkultur. Als Versuchstiere dienten Meerschweinchen und Ratten. Die Prüfung auf erlangte Immunität erfolgte bei den Meerschweinchen durch Verreibung von je fünf Ösen einer Pestbazillenaufschwemmung (eine 24stündige Agarkultur virulenter Pest in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung) auf der Bauchhaut. Die Impfverluste betrugen bei den Meerschweinchen 27 %, bei den Ratten 16,6 %. Als immunisiert erwiesen sich von den Meerschweinchen 70 %, von den Ratten 29,1 %. Die Kultur MaV vermochte selbst in Dosen von zwei bis drei lebenden Agarkulturen Meerschweinchen von 250 g nicht mehr zu töten. Zu Immunisierungszwecken wurden Meerschweinchen bzw. Ratten subkutan oder intraperitonal Dosen von einer Öse bis drei Kulturen (24stündig) einmalig einverleibt. Ein Teil der Tiere erhielt neben der Kultur gleichzeitig Serum (1 ccm flüssiges Pariser Pestserum). Bei der Mehrzahl der Tiere betrug die Impfdosis $^1/_2$ Kultur einer frischen 24stündigen Agarkultur, welche die Miminimaldosis zur Erlangung sicherer Immunität darstellt. Die Impfverluste beliefen sich bei Benutzung dieser Kultur für Meerschweinchen auf 0 %. Bei der Prüfung, welche ein bis vier Monate nach der Immunisierung und in derselben Weise wie oben geschildert ausgeführt wurde, blieben 83,3 % der Meerschweinchen am Leben. Die besten Resultate wurden bei gleichzeitiger Einverleibung von Serum erzielt.

Versuche an Affen (Meerkatzen) zeigten, daß diese Affenart eine sehr hohe Empfänglichkeit gegenüber der Infektion mit Pestbakterien

(selbst abgeschwächten) besitzt. Immunisierungsversuche verliefen negativ. Ein vorbehandelter Affe erkrankte bei der Prüfung an Pestseptikämie.

Versuche von Strong am Menschen[29]). Strong arbeitete mit einem abgeschwächten Peststamm, der drei Jahre lang ununterbrochen auf künstlichen Nährböden fortgezüchtet worden war. Die Virulenz dieser Kultur war durch längere Züchtung in Alkoholnährbouillon bei 41—43° C nach Hetsch (Kolle, Hetsch, Otto, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XLVIII, 1904, S. 368, mehrmalige Züchtung von ca. je drei Wochen Dauer in Nährbouillon, welche 0,5—5% Alkohol enthält) noch weiter herabgesetzt.

Sie wurde zunächst auf ihre Unschädlichkeit an 12 Meerschweinchen und 30 Affen geprüft. Jedes der Tiere erhielt je eine ganze, lebende Agarkultur eingespritzt. Trotzdem ging keines an den Folgen der Impfung zugrunde. Ein Affe ging ein, jedoch nicht an Pest, sondern an einer Staphylokokken-Streptokokken-Sepsis.

Strong führte seine Versuchsreihe an zum Tode verurteilten Verbrechern aus. Die Einspritzung des in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten Impfmaterials erfolgte subkutan in der Gegend des Deltamuskels. Die Menge des Impfstoffes wurde bei jeder neuen Versuchsperson vorsichtig gesteigert. Während der erste Gefangene $^1/_{100}$ Öse lebender Pestkultur ohne irgend welchen nachweisbaren Effekt eingespritzt erhalten hatte, konnte zum Schlusse eine ganze Agarkultur dieser abgeschwächten, lebenden Pesterreger zur Verimpfung gebracht werden, ohne daß bei den Versuchspersonen während einer einmonatlichen Beobachtungszeit irgendwelche Schädigung nachzuweisen gewesen wäre. Da sich durch gleichzeitig angestellte Tierversuche ergeben hatte, daß durch Verimpfung von einer Agarkultur sich eine lange dauernde Immunität erzielen lasse, so wurde davon abgesehen, noch größere Dosen in Anwendung zu bringen.

Die Injektion von einer Agarkultur der lebenden Pestbakterien hatte keineswegs besonders schwere Reaktionen bei den Geimpften zur Folge. Dieselben bestanden in Steigerung der Temperatur einige Stunden nach der Impfung bis zu 38° und 39°, selten bis zu 40°, welche am 3. Tage in der Regel wieder zur Norm zurückgekehrt war, in einer nicht unerheblichen Leukocytose bei einigen Fällen, in Schwellung, Infiltration und Schmerzhaftigkeit in der Gegend der Impfstelle. Nach 2—3 Tagen waren diese örtlichen Erscheinungen wieder zurückgegangen. Abszedierung wurde niemals beobachtet.

Strong hat 42 Personen mit diesen großen Dosen des lebenden, abgeschwächten Pestbazillus geimpft und erachtet dadurch die vollkommene Ungefährlichkeit des Impfstoffes für den Menschen als erwiesen. In 29 Fällen wurde eine Untersuchung des Blutserums der so Vorbehandelten auf spezifische Eigenschaften ausgeführt. Es zeigte nicht nur spezifische Agglutinationswirkung auf frische, virulente Pestbakterien, sondern entfaltete auch ausgesprochene Schutzwirkung im Tierversuch.

Die zu Schutzimpfungen am Menschen in Verwendung gelangenden abgeschwächten Pestkulturen müssen nach allen Richtungen in bezug auf ihre immunisatorische Kraft geprüft sein. Als Indikator für die Harmlosigkeit einer Kultur kann das Meerschweinchen dienen. „Stämme des Pestbazillus, welche Meerschweinchen in der Dosis von zwei Agarkulturen nicht mehr zu töten vermögen, dürfen als hinreichend abgeschwächt zur Verwendung auch beim Menschen zugelassen werden.“

Mit derselben Kultur führte STRONG auch Versuche an Affen und Meerschweinchen aus. Affen und Meerschweinchen, die er mit dieser Kultur geimpft hatte, fand er später im Besitz einer hohen Immunität gegenüber der Einverleibung großer Mengen lebender Pestbakterien.

Versuche zur Verwendung von pestähnlichen Bakterien als Antigen gegenüber Pestinfektion[30]. Um zu prüfen, inwieweit die lebenden pestähnlichen Bakterien imstande sind, Tieren eine aktive Immunität gegen virulente Pestbakterien zu verleihen, behandelten KOLLE und OTTO Meerschweinchen und Ratten mit Bakterien aus der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie, welche aus verschiedenen Tieren (Huhn, Taube, Gans, Kaninchen) gezüchtet worden waren, und mit Hühnercholera vor, und zwar einen Teil der Tiere zunächst mit abgetöteten (eine Stunde bei 65° C.) und dann mit lebenden Kulturen, den Rest sofort mit geringeren Mengen lebender Kultur. Die Impfung wurde kutan auf die rasierte Bauchhaut oder subkutan ausgeführt.

Die Impfverluste betrugen bei den Meerschweinchen 23,5%, bei den Ratten 0%. Die auf einmal verabreichte Dosis schwankte bei Verwendung von lebenden Bakterien zwischen $^1/_{10}$ Öse und $^1/_2$ Kultur, von abgetöteten zwischen ein und zwei Kulturen. 4—12 Wochen nach der Einverleibung der letzten Immunisierungsdosis wurden die Tiere auf die erlangte Immunität geprüft. Zu diesem Zwecke wurden den Meerschweinchen auf die enthaarte Bauchhaut je fünf Ösen einer Pestbazillenaufschwemmung (hergestellt durch gleichmäßige und intensive Verreibung einer frischen 24stündigen virulenten Pestagarkultur in 5 ccm steriler, physiologischer Kochsalzlösung) eingerieben. Bei den Ratten geschah die Infektion durch Schwanzwurzelstich mit einer durch Eintauchen in die eben beschriebene, konzentrierte Pestbazillenaufschwemmung infizierten Hohlnadel.

25 in dieser Weise infizierte Meerschweinchenkontrollen und 10 Rattenkontrollen gingen sämtlich ein.

Von den vorbehandelten Meerschweinchen überstanden 9,1%, von den vorbehandelten Ratten 6,3% die Infektion.

Versuche der willkürlichen Virulenzabschwächung von Pestkulturen[31]. Nach HETSCH werden die Pestkulturen in 50 ccm haltenden Bouillonkolben, denen entsprechende Alkoholmengen zugesetzt sind, bei 30° C gezüchtet. Nach ca. dreiwöchentlichem Wachstum wird zur Prüfung auf Reinheit zunächst eine Züchtung des Stammes auf Agar vorgenommen, und erst mit der Agarkultur wieder ein neues Alkoholbouillonkölbchen beimpft, welches wiederum für drei Wochen bei 30° gehalten wird. Dasselbe Verfahren ist darauf eventuell noch ein- oder zweimal zu wiederholen, wobei der Alkoholgehalt jedesmal höher gewählt wird.

HETSCH arbeitete mit mehreren anfänglich hoch virulenten Stämmen, die erst verhältnismäßig kurze Zeit im Laboratorium fortgezüchtet worden waren. Einer dieser Stämme wurde zunächst in 0,1%iger, dann weiter in 1%iger und das dritte und vierte Mal in 10%iger Alkoholbouillon gezüchtet, ein zweiter zuerst in 0,1%iger, dann dreimal in 5%iger, ein dritter zuerst in 0,1%iger dann in 2 und 5%iger, ein vierter und fünfter zunächst in 0,1%iger, dann in 2%iger und zweimal in 5%iger, ein sechster dreimal in 5%iger und ein siebenter zweimal in 5%iger.

Nichtabgeschwächt töteten alle diese Stämme Meerschweinchen, Ratten und Mäuse bei subkutaner Impfung in einer Dosis von $^1/_{100}$ Öse in wenigen Tagen.

Durch die Züchtung in Alkoholbouillon gelang es, die Virulenz einiger dieser Stämme in relativ kurzer Zeit, die zu spontaner Abschwächung nicht genügt hätte, derart herabzusetzen, daß dieselben selbst in einer Dosis von 1/2 Agarkultur Meerschweinchen nicht mehr zu töten vermochten. Bei den übrigen Kulturen war die Abschwächung jedoch weniger deutlich. Anscheinend verhalten sich somit die einzelnen Stämme in dieser Beziehung verschieden, „der eine ist gegen virulenzschädigende Einflüsse widerstandsfähiger als der andere". Auch erfolgte die Virulenzabschwächung nicht gleichmäßig für alle Tierarten. Bei einigen Stämmen war sie für Ratten stärker, bei anderen für Meerschweinchen.

III. Verwendung von Nukleoproteinen, Endotoxinen und Bouillonfiltraten als Antigen.

Impfstoff nach Lustig und Galeotti[32]). Der Pestbazillus wird in großen Glasschalen (Durchmesser 25 cm), welche eine 5—6 mm hohe Agarschicht enthalten, bei 37° gezüchtet. Nach 24 stündiger Bebrütung werden die auf der Oberfläche des Agars zur Entwicklung gelangten Kolonien abgekratzt und die so gewonnene Kulturmasse in eine 0,75 %ige Lösung von Kali causticum gebracht. Diese Aufschwemmung hält man 12—24 Stunden bei 10—12°. Die Flüssigkeit wird in dieser Zeit schleimig und opaleszent, am Boden bildet sich ein geringes Sediment. Man filtriert dieselbe darauf mit Hilfe einer Luftpumpe durch eine dicke Papierschicht und versetzt sie nach der Filtration mit Wasser. Fügt man zu dieser Flüssigkeit Essigsäure hinzu, so erhält man einen flockigen, ganz weißen Niederschlag, der die aktive Substanz enthält. Dieser Niederschlag wird abfiltriert, wiederholt gewaschen und endlich in einer schwachen Lösung von Natriumcarbonat aufgelöst.

Modifikation des Verfahrens, die einen weniger toxischen Impfstoff liefern soll[33]). Ein wenig toxischer Impfstoff, der zugleich in hohem Grade präventive Eigenschaften besitzt, ist zu erzielen, wenn man Pestbazillen während drei Tagen bei 37° C in Agar züchtet und statt 0,75 %iger zur Auflösung 1 %ige Kalilauge verwendet. Darauf wird, wie oben mit Essigsäure oder noch besser mit Chlorwasserstoffsäure gefällt und der so gewonnene Niederschlag im luftleeren Raum bei Gegenwart von H_2SO_4 getrocknet. Zum Gebrauch ist die getrocknete Masse in schwach alkalischen Lösungen bei 37° C zu lösen und die Lösung durch Chamberlandfilter zu filtrieren.

Immunisierungsversuche wurden mit dem Impfstoff (nach der ersten Angabe) an 115 Ratten, Mäusen und 30 Kaninchen ausgeführt. Die Injektionen erfolgten subkutan oder intraperitoneal einmalig, oder zwei- bis dreimal jeden zweiten Tag wiederholt, wobei der Impfstoff in destilliertem, sterilisiertem Wasser aufgelöst war. Ratten (200 g) und Mäuse erhielten 0,36 mg (Impfstoff in Substanz) bei einmaliger Injektion, oder 0,45 bis 0,56 mg in zwei innerhalb dreier Tage ausgeführten Injektionen, Kaninchen (ca. 800 g Körpergewicht) 11 mg auf einmal oder 18 mg bei zweimaliger Injektion mit einer Zwischenzeit von ungefähr 48 Stunden.

Die mit diesen Dosen geimpften Tiere zeigten keine irgendwie auffallenden Krankheitserscheinungen, keine Reaktion an der Impfstelle, keine Anschwellung der Lymphdrüsen. Die Temperatur ließ in den ersten 24 Stunden nach der Injektion eine geringe Erniedrigung erkennen, um darauf zur Norm zurückzukehren. Bei mikroskopischer Untersuchung des Blutes war leichte Leukocytose zu finden, sonst keine Veränderung.

Freßlust nicht vermindert. Tiere nahmen gewöhnlich an Körpergewicht zu. Niemals wurde Abmagerung beobachtet.

Hatte man die Konzentration der injizierten, aktiven Substanz ziemlich stark gewählt, so stellte sich an der Injektionsstelle eine subkutane Verhärtung und leichtes diffuses Ödem ein, welches einige Tage bestehen blieb.

Derartig vorbehandelte Tiere widerstanden schon 48 Stunden nach der Injektion des Impfstoffes einer intraperitonealen oder subkutanen Infektion mit „einer beträchtlichen Quantität in sterilisiertem Wasser aufgelöster Kultur von fixer Virulenz", welche gleich schwere Kontrolltiere bei intraperitonealer Impfung schon nach 24 Stunden, bei subkutaner einige Tage später zugrunde gehen ließ. Die vorbehandelten Tiere vertrugen die Infektion ohne irgend eine von den charakteristischen Krankheitserscheinungen zu zeigen. (Freßlust nicht vermindert, keine Drüsenschwellungen, keine Verminderung des Körpergewichts.) Die durch die Vorbehandlung erlangte Immunität war mindestens 4 Wochen nach der letzten Schutzimpfung noch nachweisbar.

Nach ihren Immunisierungsversuchen glauben die Autoren versichern zu können, „daß sich aus den Kulturen des Pestbazillus eine Substanz mit den Eigenschaften der Nukleoproteide erhalten läßt, die für Tiere in bedeutendem Grade giftig sein kann, welche aber, wenn sie den für den spezifischen Pestbazillus empfänglichen Tieren subkutan oder unter das Bauchfell in einer nicht tödlichen Dosis injiziert wird, nicht nur unschädlich ist, sondern dieselben auch gegen subkutane oder interperitoneale Infektionen mit Kulturen von für die gegebene Tierspezies fixen Virulenz unempfindlich macht, während Tiere derselben Art, welche gleichzeitig und in gleicher Weise einer Infektion mit gleich virulentem Material ausgesetzt werden, regelmäßig in kürzester Zeit zugrunde gehen."

Tiere, welche die Autoren mit der oben beschriebenen Modifikation ihres Impfstoffes vorbehandelt hatten, und zwar entweder einmal mit nicht tödlicher Dosis oder zwei- bis dreimal mit einer „tödlichen Minimaldosis" alle 2 Tage, widerstanden noch nach mehr als 5 Wochen jeder Infektionsform mit Kulturen von stärkster Virulenz.

Dieser modifizierte Impfstoff erwies sich auch für den Menschen als unschädlich. Für Injektionen wurde er in sterilem, alkalisiertem Wasser aufgelöst, die Lösung durch Chamberlandfilter filtriert, und das Filtrat durch bakteriologische Untersuchung auf Sterilität geprüft. 5 mg aktiver Substanz in 1 ccm schwach alkalisierten Wassers gelöst, verursachten bei subkutaner Injektion für die ersten 48 Stunden leichtes Unwohlsein und Mattigkeit, sowie Brennen und leichtes Ödem an der Impfstelle. Die Körpertemperatur war für die ersten 6—8 Stunden nach der Injektion subnormal, für weitere 12 Stunden subfebril. Im Urin fanden sich weder Eiweiß, noch Zucker, noch Gallenbestandteile. Die Autoren impften sich selbst und dann noch weitere vier Personen verschiedenen Alters und verschiedener Konstitution, ohne daß bei irgend einem ernstliche Beschwerden eingetreten wären.

Immunisierung von Affen und Pferden mit dem Lustig-Galeottischen Impfstoff. Galeotti und Malenchini[34]) versuchten kleine graue Affen mit dem Lustig-Galeottischen Impfstoff zu immunisieren.

Sie behandelten im ganzen 10 Affen vor. Die Injektion des Impfstoffes wurde unter die Haut des Oberschenkels oder am Arm ausgeführt.

Sechs Affen erhielten je drei Injektionen in 2–3tägigen Intervallen und zwar einer im ganzen 1,41, ein anderer 1,47, zwei 1,705 und zwei 1,75 cg aktiver Substanz.

Zwei Affen wurden zweimal geimpft. Die zweite Impfung erfolgte 2 Tage nach der ersten. Beide erhielten im ganzen 1,41 cg aktiver Substanz.

Zwei Affen wurden nur einmal vacciniert und erhielten 1,88 cg aktiver Substanz.

Die beiden letzteren Affen, die eine sehr erhebliche Dosis des Impfstoffes erhalten hatten, erkrankten. Einer erholte sich langsam wieder, der andere starb in kurzer Zeit. Bei den übrigen Tieren hatten die Injektionen jedoch im allgemeinen nur sehr leichte Reaktionserscheinungen allgemeiner und lokaler Natur (Ödem und Infiltration der Gegend der Impfstelle, Schwellung der benachbarten Drüsen) zur Folge.

Die Prüfung auf die erlangte Immunität erfolgte durch subkutane (sechsmal) oder intraperitoneale (dreimal) Infektion mit großen Mengen virulenter Pestkulturen, von welchen eine weit geringere Menge die Kontrolltiere (drei Affen) sicher tötete.

Die Prüfung wurde erst bewerkstelligt, wenn sich die Tiere von den Folgen der Impfungen wieder vollständig erholt hatten und zwar in 3 Fällen 16 Tage, in 2 Fällen 18 Tage, in 3 Fällen 22 Tage und in einem Fall 24 Tage nach der letzten Impfung.

Alle neun Affen ertrugen die Prüfung gut, ohne auch nur leicht zu erkranken.

Behufs Serumgewinnung immunisierten die Autoren ein Pferd. Ein 350 kg schweres Pferd wurde zunächst zweimal subkutan mit 5 respektive 1 cg Impfstoff gespritzt, um nach einigen Tagen eine dritte und später eine vierte Einspritzung mit 16 respektive 22 cg zu erhalten. Mit jeder erneuten Injektion wurde die Reaktion schwächer. Eine um diese Zeit entnommene Serumprobe zeigte sich unwirksam. Es wurden daher noch zwei Injektionen mit 40 cg Impfstoff ausgeführt, so daß im ganzen 97 cg aktiver Substanz eingespritzt worden waren. Nunmehr wurde ein Serum gewonnen, welches „ganz ausgezeichnete Schutz- und Heileigenschaften besaß“.

Kombination der Haffkine- und Lustigschen Methode nach Glücksmann. Glücksmann[35]) brachte folgende Kombination der Haffkineschen und Lustigschen Methode zu Versuchen an Tieren in Anwendung:

Es wurden nach der Haffkineschen Methode Bouillonkulturen hergestellt. Nach einmonatlicher Bebrütung wurden dieselben sterilisiert, mit Ammoniumsulfat gefällt, der Rückstand auf einem Filter ausgewaschen und in 1 %iger Kalilauge aufgelöst. Weiter wurde mit 1 %iger Essigsäure und einigen Tropfen 5 %iger Salzsäure die aktive Substanz aus dieser Lösung gefällt, das Sediment abfiltriert, bis zur neutralen Reaktion des abfließenden Wassers ausgewaschen, im Vakuum getrocknet und zum Schlusse pulverisiert. Das resultierende braune Pulver wurde für den Gebrauch in 1—2 %iger steriler Natr. carbonic. calcinat.-Lösung aufgelöst.

Immunisierung mit löslichen Endotoxinen nach Besredka[36]). Junge, 48stündige Pestagarkulturen werden mit physiologischer Kochsalzlösung (0,75 %) aufgeschwemmt, die Aufschwemmung während einer Stunde bei einer Temperatur von 60° gehalten und dann im Vakuum eingetrocknet.

Eine bestimmte Menge (1 g) der getrockneten Bazillenmasse versetzt man mit Kochsalz (0,3—0,45 g) und verreibt diese Mischung in einem Achatmörser, bis ein ganz feines Pulver resultiert, was ungefähr nach einer Stunde der Fall ist.

Unter ständiger Verreibung fügt man nun tropfenweise 1—2 ccm destillierten Wassers hinzu. Dann bringt man diese Emulsion in ein Reagenzröhrchen und fügt weiterhin so viel Wasser hinzu, daß die Konzentration des Kochsalzes in dieser Aufschwemmung dem Chlornatriumgehalt der physiologischen Kochsalzlösung entspricht. Man bemerkt dabei, daß keine homogene Emulsion entsteht, die Mikroben haben im Gegenteil das Bestreben sich abzusetzen. Man schüttelt die Aufschwemmung nun mehreremale gut durch und läßt sie 24 Stunden absetzen. Zum Schluß zentrifugiert man solange, bis die Flüssigkeit keine Bazillen mehr in Suspension enthält. Die Flüssigkeit stellt eine Lösung der Endotoxine dar.

Bei Aufbewahrung im Eisschrank und vor Licht geschützt, sind diese gelösten Pesttoxine sehr lange haltbar. Selbst nach Monaten findet man sie noch unverändert. Dagegen sind sie gegen Wärme sehr empfindlich. Während sie nicht erhitzt für Mäuse und Ratten erhebliche Giftigkeit bei subkutaner, noch mehr bei intraperitonaler Infektion zeigen, verlieren sie durch Erhitzung auf 100° ihre Giftigkeit vollständig, durch Erhitzung auf 70° wird dieselbe ganz erheblich abgeschwächt, während durch Erhitzung auf 65° die Abschwächung noch unvollständig ist.

Mit nicht erhitzen „Endotoxinen" soll es nach Besredka möglich sein, gegen Pestbazillen durch subkutane Einverleibung zu immunisieren, nicht dagegen soll die subkutane Vorbehandlung mit Endotoxinen (Mäusen wenigstens) Immunität gegen die Endotoxine selbst verleihen. Mäuse, die eine subkutane Injektion einer untertödlichen Dosis von „Endotoxin" erhalten hatten, starben, als ihnen acht Tage darauf die tödliche Dosis injiziert wurde, ebenso rasch wie die Kontrollen.

Trotzdem war es sehr leicht möglich, die „Endotoxine" zu neutralisieren, durch ein Serum, welches von einem mit Pestagarkulturen vorbehandeltem Pferde stammte.

Mit auf 70° erhitzten „Endotoxinen" gelang es nicht mehr, irgend eine Art von Immunität zu erzeugen.

Immunisierung mit Pestgiften nach Markl. Da Markl[37]) gezeigt zu haben glaubte, daß sich in keimfreien Filtraten von Pestbouillonkulturen giftige Substanzen finden, gelangte er in der Voraussetzung, daß die in vitro gebildeten Gifte auch im infizierten Organismus von den Pestbazillen erzeugt werden, zu dem Schlusse, daß ein wirksames Heilserum gegen die Pest nicht nur antiinfektiös, sondern auch antitoxisch wirken müsse.

Um möglichst wirksame Filtrate zu erhalten, ist folgendes zu beachten. Züchtung der Pestbazillen in für Lackmus neutraler Bouillon, der eine geringe Menge normalen Pferdeserums zugesetzt ist, begünstigt die Toxinbildung, doch findet dieselbe auch in gewöhnlicher neutraler Bouillon statt. Es ist ferner darauf zu achten, daß die Bouillon in dünner Schicht mit möglichst großer Oberfläche mit der atmosphärischen Luft in Berührung steht. Der Sauerstoffzutritt ist namentlich dann für die Giftbildung unerläßlich, wenn dieselbe bei Brüttemperatur vor sich gehen soll. Es empfiehlt sich jedoch, die Giftbildung durch Züchtung der Pestbazillen bei Zimmertemperatur vor sich gehen zu lassen, da die Pesttoxine gegen hohe Temperaturen äußerst empfindlich sind: Die Siede-

hitze zerstört sie sofort; durch Erhitzen auf 70° verlieren sie für Mäuse ihre Giftigkeit, für Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen wird dieselbe nur abgeschwächt. Selbst durch längeres Verweilen bei Körpertemperatur werden sie geschädigt. Weiterhin hängt die Giftbildung von der in Anwendung gebrachten Kultur ab. Markl arbeitete mit aus dem Tierkörper frisch isolierten Kulturen, die er stets nur bei Zimmertemperatur, sei es auf Gelatine oder Agar, fortzüchtete.

Durch langdauernde Züchtung auf künstlichen Nährböden, namentlich bei Brüttemperatur, verliert der Pestbazillus seine Fähigkeit Gift zu bilden, während Virulenz und Infektiosität erhalten bleiben kann. Durch Tierpassagen läßt sich die Giftbildungsfähigkeit wenigstens teilweise wieder herstellen. Da schon die jüngsten 24stündigen, in diesem Fall bei Bruttemperatur zu haltenden Bouillonkulturen Giftsubstanzen enthalten, glaubt sich Markl zu der Annahme berechtigt, daß es sich dabei um Stoffwechselprodukte der Pestbazillen handelt. Je älter die Bouillonkulturen werden, desto mehr Toxin enthalten sie. Das Maximum der Giftigkeit ist innerhalb zwei Monaten erreicht. Bei dem Gift der älteren Kulturen dürfte es sich nach Markl um ein Gemisch von Bakterienstoffwechselprodukten und giftigen ausgelaugten Bakterienleibessubstanzen handeln. Die Pesttoxine sind nicht sehr lange haltbar. Die Giftigkeit der stärksten Filtrate geht schon nach einigen Tagen etwas zurück. Schwächer wirksame Filtrate halten sich wochenlang unverändert.

Durch vorsichtige Einverleibung steigender Dosen von Pestfiltraten konnte nun Markl Mäusen und Ratten Giftfestigkeit verleihen, so daß sie eine vielfache Menge der sonst tödlichen Dosis Toxins reaktionslos vertrugen. Als Beispiel möge hier der Verlauf der Immunisierung bei Mäusen wiedergegeben sein.

Um Verluste an Versuchstieren zu vermeiden, ist es zweckmäßig, mit einer subminimalen tödlichen Dosis zu beginnen. Die Injektionen erfolgen intraperitoneal und werden unter allmählicher Steigerung der Impfdosis alle 8—11 Tage wiederholt. Bei der zweiten Injektion wählt man zweckmäßig die 5—10fache Menge der ersten, bei der dritten, vierten usw. Injektion, die zweifache, dreifache usw. Menge des bei der zweiten Injektion zur Verwendung gelangten Bouillonkulturfiltrates. Auf diese Weise gelingt es, Mäuse gegen eine 100fache tödliche Dosis und noch darüber giftfest zu machen, so daß sie diese Menge reaktionslos vertragen.

Die Dauer der erlangten Giftfestigkeit ist je nach dem Grad derselben verschieden. Ein- bis zweimal injizierte Mäuse, haben sie schon nach 19 Tagen wieder verloren, hochgiftfeste Tiere lassen dagegen selbst nach sechs Wochen und darüber noch keine Abnahme ihrer Immunität erkennen.

Mäuse, welche nur eine intraperitoneale Injektion einer subminimalen tödlichen Dosis von Pesttoxin erhalten haben, zeigen gegen eine subkutane Infektion mit virulenten lebenden Pestbazillen keine erhöhte Widerstandsfähigkeit. Mehrmals vorbehandelte Tiere dagegen, die dadurch schon einen höheren Grad von Giftfestigkeit erlangt haben, zeigen auch eine gewisse Immunität gegen die subkutane Infektion mit lebenden, virulenten Keimen. Sie gehen auch zu Grunde, aber bedeutend später als die Kontrolltiere.

Ziegen dürften sich unschwer gegen die Toxine immunisieren lassen. Zwei Ziegenböcke, die Markl zu Immunisierungszwecken benutzte, vertrugen die Injektionen, die zunächst subkutan, dann intraperitoneal

ausgeführt wurden, ohne wesentliche Gesundheitsstörungen außer vorübergehender Temperaturerhöhung und verminderter Freßlust in den ersten Stunden nach der Einspritzung. Trotzdem empfiehlt sich äußerste Vorsicht bei der Vorbehandlung, namentlich dürfen sich die Injektionen nicht zu rasch folgen. Beide Ziegenböcke gingen zugrunde. Der eine, als Markl eine neue Einspritzung statt wie anfangs erst 14 Tage, schon 7 Tage nach der vorhergehenden ausführte, bei dem anderen wurde zu lange ($1^1/_2$ Monate) nach der letzten Injektion eine neue bewerkstelligt, so daß die Giftfestigkeit schon wieder zurückgegangen war und das Tier eine weit kleinere Dosis als die zuletzt vor $1^1/_2$ Monaten gegebene, nicht mehr vertrug.

Das Blutserum solcher giftfest gemachter Tiere (Ziegen und Kaninchen) wirkt antitoxisch gegen Pestgift und entfaltet selbst Schutzkraft gegen eine Infektion mit lebenden Bazillen.

Einer weiteren ausgewachsenen Ziege suchte Markl sowohl eine antitoxische wie antiinfektiöse Immunität zu verleihen. Das Tier erhielt zunächst in achttägen Intervallen subkutane Einspritzungen von Toxinen und zwar innerhalb 4 Monaten 4980 Toxineinheiten (T. E. = einfach tödliche Minimaldosis für Mäuse) und dann gleichzeitig von Toxinen und Aufschwemmungen von bei 65° abgetöteten Agarkulturen in steigender Menge.

Die Toxininjektionen wurden gut vertragen. Es stellte sich nur für 1—2 Tage Temperatursteigerung auf 39,4 bis 40° C und verminderte Freßlust ein. Die Einspritzungen mit Kulturmasse hatten dagegen Infiltrate an den Impfstellen, Fieber über 40° und während 3—4 Tagen Verminderung der Freßlust, sowie deutliche Abmagerung zur Folge. Die Ziege stand im ganzen 10 Monate in Behandlung und ging dann durch einen unglücklichen Zufall zugrunde.

Markl kommt zu dem Schlusse, daß man durch die kombinierte Immunisierung mit Toxinen und abgetöteten Bazillenleibern sowohl gegen Gifte als gegen die Infektion Immunität erzielen könne.

Immunisierung mit Pestgift. Nach den Versuchen Albrechts und Ghons[38]) ist es möglich, Ratten durch mehrmals wiederholte subkutane oder intraperitonale Einverleibung steigender Mengen wirksamer Bouillonfiltrate giftfest zu machen. Die zur Verwendung gelangte Anfangsdosis war je nach dem Infektionsmodus und der Wirksamkeit der Bouillonfiltrate verschieden groß. Die einmal erlangte Giftfestigkeit konnte einige Zeit, jedenfalls während mehrerer Wochen, nachweisbar bleiben. Durch die Vorbehandlung mit Bouillonfiltraten hatten die Tiere manchmal auch einen geringen Grad von Immunität gegen eine Infektion mit lebenden, vollvirulenten Pestbazillen erlangt.

Immunisierung mit Pestgift. Kossel und Overbeck[39]) ist es gelungen, Ratten durch Injektion von Bouillonfiltraten, die auf 50—60° erhitzt waren, gegen die Infektion mit Pestbazillen zu immunisieren. Am wirksamsten seien die Kulturfiltrate, wenn man der Nährbouillon Serum zusetze.

Immunisierungsversuche mit Pestgiften (Endotoxinen) von Kolle[37a]). Es wurden vier Pferde mit auf Keimfreiheit geprüften Filtraten sechs- bis achttägiger Pestbouillonkulturen in Mengen von 60 bis 200 ccm intravenös vorbehandelt. (Die Bouillon enthielt über dem Lackmusneutralpunkt noch 0,5 g krystallisierter Soda in einem Liter. Als Kulturgefäße dienten Kölbchen, welche die Bouillon in möglichst flacher Schicht enthielten. Ein Teil der Kulturen wurde bei 37° C, ein anderer

bei 30° C, eine dritte Serie bei 27°, eine vierte im Eisschrank bei 6 bis 10° C gezüchtet. Welche Temperatur bei der zur Immunisierung dienenden Bouillon gewählt worden war, ist nicht angegeben.) Ziemlich heftige Reaktionen nach Injektion der größeren Dosen. Trotz monatelanger Vorbehandlung zeigte das Serum der Tiere kaum eine Spur von agglutinierender Wirkung und keine Schutz- oder Heilwirkung.

Weitere vier Pferde wurden mit 8—10 Wochen alten Bouillonkulturen intravenös vorbehandelt. Die Bouillonkulturen waren bei diesen Versuchen nicht filtriert, sondern die Bakterien wurden durch Phenolzusatz ($^1/_4$ %) oder durch Überschichtung der Bouillon mit Toluol in 24—48 Stunden abgetötet und durch Zentrifugieren aus der Bouillon entfernt. Die intravenösen Injektionen wurden nach Prüfung der Injektionsflüssigkeit auf Keimfreiheit, in steigenden Dosen (10—200 ccm) und in Intervallen von 8—10 Tagen ausgeführt. Sie riefen sehr rasch einsetzende Vergiftungserscheinungen, namentlich Herzkollaps und starke venöse Stauung hervor. Zwei von den vier Pferden gingen während der Immunisierung zugrunde.

Nach mehrmonatlicher Vorbehandlung zeigte das Serum der überlebenden Tiere deutliche, jedoch nicht sehr starke Agglutionationswirkungen auf Pestbakterien und sehr geringe Schutzkraft, nur wenig stärker als normales Serum.

IV. Kombination von Antigenen mit Pestserum zwecks Schutzimpfung. (Simultan-Methode).

Impfstoff nach Shiga[40]). Dreitägige, bei 30° bebrütete Agarstrichkulturen werden abgeschabt und die Bakterienmasse im Mörser zerrieben. Auf je eine Öse Bazillen wird sodann 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugefügt. Diese Aufschwemmung wird 30′ auf 60° erhitzt, mit 0,5% Karbolsäure versetzt und 24 Stunden stehen gelassen.

Die Impfdosis dieses Vaccins ist folgende:

Erste Impfung

Vaccin } āā 0,6—1,0 ccm.
Immunserum }

Nach einigen Tagen, wenn die Reaktion verschwunden ist, folgt die zweite Impfung:

Vaccin 0,6—1,0 ccm.

Reaktionserscheinungen: Entweder nur leichter Druckschmerz eventuell Rötung an der Impfstelle ohne Störung des Allgemeinbefindens, höchstens geringe Temperatursteigerung (37,5° C) oder seltener leichte Anschwellung der Impfstelle, mäßiges Fieber (38° C), leichter Kopfschmerz mit Frösteln u. dgl.

Bei Pestepidemien ist es empfehlenswert, noch größere Dosen des Vaccins zu geben oder dreimal mit steigender Dosis zu impfen.

Aktive Immunisation nach Besredka[41]) Das Bakterienwachstum 48 stündiger Agarkulturen wird in sehr wenig physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Diese Bakterienemulsion wird dann im Wasserbad während einer Stunde auf 60° erhitzt, wodurch alle Mikroben sicher abgetötet werden. Die nunmehr schleimig gewordene Bakterienemulsion schichtet man in einem zylindrischen Gefäß, indem man sie entlang den Wänden desselben einfließen läßt, über ein in demselben enthaltenes gut agglutinierendes Pestserum. Es bilden sich zwei gut getrennte Schichten: oben die Bakterien, unten das Serum. An der Berührungsstelle mit dem

Serum ballen sich die Bakterien nach einiger Zeit zu Haufen zusammen, welche immer größer werden, und zum Schlusse zu Boden fallen. Nach Ablauf von 12 Stunden finden sich so alle Bakterien zu Boden gesunken, während die überstehende Flüssigkeit sich geklärt hat. Nachdem letztere abgehoben ist, wird das Bakteriensediment durch mehrmals wiederholtes Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung von den letzten Spuren des ihm anhaftenden Serums befreit.

Ein gut agglutinierendes Serum ist Hauptefordernis für Herstellung dieses Vaccins. Es ist einerseits darauf zu achten, daß die Bakterien gänzlich von Serum befreit werden, andererseits dürfen sie aber auch nicht zu lange mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt werden, in welcher sie einen Teil ihrer aktiven Virulenz verlieren würden. Die Auswaschungen müssen sich rasch folgen, so daß sämtliche Manipulationen am selben Tage beendet werden. Die Herstellung muß absolut aseptisch geschehen. Glaubt man für die Sterilität des in dieser Weise hergestellten Vaccins nicht garantieren zu können, so kann man es ohne Schaden nochmals auf 56° während $^1/_2$—1 Stunde erhitzen.

Das so bereitete Vaccin besitzt keinerlei toxische Eigenschaften. Mäuse vertragen bei subkutaner Einverleibung, das von zwei Agarröhrchen gewonnene Vaccin ohne sichtbare Krankheitserscheinungen zu zeigen. Sich selbst injizierte der Autor unter die Haut eine Dosis seines Vaccins, welche zwei Impfdosen der Haffkineschen „Lymphe“ entsprach. Einige Stunden nach der Injektion stellte sich an der Impfstelle Schmerz ein, welcher am folgenden Tage beinahe wieder verschwunden war, sonst war lokal weder Schwellung noch Rötung aufgetreten. Der Schlaf in der ersten Nacht nach der Injektion war unruhig, obwohl die Temperatur 37,7° nicht überschritten hatte.

Bei Tieren konnte mit diesem Vaccin eine aktive Immunität von langer Dauer ($5^1/_2$ Monat) erzielt werden, die bereits 48 Stunden nach der Impfung eintrat. Die Empfänglichkeit war bis zum Eintritt der Immunität nicht erhöht. Die geimpften Tiere erzeugten spezifische Antikörper.

Die Vaccins behalten, in zugeschmolzenen Röhrchen aufbewahrt, während langer Zeit ihre immunisatorischen Fähigkeiten.

Pestvaccin nach B. Gosio[42]). Fernbachflaschen werden mit einer dünnen Schicht schwach alkalischer, 2% Pepton enthaltender Nährbouillon beschickt, so daß gerade der Boden des Gefäßes bedeckt ist (180—200 ccm Bouillon). Die Fernbachflasche ist durch einen hinreichend langen Schlauch, der an beiden Enden mit je einem rechtwinklig gebogenen Glasröhrchen versehen ist, mit einem Reagenzgläschen verbunden. Das eine der rechtwinklig gebogenen Glasröhrchen durchsetzt den Wattepfropf der Fernbachflasche, das andere den des Reagenzgläschens und reicht bis zum Boden desselben. Das Reagenzgläschen, das mit der gleichen Bouillon, wie sie die Flasche enthält, gefüllt wird, steht neben der Flasche in einem Stativ oder wird an den Hals der Flasche gebunden. Der Schlauch ist dicht hinter seinem Ansatz an das rechtwinklig gebogene Röhrchen der Flasche durch eine Klammer abgeklemmt. Der ganze in dieser Weise ausgerüstete Apparat kommt zur Sterilisation in einen Autoklaven. Während derselben wird die Luft aus dem ganzen System ausgetrieben, weshalb sich nach Herausnahme des Apparates aus dem Autoklaven das in dem Reagenzglas befindliche Glasröhrchen, sowie der damit verbundene Schlauch bis zur Klammer mit der Bouillon des Reagenzgläschens gefüllt finden. Die Bouillon des Reagenzgläschens wird nunmehr mit jungen,

sehr virulenten Pestbazillen beimpft. Sobald sich die Kultur in der Bouillon des Reagenzröhrchens gut entwickelt hat, oder wenn man die Bouillon mit einer dichten Aufschwemmung von Agarkulturen versetzt hat, sofort läßt man nach Öffnung der Klammer durch Erheben des Reagenzglases seinen Inhalt durch den als Heber wirkenden Schlauch in die Fernbachflasche überfließen. Hierdurch ist dieselbe mit einer möglichst großen Kulturmenge und unter hinreichender Garantie gegen von außen stammende Verunreinigungen beimpft.

Sobald die Kulturen in den zahlreich beimpften Flaschen die „beabsichtigte Entwicklung" erreicht haben, werden alle in ein Sammelgefäß zusammengegossen. Zu diesem Zweck wird das an jeder Fernbachflasche an der Seitenwand, in der Nähe des Bodens sich befindende Ausflußröhrchen durch einen Schlauch mit dem Einlaßröhrchen des Sammelgefäßes verbunden. Durch einfaches Erheben der Flasche fließt deren Inhalt dann, geschützt vor dem atmosphärischen Staub, in das Sammelgefäß über.

Um die aktive Substanz noch konzentrierter zu erhalten, wird sie vermittels eines hochwertigen, agglutinierenden Serums niedergeschlagen (Serum aus dem Pasteurschen bezw. Berner Institut). Die benötigte Serummenge steht in umgekehrtem Verhältnis zu seinem Agglutinationsvermögen; „unter allen Umständen ist es jedoch nötig, eine über die berechnete hinausgehende Quantität hinzuzufügen". Sobald sich die Bakterien am Boden abgesetzt haben, wird die überstehende, nahezu klare Flüssigkeit mit einem Heber, der eventuell an dem in die Flüssigkeit eingetauchten Ende mit einem Filter versehen sein kann, abgesogen. Noch schneller und müheloser vollzieht sich die Operation bei Verwendung von großen Scheidetrichtern.

Die zurückbleibende, dichte Bakterienaufschwemmung wird nunmehr auf die zu ihrer Abtötung nötige Temperatur gebracht. Im allgemeinen genügt die Einwirkung einer Temperatur von 65° während einer Stunde. Bei reichlicher Ausbeute kommt es vor, daß hierbei einige Keime noch entwicklungsfähig bleiben.

Die Prüfung, ob die Abtötung vollständig erfolgt ist, wird mit Hilfe sehr geringer (also unschädlicher) Dosen von Kalium tellurosum (1:100000 bis 1:200000), welches dem in einzelne Fläschchen verteilten Vaccin zugesetzt wird, bewerkstelligt. Entwickelt sich in dem Vaccin ein Keim, „so entdeckt ihn das Tellurit, indem es die zur Entwicklung gelangende Kolonie schwarz pigmentiert". Das Auftreten schwarzer Wölkchen ist ein Beweis, daß die Aufschwemmung nicht steril ist, während das Unverändertbleiben des Vaccins umgekehrt einen Beweis für seine Sterilität liefern würde. Zusatz kleiner Mengen von Zucker (z. B. reine Saccharose) beschleunigt die Reaktion und läßt sie deutlicher in Erscheinung treten. Der Zusatz von Antisepticis ist zu vermeiden!

Da einerseits das Kalium tellurosum unter gewöhnlichen Umständen lange Zeit hindurch mit toten Kulturen des Pestbazillus in Berührung bleiben kann, ohne sich merklich zu verändern, andererseits, wenn lebende Keime vorhanden sind, die Reaktion für den Pestbazillus schon ungefähr bei 15° in Erscheinung tritt, so ist die Möglichkeit gegeben, die Kontrolle der Sterilität bei der für die Erhaltung der Wirksamkeit des Vaccins erforderlichen, genügend niedrigen Temperatur auszuführen.

Um immer gleich starke Vaccins zu erzielen, werden die in der Vaccinemasse enthaltenen Bakterien gewogen mit Hilfe der Cruzschen indirekten Abwägung. „Man erhält das Gewicht der Bakterien, indem

man das Gewicht des Rückstandes von einem Volum der filtrierten Flüssigkeit von demjenigen eines gleichen Volums der ganzen Bakterienaufschwemmung abzieht.“ Hat man auf diese Weise das Gewicht der in einer Vaccinprobe enthaltenen Bakterien gefunden, so läßt sich mit Hilfe von physiologischer Kochsalzlösung oder besser Nährbouillon der gewünschte Titer für die Volumeinheit herstellen.

2 mg des Produkts genügen, um wirksame Reaktionen selbst bei Erwachsenen hervorzurufen.

Gosio hat zunächst mit einer einfacheren Methode zur Herstellung des Vaccins gearbeitet, indem er sich einfach der in den oben beschriebenen Fernbachflaschen gezüchteten Bouillonkulturen bediente. 2—3 ccm einer derartigen Bouillon = einer jungen Agarröhrchenkultur stellen eine sicher wirksame Impfdosis dar. „Das mit dieser einfachen Methode hergestellte Vaccin hat bei den zahlreichen in Neapel während der kleinen Pestepidemie von 1901 und auch bei den in den folgenden Jahren zum Schutz gegen neues Eindringen der Krankheit ausgeführten Impfungen gute Dienste geleistet.“

Jatta und Maggiora[43]) haben die Wirksamkeit des Impfstoffes von Gosio Meerschweinchen und Ratten gegenüber erwiesen.

V. Verwendung der Exsudate von an Pestinfektion zugrunde gegangenen Tieren als Antigen zwecks Schutzimpfung gegenüber Pest.

Immunisierung nach Terni und Bandi[44]). Da dem Haffkineschen Impfstoff verschiedentlich Nebenwirkungen und Gefahren zugeschrieben werden, hielten es Terni und Bandi für angebracht, nach einer Methode für die Herstellung des Pestimpfstoffes zu suchen, welche erlaubt, „in möglichst kurzer Zeit eine bedeutende Menge sehr aktiven Materials zu sammeln, in welchem außer den aktiven, vaccinierenden Substanzen auch schützende gegenwärtig sind, die im geimpften Organismus eine passive Immunität hervorrufen, welche imstande ist, die Möglichkeit einer Infektion zu verhindern, bis zu dem Augenblicke, wo die aktive Immunität eintritt“.

Zur Herstellung ihres Impfstoffes spritzen die Autoren Meerschweinchen oder Kaninchen eine gewisse, nach dem Gewicht der Tiere verschieden große Menge Löfflerscher Bouillon, in welcher eine kleine Menge frischer, sehr virulenter Pestagarkultur verrieben worden ist, in die Peritonealhöhle. Derartig vorbehandelte Tiere gehen in 36—48 Stunden zugrunde. Sofort nach Eintritt des Todes entnimmt man unter Innehaltung peinlichster Vorsicht bezüglich der Sterilität das serös-eitrige, massenhaft Pestbazillen, Leukocyten, und Endothelien enthaltende Peritonealexsudat. Um eine Auswanderung von Darmbakterien ausschließen zu können, tötet man die Tiere besser in der Agonie statt ihren Tod abzuwarten. Mit dem so gewonnenen Exsudat werden zunächst zahlreiche Kulturen angelegt, um den Nachweis zu führen, daß es nur Pestbazillen enthält. Während der Bebrütung dieser Kulturen (24—36 Stunden), hält man das Exsudat bei niedriger Temperatur im Eisschrank. Hat es sich nach Ablauf dieser Zeit durch die angelegten Kulturen als rein erwiesen, so wird es für 12 Stunden bei 37° bebrütet, um eine weitere Vermehrung der Pestbazillen zu erhalten, und darauf an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für je zwei Stunden einer Temperatur von 50—52° ausgesetzt.

Hierdurch ist einerseits eine sichere Sterilisation des Impfstoffes zu erzielen, andererseits wird eine Koagulation der darin enthaltenen Serumalbumine vermieden. Zum Schlusse werden je nach der Dichtigkeit der in der Flüssigkeit enthaltenen festen Bestandteile verschieden große Mengen einer 0,5 %igen wässerigen Lösung von Karbolsäure, einer 0,25 %igen Natriumkarbonat- und einer 0,75 %igen Kochsalzlösung zugefügt, um einerseits eine nachträgliche Verunreinigung der Lymphe zu verhindern und andererseits ihre Resorbierbarkeit zu erleichtern.

Terni und Bandi prüften ihre antipestöse Lymphe an Affen, Meerschweinchen und Ratten.

Nach den Versuchen der Autoren betrug die höchste Impfdosis ihrer Lymphe, welche sie Meerschweinchen von 300—400 g Gewicht ohne Gefahr einer Vergiftung einimpfen konnten, $^1/_{10}$—$^2/_{10}$ ccm. Dieselbe muß übrigens bei jeder neuen Bereitung der Lymphe von neuem festgestellt werden. Ratten erwiesen sich widerstandsfähiger und vertrugen leicht eine Impfung mit $^2/_{10}$ ccm der Lymphe. Die Impfungen wurden subkutan ausgeführt. Außer leichter Temperaturerhöhung und wenig ausgebreiteter, nicht druckempfindlicher, nach 2—3 Tagen wieder verschwundener Infiltration an der Impfstelle bei einem Teil der Tiere, verursachte die Impfung mit den angeführten Mengen weder erhebliche lokale noch allgemeine Störungen.

Zur Prüfung der schützenden und immunisatorischen Eigenschaften ihres Impfstoffes injizierten die Autoren den Tieren verschieden lange Zeit nach der Vorbehandlung $^1/_{10}$ ccm einer 24 stündigen, zur gleichmäßigen Verteilung der Keime gut geschüttelten virulenten Pestbouillonkultur. Die gleiche Menge Pestbouillonkultur tötete bei gleicher Impfung nicht vorbehandelte Tiere innerhalb 24—48 Stunden.

Nach den Resultaten dieser Versuche glauben die Autoren ihrer Lymphe nicht nur immunisatorische Eigenschaften, die eine am 4. oder 5. Tage in die Erscheinung tretende und bei einmaliger Impfung länger als 2 Monate anhaltende aktive Immunität zur Folge haben, sondern auch schützende Fähigkeiten zusprechen zu dürfen, welch letztere einerseits einen rascheren und von weniger heftigen Reaktionserscheinungen begleiteten Eintritt der aktiven Immunität bedingen, andererseits die geimpften Organismen vor dem Auftreten der aktiven Immunität bis zu einem gewissen Grade zu schützen in der Lage sind.

Bei Versuchen an Menschen brachten die Autoren 2—$2^1/_2$ ccm für Erwachsene, 1—$1^1/_2$ ccm für Kinder in Verwendung. Aus dem Umstande, daß eine Wiederholung der Impfung keinerlei Reaktionen zur Folge hatte, schlossen sie hiermit die richtige Menge in Anwendung gebracht zu haben. Das Blutserum der geimpften Personen enthielt schon 8 bis 10 Stunden nach der Impfung ausgesprochen „antibakterische Kraft".

Immunisierung nach Hueppe und Kikuchi[45]. Hueppe und Kikuchi behandelten Meerschweinchen, Mäuse und Kaninchen mit Aggressinen vor (Peritonealexsudat von Meerschweinchen, welche mit Pestbazillen intraperitoneal infiziert worden waren). Nähere Angaben über die Herstellung der Aggressine werden in dieser Arbeit nicht gegeben, doch dürfte dieselbe nach den Vorschriften Bails ausgeführt worden sein. Das Peritonealexsudat wird darnach durch Zentrifugieren von seinem Bakteriengehalt befreit, zur sicheren Sterilisation mehrere Stunden auf höchstens 44° erhitzt und endlich zum Schutz gegen Verunreinigungen mit 0,5% Karbolsäure versetzt Die Sterilität muß durch Überimpfung der Aggressinflüssigkeit auf Agar und Bouillon sicher festgestellt sein.

Mit diesen Aggressinen konnten HUEPPE und KIKUCHI bei Meerschweinchen und Mäusen durch einmalige subkutane Verimpfung von 1,5 bzw. 0,5 ccm den Eintritt des Todes nur bedeutend hinausschieben. Durch zweimalige Vorbehandlung (subkutane Einverleibung von 1,5 und 2,0 bzw. 0,5 und 1,0 ccm Aggressin) jedoch ließen sich diese Tiere sicher gegen eine für die Kontrolltiere stets tödliche Dosis schützen. Die vorbehandelten Tiere zeigten nie eine Reaktion.

Kaninchen waren schon durch eine einmalige Vorbehandlung (subkutane Injektion von 0,4 ccm Aggressin) sicher zu schützen. Die für Kontrolltiere sicher tödliche Dosis hatte bei den einmal vorbehandelten Tieren nur ein erbsengroßes Infiltrat an der Impfstelle, sonst keinerlei Reaktion zur Folge,- bei einem zweimal vorbehandelten (0,45 ccm subkutan und 2 ccm intravenös) zeigte sich keine Spur von Infiltration an der Impfstelle und keinerlei Reaktion.

Durch Einführen genügender Mengen und Abwarten genügender Zeit ließ sich ein absolut sicherer Impfschutz erzielen, während andererseits bei zu großen oder zu schnell wiederholten Aggressingaben Überempfindlichkeit eintrat.

HUEPPE und KIKUCHI glauben mit ihrer Methode über eine absolut unschädliche, gefahrlose, aktive Immunisierung gegen die Pest zu verfügen, die zugleich an Sicherheit alle bisherigen Methoden übertreffe.

Literatur.

1) KITASATO, Lancet 1894, Bd. II.
2) YERSIN, Ann. de l'Inst. Pasteur 1894.
3) WILM, Hygien. Rundschau 1897.
4) KOLLE, Deutsche med. Wochenschr. 1897.
5) TERNI, Zeitschr. für Hygiene 1903, Bd. XLIV.
6) KRESSLING, Deutsche med. Wochenschr. 1897.
7) KASANSKI, Centralbl. für Bakt. 1898.
8) ALBRECHT und GHON, Denkschrift der Kaiserl. Akademie der Wissenschaften. Wien 1900, Bd. LXVI.
9) GAFFKY, PFEIFFER, STICKER und DIEUDONNÉ, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1899, Bd. XVI.
10) SEGANZA, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVI.
11) ZLATOGOROEF, Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVII.
12) KOSSEL und OVERBECK, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1902, Bd. XVIII.
13) MAASEN, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundsheitsamt, Bd. VIII.
14) LIGNIÈRES, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901.
15) MARKL, Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVI.
16) YERSIN. CALMETTE, BORREL, Ann. de l'Inst. Pasteur 1895.
17) KOLLE, Deutsche med. Wochenschr. 1897.
17a) WYSSOKOWITZ ung ZABOLOTNY, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897.
18) HAFFKINE, Indian med. Gaz. 1897. Ref. nach Schottelius, Hyg. Rundschau 1901, Nr. 3 ff.
19) MALLANNAH, Indian med. Record und British med. Journal 1902.
20) GABRITSCHEWSKY, Ref. Centralbl. für Bakt. 1898 (Russisches Archiv für Pathol. klin. Med. und Bakt. 1897.
21a) KOLLE, Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVI, pag. 397.
21) GAFFKY, PFEIFFER, STICKER und DIEUDONNÉ, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1899, Bd. XVI.
22) TAVEL, KRUMBEIN und GLÜCKSMANN, Zeitschr. für Hygiene 1902, Bd. XL, pag. 239.
23) CONÇALVES, CRUZ, Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII, pag. 911.
24) Zitiert nach TAVEL, KRUMBEIN und GLÜCKSMANN, Zeitschr. für Hygiene 1902, Bd. XL, pag. 239.
25) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1899, Bd. XVI.

26) Yersin und Carré 1900, zitert nach Strong, Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene 1906, Bd. X, pag. 235.
27) Albrecht und Ghon, Denkschrift der mathem. naturw. Klasse der Kaiserl. Akad. 1900, Bd. LXVI, II. Teil.
28) Zeitschr. für Hyg. u. Infektionskr. 1903, Bd. XLV, ferner Deutsche med. Wochenschrift 1903, Nr. 28, ferner Zeitschr. für Hygiene 1904, Bd. XLVIII, pag. 399.
29) Strong, Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene 1906, Bd. X, pag. 235 und Kolle und Strong, Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 11.
30) Kolle u. Otto, Zeitschr. für Hyg. u. Infektionskr. 1904, Bd. XLVIII, pag. 399.
31) Kolle, Hetsch und Otto, Zeitschr. für Hyg. u. Infektionskr. 1904, Bd. XLVIII, pag. 442.
32) Lustig und Galeotti, Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 227.
33) Lustig und Galeotti, Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 289.
34) Galeotti und Malenchini, Centralbl. für Bakt. 1897, Bd. XXII, pag. 508.
35) Tavel, Krumbein und Glücksmann, Zeitschr. für Hyg. u. Infektionskr. 1902, Bd. XL, pag. 239.
36) Besredka, Ann. de l'Institut Pasteur 1906, Bd. XX, pag. 304.
37) Markl, Centralbl. für Bakt. 1898, Bd. XXIV. — Wiener med. Wochenschr. 1900. — Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVII.
37a) Kolle, Festschr. zum 60. Geburtstage von R. Koch Jena 1903.
38) Albrecht und Ghon, Denkschrift der mathem. naturw. Klasse der Kaiserl. Akad. 1900, Bd LXVI, II. Teil C.
39) Kossel und Overbeck, 10. Intern. Kongreß für Hygiene, Paris 1900. Ref. Hyg. Rundschau 1901.
40) Kitasato, Takaki, Shiga und Moriya, Bericht über die Pestepidemie in Kobe und Osaka, Tokio 1900.
41) Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902.
42) Gosio, Zeitschr. für Hygiene 1905, Bd. L, pag. 519.
43) Jatta und Maggiora, Vaccinazioni e sieroprofilassi nella infezione pestosa. Roma 1904.
44) Terni und Bandi, Deutsche med. Wochenschr. 1900, pag. 463.
45) Hueppe und Kikuchi, Centralbl. für Bakt. 1905, I. Abt., Bd. XXXIX, pag. 610.

XXIII.

Tuberkulin zu therapeutischen Zwecken beim Menschen.

Von

Dr. med. E. Löwenstein,

Beelitz-Heilstätten bei Berlin.

„Wenn man ein gesundes Meerschweinchen mit einer Reinkultur von Tuberkelbazillen impft, dann verklebt in der Regel die Impfwunde und scheint in den ersten Tagen zu verheilen; erst im Laufe von 10 bis 14 Tagen entsteht ein Knötchen, welches bald aufbricht und bis zum Tode des Tieres eine ulcerierende Stelle bildet. Aber ganz anders verhält es sich, wenn ein bereits tuberkulös erkranktes Meerschweinchen geimpft wird. Am besten eignen sich hierzu Tiere, welche 4—6 Wochen vorher erfolgreich geimpft wurden. Bei einem solchen Tiere verklebt die Impfwunde auch anfangs, aber es bildet sich kein Knötchen, sondern schon am nächsten oder am zweiten Tage tritt eine eigentümliche Veränderung der Impfstelle ein. Dieselbe wird hart und nimmt eine dunklere Färbung an, und zwar beschränkt sich diese nicht auf die Impfstelle allein, sondern breitet sich auf die Umgebung bis zu einem Durchmesser von 0,5—1,0 cm aus. An den nächsten Tagen stellt sich dann immer deutlicher heraus, daß die so veränderte Haut nekrotisch ist, sie wird schließlich abgestoßen, und es bleibt dann eine flache Ulceration zurück, welche gewöhnlich schnell und dauernd heilt, ohne daß die benachbarten Lymphdrüsen infiziert werden. Die verimpften Tuberkelbazillen wirken also ganz anders auf die Haut eines gesunden als auf diejenige eines tuberkulösen Meerschweinchens. Diese auffallende Wirkung kommt aber nicht etwa ausschließlich den lebenden Tuberkelbazillen zu, sondern findet sich ebenso bei abgetöteten, ganz gleich, ob man sie, wie ich es anfangs versuchte, durch niedrige Temperaturen von längerer Dauer oder durch Siedhitze, oder durch gewisse Chemikalien zum Absterben gebracht hat.“

Durch diese grundlegende Beobachtung Robert Kochs war also der Nachweis erbracht, daß bereits nach einer einmaligen Injektion das betreffende Organgebiet eine gewisse Widerstandsfähigkeit gegen eine Reinfektion erworben hat. Der Gedanke, die Stoffe, welche das Haften der zweiten Infektion unmöglich machen, für eine Beeinflussung des ersten Infektionsherdes auszunützen, führte Robert Koch zur spezi-

fischen Therapie der Tuberkulose. Die Bedeutung des Satzes „dasselbe. was Ursache der Erkrankung ist, kann unter Umständen auch Ursache der Genesung sein", fand durch Robert Koch seine Anerkennung, indem dieses Prinzip als Grundlage einer neuen ätiologischen Therapie der Tuberkulose ausgestaltet wurde.

In der Verfolgung der Tatsache, daß größere Mengen von Tuberkelbazillen tuberkulöse Meerschweinchen in kurzer Zeit töten, machte Robert Koch die Beobachtung, daß kleine, oft wiederholte Dosen von Tuberkelbazillen sowohl auf den Allgemeinzustand des Versuchstieres als auf die ulcerierende Impfwunde eine günstige Rückwirkung ausübten. Der praktischen Anwendung solcher Aufschwemmungen von abgetöteten Tuberkelbazillen stellte sich aber der Umstand entgegen, „daß an den Injektionsstellen die Tuberkelbazillen nicht etwa resorbiert werden oder in anderer Weise verschwinden, sondern oft unverändert lange Zeit liegen bleiben und kleinere oder größere Eiterherde erzeugen".

Deshalb suchte Koch das heilende Prinzip von dem schädlichen zu trennen, ersteres in löslicher und leicht resorbierbarer Form zu gewinnen und gelangte so — nach vielen Versuchen — zur Herstellung des Tuberkulins durch Glyzerinextrakte der Tuberkelbazillen.

Den Mitteilungen Robert Kochs am 13. November und 15. Januar 1891 (Deutsche med. Wochenschrift) folgte eine ungeheuere Begeisterung, die ganz vergessen ließ, wie weit die an die Mitteilungen Kochs geknüpften Erwartungen gehen durften. Ohne Auswahl wurden die schweren und schwersten Fälle ambulatorisch behandelt und nach einer Behandlung von 1—2 Monaten mit der Behandlung ausgesetzt in der Erwartung, daß die schweren und ausgedehnten Zerstörungen und Gewebsverluste der tuberkulösen Organe behoben und eine restitutio ad integrum wieder erreicht sein müßte. Die ungeheuren, maßlosen Hoffnungen, die die Mitteilung Robert Kochs in aller Welt erweckt hatte, spiegelt sich sehr schön wieder in den amtlichen Berichten über die Wirksamkeit des Kochschen Heilmittels. In der Zusammenstellung der Berichtsergebnisse hebt Guttstadt mit Recht hervor: „Sämtliche Berichte beziehen sich auf Beobachtungen während einer höchstens achtwöchentlichen Zeitdauer, in der Zeit vom November bis Ende Dezember, ausnahmsweise bis Mitte Januar." So darf es uns nicht wundern, wenn der Bericht zu keinem brauchbaren Resultate kommen konnte, da die meisten Autoren sich scheuten, in so kurzer Zeit ein Urteil abzugeben.

Deshalb haftete das Odium der Unbrauchbarkeit dem Tuberkulin derart an, daß auch in der Folgezeit seine Anwendung zu Heilzwecken eine beschränkte blieb.

Es hat nie wieder in so großem Umfange eine Prüfung erfahren, wie damals auf Wunsch des preußischen Ministeriums. Aus der Chirurgie ist es verbannt, nur noch selten stößt man nach dem Jahre 1892 in der Literatur auf einzelne chirurgische Fälle, welche mit Alt-Tuberkulin behandelt wurden.

Ganz entschieden hatten Virchow [933]) und Baumgarten [73]), sowie deren Schüler Hansemann [341]), Yamagiwa [962]), Czaplewski und Roloff [182]), Baas [32]), welch letztere den Verlauf der experimentellen Iristuberkulose unter dem Einfluß der Tuberkulinbehandlung studierten, gegen einen therapeutischen Wert des Tuberkulins Stellung genommen; hingegen haben Dönitz [201]) und Sattler [791]) gerade bei der Iristuberkulose des Kaninchens überraschende Erfolge beschrieben; freilich war damals nicht

bekannt, daß mit menschlicher Tuberkulose erzeugte Tuberkulose des Kaninchens auch spontan ausheilen kann. Hingegen lauteten die Berichte von menschlicher Augentuberkulose, welche mit Tuberkulin behandelt war, außerordentlich günstig (ALBRAND [7]), COHN [171]), GEPNER, SCHAFFRANEK [794]), UHTOFF [1178]), WAGNER [1182]), LANDGRAFF [507]), SATTLER [791]) cit. nach SCHICK).

Auch bei der Lungentuberkulose war die große Mehrzahl der Ärzte wieder zur alten Behandlungsweise zurückgekehrt, nur wenige Anhänger, wie PETRUSCHKY, GÖTSCH, DOUTRELEPONT, B. FRÄNKEL, SPENGLER, MÖLLER, BANDELIER, PICKERT, THORNER, KRÄMER hielten die Frage der therapeutischen Wirksamkeit noch nicht für erledigt, sondern setzten ihre Arbeiten zur Ausgestaltung einer Methodik der Tuberkulinbehandlung unentmutigt fort. Hauptsächlich ihrem Bemühen ist es wohl zu danken, wenn das Tuberkulin in immer weiteren Kreisen neue Anhänger gewinnt, und seine Anwendung auf alle Fälle von Tuberkulose, die anatomisch noch eine Besserung zulassen, ausgedehnt werden konnte. Derzeit bricht sich die Erkenntnis immer mehr Bahn, daß eine rationelle Therapie der Tuberkulose nur diejenige genannt werden kann, welche die Ursache der Erkrankung berücksichtigt.

Darstellung des Alt-Tuberkulin.

In weite Kolben, die ein recht üppiges Flächenwachstum der Tuberkelbazillen gestatten, wird eine 4 %ige Glyzerinpeptonbouillon ungefähr 3 cm hoch eingefüllt. Dann werden vorsichtig dünne Kulturbröckel- oder -blättchen an der Glaswand derart abgestreift, daß sie zum Schwimmen kommen. Sinken die Kulturbröckel unter, so findet in der Regel kein Wachstum statt, da der Tuberkelbazillus nur bei reichlichem Luftzutritt fortkommt. Deshalb ist auch bei Bewegungen der Kolben die größte Vorsicht geboten, damit die Klümpchen der Kultur möglichst an der Oberfläche erhalten werden. Nach ungefähr 4 Wochen bedecken schon weiße Rasen die Bouillon, nach ungefähr 8 Wochen ist die Kultur für die Gewinnung von Tuberkulin am geeignetsten.

Am besten gießt man den ganzen Inhalt des Kolbens mit den Rasenstücken der Kultur in eine graduierte Glasbirne, die in ein Wasserbad von 60° gehängt wird. Dann wird die Temperatur des Wasserbades derart reguliert, daß sie langsam 90° erreicht. Bei dieser Temperatur wird die Glyzerinbouillon auf $^1/_{10}$ ihres früheren Volumen eingeengt. Das erhaltene Produkt ist eine braune, zähe Flüssigkeit von starkem Salzgehalt. Infolge der Konzentration beträgt jetzt der Glyzeringehalt 40 %. Diese Flüssigkeit schickt man noch durch ein Tonfilter; dann ist sie direkt gebrauchsfähig. — Dies ist die Herstellung des Höchster Tuberkulin die, wie mir Herr Geheimrat Prof. LIBBERT kürzlich versicherte, sich genau nach der KOCHschen Vorschrift richtet.

Manche Autoren wollen die Hitze bei der Extraktion der Bazillen unter allen Umständen vermieden wissen, da sicherlich ein Teil der spezifischen Substanzen durch die Hitze zugrunde geht. Diesen Gedanken hat DENYS [195]) seit 1896 energisch vertreten und seine Erfahrungen mit der von ihm ausgebildeten Methodik, die streng jede Reaktion vermeidet, in einem schönen Werk „Le Bouillon filtré du Bacille de la Tuberkulose dans le Traitement de la Tuberkulose humaine“, Paris, O. Doiss. 1905 niedergelegt. SCHNÖLLER [816]) in Davos hat über gute Resultate in 215 Fällen berichtet. [Siehe auch PHILIPPI [706])]. Auch SPENGLER [867]) hatte 1893

auf Wunsch Robert Kochs Versuche mit der filtrierten Bouillon unternommen und 1897 einige diesbezügliche Angaben gemacht. Landmann[510]) stellt bei Merk ein Tuberkulin her, indem er Extraktionen bei 40°, 50°, 60°, 70°, 80° bis 100° mit physiologischer Kochsalzlösung vornimmt, das Gemisch dieser Extrakte, das sowohl die thermostabilen als die thermolabilen Extraktstoffe enthält, nennt Landmann Tuberkulol. (Siehe Frey.) Andere Autoren suchten wieder durch eine Veränderung des Nährbodens die klinischen Resultate zu verbessern; so stellt Vesely[927]) eine Bouillon ohne Fleischextrakt, aber mit höherem Glyzeringehalt als eine wesentliche Verbesserung des Alt-Tuberkulins hin. Außer dem „Beranek"schen Tuberkulin, das auch die unlöslichen Bestandteile der Tuberkelbazillen enthält, ist das Perlsucht-Tuberkulin Spenglers[872]), das ebenfalls wie das von Denys einfach durch Filtrieren von Perlsucht-Glyzerin-Bouillon-Kulturen gewonnen wird, noch von Spengler beim Menschen angewandt worden. Andrerseits sind von verschiedenen Autoren noch Versuche angestellt worden, aus säurefesten Bazillen dargestelltes Tuberkulin für die Tuberkulosetherapie zu verwenden. So haben Beck[83]), Möller[610]), Zupnik[970]), Terre[896]), Babes[33]) aus Kulturen von säurefesten Bazillen nach dem oben geschilderten Verfahren Robert Kochs ein Tuberkulin dargestellt, das sich nur durch einen bedeutend geringeren Giftgehalt vom Alt-Tuberkulin unterscheiden soll. Einen sehr interessanten Beitrag lieferte Feistmantel[252]), indem er aus Glyzerinbouillonkulturen der säurefesten Streptothrichee farcin de boeuf, ein äußerst giftiges Tuberkulin, darstellte, das in seiner Wirkung auf tuberkulöse Tiere dem Alt-Tuberkulin nur wenig nachstand; andererseits waren auch mit dieser Streptothrichee infizierte Meerschweinchen gegenüber dem Alt-Tuberkulin zwar empfindlich, jedoch nicht in so hohem Grade, wie dem aus der Streptothrichee dargestellten Präparate gegenüber.

Nach Robert Koch haben noch verschiedene Forscher sich bemüht, die giftigen Substanzen in den Tuberkelbazillen von den immunisierenden zu trennen; die Arbeiten von Behrings haben deutlich die Schwierigkeit gezeigt.

Karl von Ruck[772]) (Asheville, N. C.) behauptet, bereits seit dem Jahre 1898 ein ähnliches Tuberkelbazillenpräparat herzustellen, welchem er ebenfalls einen hohen immunisatorischen Wert zuschreibt.

Für die guten Behandlungserfolge beim Menschen hat von Ruck folgende Gewährsmänner angegeben: Williams Sutterland, Baker, Denison, Mc Mester, Weaver, Durel, Malas, Parham, Pottenger, Briggs, High und Sawpar.

Hier wäre auch das Tuberkulocidin von Klebs[440]) zu erwähnen, über dessen Anwendung aber nur sehr spärliche Berichte vorliegen.

Für die Bewertung von sämtlichen Präparaten muß man wohl die alte Erfahrung im Auge behalten, daß der Immunisierungseffekt zu sinken pflegt, je mehr das Immunisierungsmaterial vom Infektionsmaterial verschieden ist.

Genügen doch schon so „schonende" Eingriffe wie Kochen, Alkoholfällung, etc. um für die Immunisation wichtige Bestandteile der Bazillen zu zerstören. Außerordentlich wertvolle Fingerzeige, in welcher Richtung sich die chemischen Methoden zu halten haben, um eine Trennung der giftigen von den immunisierenden Bestandteilen zu erzielen, sind von Obermayer und Pick[707]) veröffentlicht worden. Daß mit einem durch Kochen denaturierten Bakterieneiweiß keine Immunität gegen die nativen Giftstoffe erzielt wird, läßt sich sehr leicht im Verlaufe der Be-

handlung mit Neu-Tuberkulin beweisen. Injiziert man einem Patienten, der mit gekochtem Neu-Tuberkulin vorbehandelt ist, ungekochtes Neu-Tuberkulin, so reagiert derselbe, wie wenn überhaupt keine spezifische Behandlung vorausgegangen wäre.

Aus diesem Grunde kann man denjenigen Tuberkulosepräparaten, die durch derartig tiefgreifende Prozesse aus den Bazillen dargestellt werden, von vornherein nur einen geringen therapeutischen bzw. immunisatorischen Effekt zuschreiben.

Weiterhin ist sichergestellt, daß die einzelnen Tuberkulosestämme der menschlichen Tuberkulose untereinander verglichen ganz grobe Unterschiede zeigen.

Schon bei der aufmerksamen Untersuchung des tuberkulösen Auswurfs ist es leicht festzustellen, daß die Tuberkelbazillen verschiedener Fälle sogar morphologisch bereits weitgehende Verschiedenheiten aufweisen. Bei eingehender Untersuchung werden diese Differenzen noch vertieft, es ergeben sich nicht bloß Schwankungen in der Virulenz, sondern auch in den kulturellen Eigenschaften der Tuberkelbazillen. So hat der Verfasser direkt aus dem Sputum einer Schwindsüchtigen einen biologisch der Hühnertuberkulose sehr nahestehenden Stamm isoliert, welcher die Versuchstiere unter dem Bilde einer wirklichen Septikämie tötet. Ein zweiter, durch Meerschweinchenpassage aus dem Sputum gezüchteter Stamm wies ebenfalls erhebliche Abweichungen vom Typus humanus ab. Es ist eine unleugbare Tatsache, daß die einzelnen Tuberkulosestämme wesentliche Verschiedenheiten aufweisen. (Siehe auch Löffler[543])

Wertbestimmung des Alt-Tuberkulins.

Die Beobachtung Kochs, daß oft wenige Milligramm Tuberkelbazillen genügen, um ein tuberkulöses Meerschweinchen in kurzer Zeit, 6—30 Stunden, zu töten, ist ein Fundamentalversuch geworden.

Eine Giftbestimmung des Alt-Tuberkulins sollte am besten in Anlehnung an den Tuberkulosestamm, der zur Herstellung des Tuberkulins gedient hat, vorgenommen werden, und zwar derart, daß man den Giftgehalt eines Kubikzentimeters Tuberkulin in Parallele setzt mit der Wirkung der lebenden Tuberkelbazillen, kurz den Giftgehalt des Tuberkulins ausdrückt in der Menge der Tuberkelbazillen, welche die gleiche Wirkung hervorrufen kann.

Koch selbst hat ein Tuberkulin für brauchbar erklärt, wenn 0,5 ccm davon genügen, um ein drei bis vier Wochen vorher mit Tuberkulose infiziertes Meerschweinchen binnen 6—30 Stunden zu töten. Der Giftwert des Tuberkulins ist in erster Linie von der Natur des verwendeten Tuberkelbazillenstammes abhängig; es gibt Tuberkuline, bei denen erst 0,5 ccm ein tuberkuloses Meerschweinchen tötet, bei manchen Stämmen aber liegt die tödliche Dosis des Tuberkulins schon bei 0,1 und 0,05 ccm. In der jüngsten Zeit hat Weber einen Stamm des Typus humanus beschrieben, der ein Tuberkulin von auffallender Giftigkeit erzeugte; 0,02 ccm tötete tuberkulöse Meerschweinchen noch regelmäßig.

Bei einem durch Tuberkulin getöteten tuberkulösen Meerschweinchen finden sich folgende Veränderungen vor: „Die Impfstelle des am Bauche subkutan geimpften Tieres zeigt sich beim Zurückschlagen der Bauchdecken durch Gefäßinjektion stark gerötet, oft hat sie eine dunkle, fast violette Färbung; die Injektionsröte erstreckt sich auch mehr oder minder weit auf die Umgebung; die der Impfstelle benachbarten

Lymphdrüsen sind ebenfalls stark gerötet. Milz und Leber lassen außer den tuberkulösen Veränderungen an ihrer Oberfläche zahlreiche punkt- bis hanfkorngroße Flecken erkennen, welche schwärzlich-rot gefärbt sind und ganz das Aussehen von Ekchymosen haben, wie sie bei manchen Infektionskrankheiten gefunden werden. Untersucht man diese Stellen mikroskopisch, dann stellt sich heraus, daß es sich nicht um Blutextravasate handelt, sondern um eine enorme Erweiterung der Capillaren in der nächsten Umgebung der tuberkulösen Herde. Die Kapillaren sind vollgestopft mit roten Blutkörperchen, welche so dicht zusammengedrängt liegen, daß es so aussieht, als sei hier der Blutstrom zum vollständigen Stillstand gekommen. Nur ausnahmsweise findet man Zerreißungen der Gefäße und Bluterguß in die Herde. Auch in der Lunge finden sich, aber nicht so regelmäßig und nicht so in die Augen fallend, ähnliche Veränderungen. Der Dünndarm ist oft stark und gleichmäßig gerötet. Das was in diesem Symptomenkomplex nie fehlt und geradezu pathognomonisch ist, sind die hämorrhagie-ähnlichen Flecke an der Leberoberfläche."

Bei intraperitonealer Injektion findet man in der Bauchhöhle oft noch nach 16—20 Stunden Tuberkulin, welches nur wenig durch ein spärlich Lymphocyten enthaltendes Exsudat verdünnt ist.

Die Wertbestimmung des Tuberkulins stieß deshalb auf so besondere Schwierigkeiten, weil gesunde Meerschweinchen und Kaninchen absolut immun dagegen sind, Meerschweinchen vertragen 2 ccm, Kaninchen 5 ccm Alt-Tuberkulin ohne eine andere Krankheitserscheinung als die Glyzerinwirkung. von Lingelsheim wollte eine spezifische Wirkung des Tuberkulins auf gesunde Meerschweinchen mittels intrakranieller Injektion nachweisen, allein die Kontrollversuche Neufelds mit Natriumsulfat und anderen Salzen ergaben, daß es sich hier gar nicht um eine spezifische Giftwirkung handelt.

„Auf Grund der von Dönitz gewonnenen Erfahrungen wird die amtliche Prüfung des Tuberkulins in folgender Weise vorgenommen: Etwa 50 Meerschweinchen von annähernd gleichem Gewicht (350—400 g) werden mit 0,5 mg einer frischen in 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gleichmäßig aufgeschwemmten 12—14tägigen Bouillonkultur subkutan injiziert. Sobald diese Tiere tuberkulös geworden sind, was man an der fortgesetzten Gewichtsabnahme, die in der Regel gegen Ende der dritten Woche einsetzt, erkennen kann, wird ein Vorversuch angestellt zur Prüfung, ob die Meerschweinchen für den eigentlichen Wertbemessungsversuch reif sind. Zu diesem Zwecke injiziert man einer Anzahl Tieren (2—4) fallende Dosen Standardtuberkulin und zwar 0,3 und 0,5. Diese Dosen müssen ausreichen, um die Tiere zu töten. Töten selbst 0,5 ccm die Tiere nicht, so muß man noch einige Zeit mit der Anstellung des Versuchs warten. Im anderen Falle folgt sogleich der Prüfungsversuch. Bei diesem setzt man zwei Parallelreihen zu fünf bis sechs Tieren an. Die erste Reihe der Tiere erhält fallende Dosen Standardtuberkulin, um die minimal tödliche Dosis zu ermitteln, die zweite Reihe die entsprechenden Dosen des zu prüfenden Präparates, um dessen Wert zu ermitteln. In der Regel wählen wir hierzu (bei positivem Ausfall der Vorprobe) folgende Dosen Tuberkulin: 0,05—0,075—0,1—0,15 bis 0,2—0,3 ccm, da sich gezeigt hat, daß der Titer bei Verwendung reifer Tiere meist bei 0,1 bzw. 0,15 liegt.

Zur genaueren Dosierung der Tuberkulinpräparate benutzen wir bei der Prüfung eine zehnfache Verdünnung der Originalpräparate, und injizieren dementsprechend 0,5—3 ccm subkutan.

Der Tod der Tiere muß innerhalb der ersten 24 Stunden eintreten und der Sektionsbefund bei den eingegangenen Tieren den für die Tuberkulinwirkung charakteristischen Befund zeigen.

Aus dem Verlauf beider Prüfungsreihen ergibt sich durch Vergleich der Wert des zu prüfenden Präparates. Als vollwertig wird ein Tuberkulin angesehen, wenn in der Prüfungsreihe dieselben Dosen genügten, um die Tiere zu töten, wie beim Standardpräparat. Bestehen Differenzen, so wird, falls das betreffende Präparat minderwertig ist, dasselbe beanstandet, im anderen Falle, falls es kräftiger wirkend ist, wird der Fabrik mitgeteilt, wie stark das Präparat zu verdünnen ist, damit seine Wirkung dem des Standardtuberkulins entspricht." (Zitiert nach Otto, die staatliche Prüfung der Heilsera, Arbeiten aus dem königlichen Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt, Gustav Fischer, 1906.)

Diese exakte Prüfung ist für die Praxis von der größten Bedeutung, da sie einen stets gleichbleibenden Gehalt an spezifisch wirksamen Stoffen garantiert und Vermutungen über Schwankungen des Giftwertes den Boden entzieht. Von vornherein muß deshalb einem so gut kontrollierten Präparat bei der Anwendung am Menschen unbedingt der Vorzug eingeräumt werden, da kein anderes Präparat uns die gleiche Sicherheit in der Konstanz seiner Wirkung bietet.

Die Technik der Tuberkulininjektion.

Das Tuberkulin wird von den Höchster Farbwerken in 1 ccm und 5 ccm-Fläschchen abgegeben. Da an einem Injektionstag wohl nur selten 5 ccm des Volltuberkulins zur Verwendung kommen, so empfiehlt es sich, das Tuberkulin nur in 1 ccm-Fläschchen zu beziehen. Als Prinzip ist bei der Technik der Injektion festzuhalten, daß für jede Reihe von Injektionen die entsprechenden Lösungen immer frisch hergestellt werden und zwar am besten in folgender Weise. Es werden je 9 ccm sterilen Wassers — es kann auch Brunnenwasser sein — in vier trocken sterilisierte Erlenmeyer-Kölbchen oder Reagenzgläser gefüllt, die man sofort mit I, II, III, IV bezeichnet. Dann setzt man mit einer gut kalibrierten 1 ccm-Pipette 1 ccm = 1000 mg des reinen Tuberkulins zu Röhrchen I, so daß jetzt 1 ccm des Röhrchens I 100 mg Tuberkulin enthält. Das Röhrchen II erhält 1 ccm = 100 mg aus dem Röhrchen I, so daß 1 ccm des Röhrchens II 10 mg enthält. Weitere Verdünnungen sind nach demselben Schema leicht möglich. Trotzdem der Autor über ein Material von ungefähr 20000 selbst beobachteten Tuberkulininjektionen verfügt, hat er keinen einzigen Abszeß gesehen; die beiden Angaben in der Literatur über das Entstehen von Abszessen nach Tuberkulininjektionen fallen nicht dem Tuberkulin, sondern dem betreffenden Autor zur Last

Injiziert werden stets nur Bruchteile eines Kubikzentimeters, da man durch große Flüssigkeitsmengen das Entstehen von kleinen Infiltraten begünstigt. Die Injektion erfolgt am besten in der Höhe des Schulterblattwinkels. Bei therapeutischen Tuberkulininjektionen, insbesondere bei großen Dosen, empfiehlt es sich, die Injektion des Morgens vorzunehmen, damit die Patienten nicht in der Nacht von der Reaktion überrascht werden. Der Patient soll möglichst Ruhe einhalten, da körperliche Bewegung das Zustandekommen der Allgemeinreaktion fördert. Die Temperatur soll dreistündlich gemessen werden, tritt Fieber in der Nacht ein, soll ebenfalls die Temperatur festgestellt werden. Als positiv gilt die Reaktion nach Robert Koch, bei der die erreichte Temperatur um 0,5° höher ist als die Durchschnittstemperatur. Manchmal ist die

Temperatursteigerung nicht so hoch, jedoch die Reaktion des tuberkulösen Herdes, sowie die subjektiven Erscheinungen (siehe dieses Handbuch, Tuberkulin zu diagnostischen Zwecken) sind ausgesprochen. Auch in diesen Fällen muß man die Reaktion als positiv ansehen, trotzdem die Temperatursteigerung vielleicht nur $0{,}2^0$ beträgt. Bei der nächsten Injektion derselben Dosis, kommt es dann in der Regel zu einer kräftigen Allgemeinreaktion.

Die Behandlung des Menschen mit Tuberkulin.

Für die Behandlung mit Alt-Tuberkulin kommen alle Fälle in Betracht, bei denen die Diagnose Tuberkulose sicher gestellt ist. Nur dort, wo die Tuberkulose durch Erkrankung anderer Organe kompliziert ist, wird eine Zurückhaltung gerechtfertigt sein. Zu diesen Krankheiten gehören in erster Linie Erkrankungen des Herzens und der Nieren, insbesondere Herzleiden sind nicht für eine Tuberkulinkur geeignet. Bei nervös veranlagten Personen, Neurasthenikern kann man getrost Tuberkulin anwenden. Gravidität, Epilepsie und Diabetes schließen natürlich die Anwendung des Tuberkulins aus. Häufig wiederkehrende Blutungen können nicht als eine Kontraindikation angesehen werden, da dieselben gewöhnlich im Verlaufe der Behandlung verschwinden. Dagegen sind Fälle mit Temperatursteigerungen, sowie insbesondere Fälle mit niedrigen Morgen- (36,5) und höheren Abendtemperaturen (37,6) im allgemeinen von der Behandlung auszuschließen. Auch Fälle, in denen frische Erkrankungen der Pleura nachweisbar sind, sind nicht dafür geeignet.

Die Methodik der Immunisation.

Im allgemeinen empfiehlt es sich bei der Behandlung mit Alt-Tuberkulin die Regeln einzuhalten, die uns die Erfahrung bei der Immunisation mit anderen Toxinen in die Hand gegeben hat. Doch unterscheiden sich die Versuchsbedingungen ganz wesentlich von denen, wie sie bei einer einfachen Immunisation zur Antitoxinerzeugung gegeben sind.

Starke Allgemeinreaktionen sucht man stets zu vermeiden und zieht eine einschleichende Behandlung einer in kurzen Intervallen rasch die Tuberlindosis steigenden Behandlung vor. In den meisten Fällen empfiehlt es sich, sich auf eine Injektion in der Woche zu beschränken, doch sind auch zwei Injektionen in der Woche noch allgemein üblich.

Als Anfangsdosis kann diejenige Tuberkulindosis in Verwendung kommen, auf die bei der diagnostischen Injektion eine Allgemeinreaktion erfolgt; und deshalb sollen alle Fälle, welche eine Behandlung mit Alt-Tuberkulin unterzogen werden, vorher diagnostisch injiziert sein. Sieht man von einer diagnostischen Injektion ab, so muß man die Behandlung mit Bruchteilen eines Milligramms beginnen. Einzelne Autoren begannen die Behandlung mit $^1/_{100}$ mg, andere Autoren hingegen (s. Petruscky, Möller, Bandelier, Löwenstein verwandten $^1/_{10}$ und $^2/_{10}$ als Anfangsdosis. Dort, wo die Zeit für eine spezifische Behandlung von vornherein beschränkt ist, erweist sich der letztere Modus zweifellos als der bessere; insbesondere darf man nicht in den Fehler verfallen, Hundertstel eines Milligramms alle zwei Tage zu verabreichen, ohne die Dosen kräftig zu steigern. Durch die wiederholte Infektion von so kleinen Dosen, entstehen immer wieder Reaktionen (s. Überempfindlichkeit). Nach der Reaktion läßt man dem Organismus eine Zeit der Erholung, die nach der Beurteilung des Falles zu bemessen ist, meistens genügen 10—14 Tage, um den Körper für eine neue Injektion widerstandsfähig zu machen. Nach

dem Abklingen sämtlicher Symptome und der eingetretenen Erholung verabreicht man dieselbe Dosis noch einmal oder steigert die Dosis in geringem Maße, jedenfalls hat sich gezeigt, daß ein Zurückgehen mit der Dosis nicht empfehlenswert erscheint, viel ratsamer ist es statt dessen nach Ablauf einer weiteren Woche eine höhere Dosis zu verabreichen aus Gründen, die später gewürdigt werden sollen.

Die Behandlung mit Tuberkulin kann als beendet angesehen werden, wenn der Patient eine Dosis von 500 mg ohne eine besondere Allgemeinreaktion vertragen hat, doch pflege ich in der Regel noch bis auf 1 ccm des reinen Tuberkulin die Dosis zu steigern, ohne daß ich je ernstere Allgemeinerscheinungen beobachten konnte. Diese Dosis pflege ich dann einige Mal zu wiederholen, solange die Herdreaktion noch ausgesprochen ist. Gerade bei schweren Fällen mit ausgedehnten Zerstörungen der Lunge treten in diesem Stadium der Immunisation häufiger Reaktionen auf, die aber durchaus nicht hindern sollen — in möglichst langen Zwischenräumen — bis vier Wochen — die Tuberkulindosen zu steigern; bei leichten Fällen gestaltet sich der Schluß der Behandlung viel leichter, da bei denselben eine rasche Steigerung bis auf 1000 mg ohne starke Allgemeinreaktion möglich ist.

Ein strenges Schema für die Steigerung der Tuberkulindosen zu geben, ist an und für sich nicht gut angängig, da auf den Gang der Immunisation zu viele andere Faktoren Einfluß gewinnen; von verschiedenen Autoren wurde öfters hervorgehoben, daß die Tuberkulinbehandlung eine streng individuelle sein müsse; aber bei der Fülle des Materials ist doch eine gewisse Gesetzmäßigkeit der Umstände zu beobachten, unter welchen es zu einer Immunität gegen hohe Tuberkulinmengen kommt. Es sei daher versucht, an der Hand eines Beispiels den Gang einer Immunisation zu verfolgen.

Die Patientin X. leidet an einer vorgeschrittenen Tuberkulose der linken Lunge, welche sich durch zahlreiche Rhonchi, mittel- und feinblasiger Natur über die ganze Seite, Giemen und großblasige klingende Rhonchi über der linken Spitze äußert; im Auswurf sind zahlreiche Tuberkelbazillen vorhanden. Nach einer hygienisch-diätetischen Kur von drei Monaten setzte die Behandlung mit Alt-Tuberkulin ein. Patientin erhielt am

28. VIII. 05	$^{2}/_{10}$ mg	37,5	22. IX. 05	$^{5}/_{10}$ mg	37,7	26. IX. 05	5,0 mg	37,2
4. IX. 05	$^{2}/_{10}$ „	36,9	6. X. 05	$^{6}/_{10}$ „	37,6	6. IX. 05	6,0 „	37,4
7. XI. 05	$^{2}/_{10}$ „	37,1	17. X. 05	1,0 „	37,2	13. XI. 05	10,0 „	38,3
11. IX. 05	$^{2}/_{10}$ „	37,7	23. X. 05	3,0 „	37,1	20. XI. 05	10,0 „	37,3

27. XI. 05	10,0 mg	37,1	
30. XI. 05	20,0 „	37,7	Tuberkelbazillen noch reichlich vorhanden.
7. XII. 05	30,0 „	38,8	
14. XII. 05	30,0 „	37,3	
21. XII. 05	40,0 „	37,3	
28. XII. 05	50,0 „	37,4	
8. I. 06	100,0 „	37,9	Tuberkelbazillen noch vorhanden.
18. I. 06	200,0 „	39,4	do. do. do.
25. I. 06	200,0 „	39,4	Tuberkelbazillen nicht mehr auffindbar.
15. II. 06	300,0 „	39,4	do. do. do. „
1. III. 06	400,0 „	38,7	Tuberkelbazillen wieder vorhanden.
19. III. 06	500,0 „	38,3	Tuberkelbazillen nicht mehr auffindbar.
20. IV. 06	600,0 „	37,6	do. do. do. do.
6. V. 06	800,0 „	37,4	do. do. do. do.
21. V. 06	1000,0 „	37,3	do. do. do. do.

Bei späteren Untersuchungen werden ebenfalls keine Tuberkelbazillen mehr gefunden, der früher reichliche Auswurf war fast völlig geschwunden, die Rhonchi nur noch an der Spitze leise hörbar, die

Atmung sehr verschärft. Diese Art der Steigerung der Dosen kann als ein Resultat langer Beobachtung im großen und ganzen für die meisten Fälle in Anwendung kommen.

Kurve 1. Das Stadium der Überempfindlichkeit ist durch die häufige Anwendung kleiner Tuberkulindosen künstlich verlängert. 23. V. bis 26. VII.

Die Überempfindlichkeit.

Würde man im Falle einer stärkeren Reaktion von einer Steigerung der Tuberkulindosis absehen und fortgesetzt kleine Dosen, Bruchteile eines Milligramms verabfolgen, so würde man in der Regel einen, dem beabsichtigten gerade entgegengesetzten Effekt erreichen. In Fällen, in denen man stärkere Reaktionen zu vermeiden wünscht, pflegte man eine Steigerung zu unterlassen und immer nur geringe Dosen zu geben; der Effekt eines solchen Verfahrens sei an einer Kurve veranschaulicht. In dem einen Falle R. wurde die Behandlung derart eingeleitet, die Folge war ein mehr als zwei Monate dauerndes Stadium der Überempfindlichkeit und ein Zeitverlust von ungefähr drei Monaten. (S. Kurve 1.)

Die Erscheinuug, daß dieselbe Dosis, auf die der Patient vier Tage zuvor nur schwach oder gar nicht reagiert hatte, oft nach kurzer Zeit starke Allgemeinreaktionen hervorrufen kann, ist früher schon von einigen Autoren beschrieben und als Ausdruck der „kumulativen“ Wirkung bezeichnet worden. Die Möglichkeit, dieses veränderte Verhalten des Organismus auf eine Anhäufung und Retention von Tuberkulinsubstanzen zurückzuführen, hat Löwenstein unter gewichtigen Bedenken ausgeschlossen. Denn schon die Tatsache, daß die kleinen Tuberkulindosen eher zu einer „Anhäufung“ führen als die großen Tuberkulindosen, mußte die ernstesten Zweifel an der Richtigkeit dieser Auffassung erregen. Nun haben Löwenstein und Rappoport aber noch weiter die Beobachtung gemacht, daß diese erhöhte Empfänglichkeit des Organismus noch ein Jahr nach der Injektion von 5 mg bestehen kann, da kann wohl gewiß von keiner Retention und Kummulierung des Tuberkulins die Rede sein. Da am Tuberkulin nichts geändert wurde, kann die Ursache nur im Organismus liegen. Der Organismus ändert sich in seinem Verhalten gegen das Tuberkulin, dem Stadium der Unempfindlichkeit geht ein Stadium der Überempfindlichkeit voraus.

Auch hier besteht eine völlige Analogie mit den Befunden beim Tetanus- und Diphtheriegift. Ein äquilibriertes Toxin-Antitoxingemisch löst in einem schon einmal injizierten Tier eine Antitoxinbildung aus, während in einem normalen Tiere das injizierte Gemisch als neutral empfunden wird. (Paradoxe Phänomen nach Kretz.) Auch beim Diphtheriegift wirken wiederholte kleine Dosen viel giftiger, denn nach einer Angabe Behrings sinkt die Größe der einfach letalen Dosis des Diphtheriegiftes beim Meerschweinchen, sobald dieselbe fraktioniert in Einzeldosen, also in Bruchteilen der tödlichen Dosis gegeben wird. Auch durch die klassischen Versuche Ehrlichs über Ricinimmunität wissen wir, daß eine Resistenzvermehrung bei fortgesetzter Darreichung der gleichen Giftdosis nicht eintritt

Beim Tuberkulin liegen dieselben Verhältnisse vor, wiederholte kleine Dosen erhöhen nur die Empfänglichkeit des Organismus, ohne eine Immunität hervorzurufen, zur Erreichung einer Immunität ist eine Steigerung der Reize, hier der Tuberkulindosis notwendig.

Die Überempfindlichkeit tritt recht häufig im Verlaufe der Tuberkulinbehandlung ein, Löwenstein[551]) hat sie in 81 von 167 Fällen konstatiert; sie äußert sich entweder darin, daß auf eine Dosis, die früher reaktionslos vertragen wurde, eine Reaktion eintritt, oder dadurch, daß bei Verabreichung derselben Dosis die Intensität der Reaktion zunimmt. Häufig wird sie durch die diagnostische Injektion hervorgerufen und tritt bei der nächsten Injektion in Erscheinung. Wie lange diese Sensibilisierung des Organismus dauern kann, möge an einem der vielen Beispiele illustriert sein.

Patient A. L. erhält am 15. VII. 02 $^2/_{10}$ mg ohne Reaktion diagnostisch injiziert
„ 19. VII. 02 2,0 „ „ „ „ „
„ 22. VII. 02 5,0 „ Reaktion 39,0
„ 14. VII. 03 $^3/_{10}$ „ therapeutisch Reaktion 38.3.

Bei vorgeschrittenen Fällen tritt sie öfter bei großen Dosen ein; die Therapie besteht auch hier darin, daß man dem Organismus ausreichend Ruhe gönnt und dann durch Steigerung der Dosen einen ictus immunisatorius setzt, um über dieses Stadium hinauszukommen.

Im allgemeinen brauchen vorgeschrittene Fälle, absolut genommen, mehr Tuberkulin zur Erreichung einer Immunität als leichte Fälle aus der oben erwähnten Intoleranz bei großen Dosen. (Immunitätsquotient bei Löwenstein und Rappoport).

Am leichtesten läßt sich eine hohe Immunität bei in Ausheilung begriffenen Fällen erzielen, ja Bandelier[56]) geht so weit, auch die Prognose geheilt davon abhängig zu machen, daß die Patienten auf eine zweimalige Injektion von 10 mg nicht reagieren. Auch wir verfügen über einzelne derartige Fälle, die trotz nicht spezifischer Behandlung keine Reaktion mehr darboten.

Petruschky[694]) hat darauf aufmerksam gemacht, daß man den Patienten immer bei einer gewissen Immunität gegen Tuberkulin halten solle und empfiehlt dafür eine Tuberkulinbehandlung in Etappen von 3—7 Monaten, weil nach seiner reichen Erfahrung innerhalb dieser Zeit die Tuberkulinimmunität wesentlich zurückzugehen pflegt. Petruschky pflegt bei der Behandlung nicht über 100 mg hinauszugehen; in meiner Praxis ist mir die Dauer der Immunität immer länger erschienen; so hat eine Patientin Sch., welche vor drei Jahren spezifisch behandelt wurde, jetzt selbst auf eine Dosis von 100 mg keine Reaktion gezeigt. Gewiß ist hier eine Verallgemeinerung nicht zulässig, sondern die früher erreichte Tuberkulinimmunität und der Krankheitsprozeß sind hier von ausschlaggebendem Einfluß.

Verlauf der Reaktion.

Das Bild der Reaktion stimmt im wesentlichen mit dem Reaktionsbild der diagnostischen Injektion überein, nur folgende Punkte können als different hervorgehoben werden:

Die Reaktion tritt innerhalb einer kurzen Zeit auf, bei Dosen von 3—20 mg oft schon nach 8 Stunden, bei Dosen über 50 mg schon nach 4 Stunden.

Die Reaktion ist bei gleicher Dosis intensiver, sowohl die Allgemeinerscheinungen als die lokale Reaktion.

Die Reaktion läuft schneller ab; sehr häufig tritt sie bei hohen Dosen schon 4 Stunden nach der Injektion auf und ist nach weiteren 8 Stunden fast völlig abgelaufen.

In der Regel geht die lokale Reaktion der allgemeinen voraus, wie sich bei äußeren Tuberkulosen beobachten läßt.

Unter gewissen Umständen ist man gezwungen, die Tuberkulinbehandlung abzubrechen; dafür, daß für eine Tuberkulinbehandlung der Patient nicht geeignet ist, gibt es gewisse Anzeichen, bei deren Auftreten am besten eine längere Pause in der Behandlung am Platze ist; dazu gehören Temperatursteigerungen mit großen Tagesausschlägen, eine dauernde Gewichtsabnahme, Störungen von seiten des Herzens, welche in der Regel rein funktioneller Natur sind. Neigung zu Blutungen bildet für uns keine eigentliche Kontraindikation, sondern hier wird das Prinzip, Reaktionen zu vermeiden, nur strenger durchgeführt.

Häufig ist man gezwungen, recht große Intervalle zwischen den einzelnen Injektionen einzuschieben, um starke Reaktionen zu umgehen. Denn diese starken Allgemeinreaktionen sind eine starke Anstrengung für den erkrankten Organismus und doch nicht notwendig für das Erreichen einer Immunität. Da man einerseits reichlich Gelegenheit hat, zu beobachten, daß trotz sehr häufiger Reaktion der Immunitäts-

grad nicht steigt, andererseits das Eintreten einer hohen Immunität ohne die geringste Fieberbewegung erfolgen kann, kann ein Zweifel über die Bedeutungslosigkeit des Fiebers für das Zustandekommen einer Immunität **nicht** mehr berechtigt erscheinen.

Rückwirkung der Tuberkulinimmunität auf den tuberkulösen Organismus.

Mit dem Einsetzen einer sich steigernden Widerstandsfähigkeit gegen Tuberkulin vollzieht sich im tuberkulösen Organismus eine allmähliche Änderung seines Verhaltens gegenüber den Tuberkelbazillen; bis jetzt sind uns folgende Symptome dafür bekannt.

I. Robert Koch hatte schon darauf aufmerksam gemacht, daß sich im Verlaufe der Immunisierung die Agglutinationskraft des Blutes für Tuberkelbazillen zu vermehren pflegt, Rumpf und Guignard [778]), Möller und Kayserling [613]) haben bei ihren diesbezüglichen Untersuchungen die gleiche Beobachtung gemacht; Verfasser hat bei mit Alt-Tuberkulin behandelten Personen nur eine sehr geringe Titreerhöhung des Blutes finden können, sowohl bei Verwendung der Arloing-Courmontschen [22]) Kultur als des Kochschen Präparates für Agglutinationszwecke hielten sich die erzielten Werte in bescheidenen Grenzen (1:10—1—20); die mit Bazillenemulsion (Neu-Tuberkulin) behandelten Patienten besaßen in ihrem Blute weit mehr agglutinierende Substanzen; auch Bandelier [53]) beobachtete hier recht hohe Titres, so waren Titres von 1:500 durchaus nicht selten. Durch die Untersuchungen der letzten Jahre hat sich nun herausgestellt, daß die agglutinierenden Substanzen zwar vielleicht parallel sich bilden, aber durchaus nicht identisch sind mit den wirksamen Abwehrstoffen des Organismus, deshalb kann der Gehalt eines Serums an Agglutininen auch nicht mehr als der zahlenmäßige Ausdruck der Immunität gelten. Gerade bei der Tuberkulose ist der Nachweis leicht, denn es gelingt ohne weiteres durch entsprechende Vorbehandlung, ein Serum zu gewinnen, daß im Verhältnis 1:5000 Tuberkelbazillen agglutiniert, ohne die geringste Schutzkraft zu besitzen.

II. Eine zweite Methode ist gegenwärtig die in England ungemein verbreitete Bestimmung des Opsoninindex nach Wright*). Das Serum des mit Erfolg spezifisch behandelten Patienten unterstützt die Aufnahme der Tuberkelbazillen in vitro seitens der Leukocyten nachdrücklicher als das Serum eines gesunden Menschen. Nun haben Wright [960]), Bulloch [140]) und andere Autoren die Schwankungen des Opsonischen Index für eine Richtschnur bei therapeutischer Anwendung von Neu-Tuberkulin erklärt; denn nach jeder Infektion von Neu-Tuberkulin soll die Zahl der die Phagocytose befördernden Substanzen im Serum abnehmen, wie wenn durch die injizierte Bazillensubstanz gewissermaßen ein Teil der Normal-Opsonine gebunden würde.

Es muß das Abklingen dieser „negativen Phase" abgewartet werden, bevor die nächste Injektion vorgenommen wird.

Für die Bestimmung des „Opsonischen Index" hat Wright folgende Technik ausgearbeitet: Das Serum des Patienten und das Serum eines Gesunden zur Kontrolle wird mit menschlichen Blutleukocyten gemischt und dieser Mischung eine gleiche Menge fein emulsionierter Tuberkel-

*) Siehe II. Band: Levaditi, Opsonine.

bazillen zugesetzt. Die Blutleukocyten gewinnt man durch Aufsaugen (und sofortiges Zentrifugieren) eines Bluttropfen in ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefülltes Kapillarröhrchen. Der physiologischen Kochsalzlösung sind vorher zur Verhütung der Gerinnung einige Tropfen einer 0,5 %igen Natriumzitratlösung zuzusetzen. Zentrifugiert man das Blut in dem Röhrchen ab, so findet man in der Schicht über den roten Blutkörperchen sehr viele Leukocyten. Nach dem Vermischen gleicher Teile Serum, Leukocytenflüssigkeit, Bazillenaufschwemmung kommt das Röhrchen auf 20 Minuten in den Brutschrank.

Dann bestimmt man die Durchschnittszahl der von einem Leukocyten aufgenommenen Bazillen bei beiden Proben. Den Quotienten aus den bei Gesundeu und Kranken gefundenen Werten nennt Wright den „Opsonischen Index".

Allerdings muß hier hervorgehoben werden, daß gerade bei der Tuberkulose die Phagocyten in vitro sich ganz anders verhalten als im Organismus, siehe Löwenstein[549]). Es scheint auch in diesem Punkt eine gewisse Analogie mit dem Milzbrand zu bestehen, denn auch Milzbrandbazillen werden in vitro von Meerschweinchenleukocyten aufgenommen, während innerhalb des Meerschweinchenkörper nur sehr selten phagocytierte Milzbrandbazillen zu finden sind.

III. In jüngster Zeit wurde von Wassermann und Bruck eine Methode publiziert, welche die Anwesenheit der im Blute vorhandenen Antikörper zu bestimmen versucht. Diese Forscher hatten „vor einiger Zeit im Anschluß an Arbeiten von Bordet, Gengou, Moreschi, Neisser und Sachs gezeigt, daß mit Hilfe der Komplementablenkung der Nachweis minimaler Quantitäten gelöster Bakteriensubstanzen und andererseits ihrer entsprechenden Antikörper gelingt". Die Technik ist eine durchaus einfache und besteht darin, daß man Antigen und Antikörper, hier Tuberkulin und Serum der Patienten mischt in abgestuften Mengen und 0,2 ccm normalen, frischen Meerschweinchenserums zufügt. Nach einstündigem Verweilen bei 37° wird diese Mischung auf ihren Gehalt an Komplement geprüft, indem man noch ein durch Erwärmen inaktiviertes Immunserum, dessen Lösungswert man vorher für die betreffenden Erythrocyten bestimmt hat, in der doppelt lösenden Dosis und noch eine Quantität der betreffenden Erythrocyten zusetzt. Sind im zu untersuchenden Serum Antituberkuline enthalten, so verbinden sie sich mit dem Tuberkulin, durch diese Bindung erhält die spezifische Substanz im Serum oder im Tuberkulin oder die neu entstandene Verbindung eine erhöhte Reaktionsfähigkeit, etwa wie naszierender Sauer- oder Wasserstoff ebenfalls eine stärkere Aggressivität entfaltet, und reißt das Komplement an sich, infolgedessen bleibt die Lösung der zugesetzten roten Blutkörperchen aus, da der zugesetzte Immunkörper kein Komplement mehr vorfindet.

Vor allem konnten Wassermann und Bruck[937]) den Nachweis führen, daß im tuberkulösen Organismus auch bereits Antituberkulin oder wenigstens ein Stoff, der sich mit Tuberkulin verbinde, vorhanden sein müsse, allerdings nicht frei im Blute, sondern in den tuberkulösen Organen selbst. Auf dem umgekehrten Wege gelang auch der Nachweis von Tuberkulinstoffen in tuberkulösen Organen, welche sich mit dem Tuberkelbazillen agglutinierenden Serum der Höchster Farbwerke verbanden. Durch diese Entdeckungen fällt jeder Einwand, der bisher gegen die Spezifität des Alt-Tuberkulin erhoben worden ist.

Mit dieser Methodik konnten WASSERMANN und BRUCK[937]) daran gehen, auch im Blute tuberkulöser Menschen Antituberkuline aufzusuchen. Bei 13 nicht spezifisch behandelten war es nicht möglich, Antituberkuline im Blut aufzufinden, dagegen gestaltete sich der Nachweis von Antikörpern im Blute spezifisch behandelter Patienten sehr leicht; schon nach der diagnostischen Injektion waren sie nachzuweisen, und zwar traten bei Behandlung mit Alt-Tuberkulin auch Antikörper auf, welche sich mit Bazillenemulsion vereinigen konnten. Meine eigenen Versuche über die Brauchbarkeit dieser Methode in der Praxis sind noch nicht abgeschlossen. Von anderer Seite (WEIL, MORGENROTH und RABINOWITSCH) sind gegen diese Arbeiten Widersprüche erhoben worden.

IV. Ist einmal eine Immunität gegen größere Dosen Tuberkulin erreicht, so pflegt sich auch das ganze Krankheitsbild zu ändern insofern, als früher vorhandene toxische Zustände verschwinden, ja das Krankheitsgefühl verloren geht, trotzdem der Auswurf noch jahrelang Tuberkelbazillen enthält. Es macht den Eindruck, wie wenn die Bazillen ihre Virulenz völlig eingebüßt hätten und zu einfachen Parasiten herabgedrückt worden wären; möglich daß es sich hier um eine Immunität handelt, wie sie auch beim Milzbrand und bei den Trypanosomen-Erkrankungen vorkommt, denn auch hier finden sich noch im Körper der immunen Tiere vollvirulente Parasiten.

V. Nach einer gewissen, bei den einzelnen Patienten völlig verschiedenen Zeit der spezifischen Behandlung bemerkt man im Sputum bei sorgfältiger Untersuchung hie und da Tuberkelbazillen in Zellen eingeschlossen, und zwar in der großen Mehrzahl der Fälle in mehrkernigen Leukocyten. Oft liegen 3—5—8 Tuberkelbazillen zwischen den Kernen eines Leukocyten im Protoplasma, oft völlig intakt; in der Regel sehen diese eingeschlossenen Bazillen bedeutend dünner und schlanker, oft stark gekörnt aus; manchmal sieht man überhaupt nur kleine rote Kügelchen oder Splitterchen von Bazillen innerhalb der Zellen. In manchen Fällen ist die intracelluläre Lagerung der Tuberkelbazillen verbunden mit einem allmählichen Verschwinden der Bazillen, die Bazillen können aber oft noch drei bis fünf Jahre im Auswurf nachgewiesen werden; in solchem Auswurf begegnet man der intracellularen Lagerung und der daraus resultierenden Degenerationsformen sehr häufig. Trotzdem bei jedem Zerfall eines Tuberkels die Möglichkeit gegeben ist, daß Leukocyten Tuberkelbazillen aufnehmen, beobachten wir die intracellulare Lagerung nur bei einer kleinen, bestimmten Gruppe von Fällen nämlich in erster Linie bei langer Zeit spezifisch behandelten Fällen und in zweiter Linie bei Fällen mit einem ausgesprochen chronischen Verlaufe. Die Tatsache, daß wir durch eine lang dauernde spezifische Behandlung die Phagocytose erzwingen können, weist darauf hin, daß die intracellulare Lagerung im Zusammenhang steht mit immunisatorischen Vorgängen, mögen dieselben nun künstlich durch die spezifische Behandlung oder auf natürlichem Wege durch Resorption eitrig zerfallenden Gewebsmaterials einschließlich der Bazillen hervorgerufen werden.

Weitere Untersuchungen des tuberkulösen Eiter müssen ergeben, welche klinische Bedeutung die Phagocytose im tuberkulösen Herd besitzt, erst dann wird sich entscheiden lassen, ob die Bestimmung der Phagocytose befördernden Substanzen des Serums den zugeschriebenen Wert verdient.

VI. Diese Beobachtung gewann noch an Bedeutung, als die schönen Untersuchungen Arneths[23, 24]) über das histologische Blutbild der Lungentuberkulose erschienen. Beim gesunden Erwachsenen verteilen sich die neutrophilen Leukocyten im Blute in folgender Weise:

Einkernige (mit rundem oder gebuchtetem Kern) . . .	5 %
Zwei Kerne oder Schleifenbildung	35 %
Drei Kerne	41 %
Vier Kerne	17 %
Fünf Kerne	2 %

Bedroht eine Infektion den geschwächten Organismus, so verschiebt sich das Verhältnis der Leukocyten insofern ganz bedeutend, als die weißen Blutkörperchen mit ein oder zwei Kernen gegenüber den drei- oder vier- oder mehrkernigen viel zahlreicher werden. Ein Fall von Lungentuberkulose, welcher einen tödlichen Ausgang hatte, sei hier aus dem Arnethschen Werk zitiert. Zählresultat 16 100:

Einkernige	46 %
Zweikernige	49 %
Dreikernige	5 %

Arneth beobachtete nun in einer größeren Reihe von Fällen, daß sich im Verlaufe einer erfolgreich durchgeführten Tuberkulinkur das normale Verhältnis zwischen den ein- und zweikernigen einerseits und den drei- und mehrkernigen Leukocyten andererseits wiederherstellte. Arneth empfiehlt daher mit gutem Recht, diese Methode der Blutuntersuchung noch bei der Stellung der Prognose heranzuziehen.

VII. Direkt Antituberkulin im Blute nachzuweisen haben Arloing und Löwenstein versucht; der letztere mischte größere Mengen Serum, 1—3 ccm, von Patienten, welche 1000 mg Tuberkulin ohne Reaktion vertragen hatten, mit 0,5 Alt-Tuberkulin und injizierte das Gemisch nach 30′ dauerndem Kontakt tuberkulös infizierten Meerschweinchen. Bei geringen Mengen von Serum 0,1, 0,5 und selbst 1,0 ccm trat der Tod nach 20 Stunden in allen vier untersuchten Fällen ein, während in zwei Fällen 2 bzw. 3 ccm des Serums der Tuberkulintod des Tieres ausblieb. Daraus geht hervor, daß diese direkte Methode zum Nachweis der Antituberkulinsubstanzen im Blute nicht geeignet ist.

Anatomische Veränderungen, welche durch die Tuberkulinimmunität hervorgerufen werden.

Die Wirkung des Tuberkulins auf tuberkulöse Herde ist schon oben beschrieben worden und läßt sich kurz dahin zusammenfassen, daß das Tuberkulin eine akute Entzündung in der Umgebung der Tuberkelknötchen, die Exsudation von serös-fibrinösen Massen und eine lebhafte Wanderung der Leukocyten um und vor allem in die Knötchen der tuberkulösen Herde hervorruft.

Kromeyer[495, 496]), Ziegler[964]), Riehl[751]), Klebs[439]), Hansemann[341]) Ribbert[749]) sind sich darüber einig, daß diese durch das Tuberkulin provozierten Heilungsvorgänge an und für sich nichts Charakteristisches sind, sondern auch im Verlaufe von Spontanheilung tuberkulöser Herde zur Beobachtung kommen. Die regressiven Metamorphosen, denen das Tuberkelknötchen durch den Einfluß der spezifischen Behandlung unterliegt, scheinen in der Mehrzahl zu fibrösen

Knötchen zu führen; aber in einer immer noch bedeutenden Anzahl scheinen die regressiven Prozesse auch mit der Bildung eines käsig-fibrösen Tuberkels Halt machen zu können. Hier kommt es zu einer bindegewebigen Induration des erkrankten Gebietes. Doch unterscheidet sich dieses Gewebe von gewöhnlichem Narbengewebe in einem wesentlichen Punkte. Das Gewebe enthält häufig noch käsige Herde, so daß von diesen aus sich immer wieder neue Entzündungsprozesse entwickeln können, selbst Riesenzellen und gute erhaltene Tuberkel sind noch häufig aufzufinden. Damit erklärt sich auch das Auftreten von Rezidiven nach dem Abschluß einer Tuberkulinkur, wie es öfter von DOUTRELEPONT[211]) geschildert wurde. Der Ausgang in feste Verkäsung ist bei spezifischer Behandlung nicht bekannt, dagegen soll eine weiche „Verkäsung, Zerfall mit Verflüssigung" öfter zu beobachten gewesen sein, als 1890 mit großen Dosen Tuberkulin schwer erkrankte Personen behandelt wurden. Gewiß ist es von einschneidender Bedeutung, in welchem Stadium des Tuberkelknötchens die Tuberkulinwirkung einsetzt. ZIEGLER[964]) hat sich wiederholt geäußert, daß durch das Tuberkulin zwar keine besonders anatomisch gekenntzeichneten Heilungsprozesse zustande kommen, aber die Heilungsvorgänge seien häufiger und liefen in einem beschleunigten Tempo ab. Diese Ansicht stimmt mit einer ganzen Reihe von Beobachtungen verschiedener Autoren überein.

Bei spezifisch behandelten Patienten scheinen die Tuberkel am meisten einer fibrösen Entartung zuzuneigen; ist die Verkäsung bereits eingetreten, so werden durch die starken Reaktionen des umgebenden Gewebes die käsigen Herde scharf abgegrenzt und möglichst für die Abstoßung flüssig gemacht — daher der so stark vermehrte Auswurf nach jeder Injektion — das sequestrierte Gewebe ausgestoßen und durch Narbengewebe ersetzt.

Im natürlichen Verlaufe der Tuberkulose besitzen diese Narben noch charakteristische Stellen, zunächst Käseherde, welche zum Teil verkalkt sein können, dann aber auch wucherndes Granulationsgewebe, welche Tuberkel und Tuberkelbazillen enthalten können. Es handelt sich danach meist nicht um eine vollständige Heilung, sondern um einen Stillstand der Erkrankung, der ebenso wie die Heilung in den verschiedenen Stadien der örtlichen Erkrankung erfolgen kann.

Leider verfügen wir nicht über ein derart reiches Material von Obduktionen spezifisch behandelter Tuberkulöser, um die sich ergebenden Fragen entsprechend studieren zu können. Nur PETRUSCHKY[692]) hatte im KOCHschen Institute Gelegenheit, derartige Beobachtungen zu sammeln. In einer 1901 (Leipzig, Leineweber) erschienenen Arbeit hob er ganz besonders hervor, daß ihm bei keiner der spezifisch behandelten Tuberkulosen eine Verkalkung eines tuberkulösen Herdes begegnet sei, sondern das erkrankte Lungengewebe eines derartigen vorgeschrittenen Falles sei völlig durch derbes, festes Narbengewebe ersetzt gewesen, ohne daß in diesen Schwielen auch nur eine Spur einer Kalkeinlagerung zu finden war. Das Tuberkulin bewirkt also dort, wo die tuberkulösen Veränderungen noch frisch sind, vorzüglich eine Granulation und Narbenbildung; dort, wo die Veränderungen vorgeschritten sind und Käseherde vorhanden sind, wird die Entfernung derselben begünstigt.

Heilresultate.

Aus dem Obigen geht zur Genüge hervor, zu welchen Ansprüchen wir bei Heilung der Tuberkulose berechtigt sind. Eine Restitutio ad integrum dürfen wir nicht erwarten.

Dafür, daß aber die Heilung unter dem Einflusse des Alt-Tuberkulins viel leichter zustande kommt als ohne spezifische Behandlung, haben sich eine Reihe von Tuberkuloseärzten ausgesprochen, wie Petruschky, Möller, Turban, Aufrecht, Bandelier, Spengler, Hager, Götsch, Kremser, Löwenstein und Rappoport, Kartulis, Holdheim, Röpke, Adler, Brecke, Philippi, Schnöller, Pickert, Krämer, Krause.

Besonders hervorzuheben ist, daß die wohltätige Wirkung der Tuberkulinimmunität nach 2—4 Monaten erst recht eklatant wird, dann pflegt noch immer die Besserung weiter fortzuschreiten, und das Verschwinden der Tuberkelbazillen tritt oft erst 6, manchmal 8 Monate nach Abschluß der Tuberkulinkur auf. Die Resultate sind auch insofern höher einzuschätzen, als von einer Zeit ab, welche ungefähr der obengenannten entspricht, Rezidive zu den Seltenheiten gehören, während bei nicht spezifischer Behandlung Rezidive leider recht häufig sind.

Bei spezifisch behandelten Tuberkulösen sehen wir dort die besten Resultate, wo die Reaktion des Körpers zu einer **Ausscheidung** der erkrankten Gewebsbestandteile führt, dort, wo keine Möglichkeit für die Entfernung der Tuberkelbazillen gegeben ist, sind die Bedingungen für eine gänzliche Heilung nicht so günstig wie im ersten Falle. Denn da die Tuberkelbazillen durch das Tuberkulin selbst in vitro nicht im geringsten beeinflußt werden und andererseits der Leukocytenapparat gänzlich zu versagen pflegt, soweit es sich um die Abtötung des Tuberkelbazillus handelt, so ist dort, wo das sequestrierte Gewebe nicht wirklich aus dem Körper entfernt wird, stets die Gelegenheit vorhanden, daß sich von einer solchen Stelle aus durch irgend ein Moment ein Rezidiv entwickeln kann. Deshalb kann man nur dem Urteil beistimmen, das Doutrelepont[211]) im September 1891 ausgesprochen hat: „Klinische Beobachtung und histologische Untersuchung bestätigen den günstigen Einfluß des Tuberkulins auf die Hauttuberkulose, aber auch, daß dasselbe als Radikalheilmittel nicht anerkannt werden kann. Wir müssen daher seine Wirkung durch die bis dahin uns als hilfreich bekannten Verfahren unterstützen. Koch hat ja selbst die chirurgische Nachhilfe empfohlen." Das Tuberkulin besorgt die Umgrenzung und Abstoßung des tuberkulösen Herdes aus seiner Umgebung; es ist Sache des ärztlichen Eingreifens, das abgestoßene noch infektionstüchtige Gewebe aus dem Organismus herauszuschaffen; deshalb wird es sich empfehlen, bei Lungenkranken im Verlaufe der spezifischen Behandlung nicht den Hustenreiz zu unterdrücken, sondern zu steigern, bei Lupösen das demarkierte Gewebe entsprechend den vorhandenen Mitteln zu behandeln, bei chirurgisch Erkrankten den Organismus vom aufgesammelten Eiter zu befreien.

Andere Tuberkulinpräparate.

Da es Robert Koch nicht geglückt war, eine Immunität der Versuchstiere durch Alt-Tuberkulin zu erzielen, arbeitete er fortgesetzt daran, diejenigen Substanzen der Tuberkelbazillen, welche für das Zustandekommen einer Immunität wichtig sein könnten, von den giftigen Bestandteilen der Tuberkelbazillen zu trennen. Für eine Verwendung kommen

in der menschlichen Praxis die abgetöteten Bazillen nicht in Betracht, weil sie stets — sei die Abtötung durch Hitze, Chemikalien, Austrocknung usw. erfolgt — intravenös injiziert, Knötchen in der Lunge, subkutan injiziert Abszesse erzeugen. (Siehe auch KROMPECHER[497]), STERNBERG[881]).

Das Bestreben, die schädlichen Stoffe auszuschalten und die Tuberkelbazillen resorbierbar zu machen, führte ROBERT KOCH zuerst dazu, die Tuberkelbazillen durch eine $^1/_{10}$ Normalnatronlauge zu mazerieren; die in Lösung gegangenen Stoffe enthielten aber auch die Substanzen, welche zur Bildung von Abszessen führten.

Deshalb suchte ROBERT KOCH nach einem anderen Weg, die Tuberkelbazillen aufzuschließen, um aus ihnen dasjenige Antigen frei zu machen, das für eine erfolgreiche Immunisation notwendig ist. Im Jahre 1897 publizierte er seine Versuche über TR.

Das TR wurde folgendermaßen hergestellt: Junge, im Vakuum scharf getrocknete Kulturen wurden zuerst im Achatmörser, später in Kugelmühlen möglichst fein zerrieben, so daß nur noch möglichst wenig Bazillen erhalten blieben. Das Bazillenpulver wurde dann mit destilliertem Wasser längere Zeit ausgeschüttelt und hierauf die trübe Emulsion scharf zentrifugiert. Dadurch erhielt man einen Bodensatz, der die in Wasser nicht löslichen und spezifischen schweren Bestandteile der Tuberkelbazillen enthält, TR und eine leicht milchig getrübte, opaleszierende Flüssigkeit, welche über dem Bodensatz steht, TO; TO enthält vor allem die in Wasser leicht löslichen und spezifisch leichten Bestandteile der Tuberkelbazillen.

Die Anwendung des TR fand bei weitem nicht die Ausbreitung in der Praxis, wie sie das Alt-Tuberkulin gefunden hatte, speziell bei Lungentuberkulose sind nur wenige diesbezügliche Arbeiten bekannt geworden (SPENGLER[868]), SCHRÖDER[823]), SPIEGEL[873]), PETERS[682]), STEMPEL[878]), STARK[875]), REINHOLD[739]), HUBER[380]), RAUDE[735])). Übereinstimmend wird von diesen Autoren berichtet, daß im Verlaufe der Immunisation durchaus keine störenden Schädigungen und die Reaktionen in der Regel bei weitem nicht so heftig auftreten wie beim Alttuberkulin. Auch klingt die Reaktion viel rascher ab; gute Erfolge haben STARK[875]), PETERS[682]) und STEMPEL[878]) aufzuweisen. Möglich, daß auch die Publikationen nur einen kleinen Teil der Versuche mit TR wiedergeben; jedenfalls sind in der inneren Medizin nicht genügende Erfahrungen gesammelt worden, um ein sicheres Urteil über den therapeutischen Wert des TR zu ermöglichen.

Dagegen verdanken wir der zielbewußten Arbeit von DOUTRELEPONT und seinen Schülern, von v. HIPPEL[980]) und seinen Schülern SCHIECK[804]), DÖRSCHLAG[204]), PICK[707]) und seiner Schule (WÄLSCH[936]), BORGES) eine Reihe wertvoller Mitteilungen; gerade die Fälle, bei denen sich die Tuberkulose der Haut oder Iris entwickelt, haben für eine objektive Beurteilung den größten Wert, da hier die Einwirkung der spezifischen Behandlung direkt exakt beobachtet werden kann. So berichten NAPP und GROUVEN[627]) „über die Resultate der TR-Behandlung in der Bonner Hautklinik" auf Grund eines Materials von 51 Lupösen, und sie kommen zu folgendem Schlusse: „Jedenfalls ist das TR wohl berechtigt, bei gleichzeitig nebenher gehender rationeller lokaler Behandlung als unterstützendes Moment in Anwendung gebracht zu werden und einen hervorragenden Platz unter den Mitteln zur Bekämpfung der Hauttuberkulose zu behaupten, wenn es auch nach unseren

und von anderen gemachten Beobachtungen nicht allein eine radikale und definitive Heilung bringen kann."

Überraschend günstige Erfolge wurden von v. Hippel und seiner Schule berichtet, speziell über den Einfluß der spezifischen Behandlung auf den Verlauf der Iristuberkulose. Schon durch Alt-Tuberkulin waren ganz überraschende Wendungen im Verlaufe dieser Affektion durch v. Hippel beobachtet worden; den Einfluß des TR schätzte v. Hippel aber weit höher ein, wie die Arbeiten seiner Schüler beweisen. Schick[800]) hat in einer sehr gründlichen Arbeit, welche auch über den Verlauf von 121 nicht spezifisch behandelten Iristuberkulosen berichtet, wiederholt betont, „daß das Mittel von größtem Werte ist". Auch in jüngster Zeit sind wieder günstige Erfolge berichtet worden (v. Hippel[980]), Elsässer[228]), Dörschlag[204])).

Auch in der Chirurgie, die einer spezifischen Behandlung der Tuberkulose jede Berechtigung absprach, hat die Tuberkulinbehandlung wieder Eingang gefunden. So berichtet John Pardoe[673]) über 21 Fälle von Blasen- und Nierentuberkulose, die er angesichts der schlechten Resultate anderer Methoden wieder mit TR behandelt hatte. Das Ergebnis war ein vorzügliches, da fünf Fälle auch nach längerer Zeit gänzlich geheilt, vier wesentlich gebessert wurden; bei sechs Patienten blieben die Erscheinungen unbeeinflußt, bei sechs Patienten trat innerhalb der nächsten beiden Jahre der Tod ein. Angesichts der traurigen Erfolge unserer sonstigen Therapie bei derartigen Lokalisationen der Tuberkulose gewiß ein Resultat, das zu weiterem Studium und neuen Versuchen aufmuntert. Pardoe vermied jede starke Reaktion und sah auch davon ab, eine Immunität gegen hohe Dosen erzwingen zu wollen.

Nach der heute üblichen Methodik wird eine Verdünnung des TR in derselben Weise, wie es bereits beim Alt-Tuberkulin geschildert wurde, vorgenommen. Begonnen wird in der Regel mit einer Dosis von $^1/_{500}$ mg und dann mit der Dosis derart gestiegen, daß in Zwischenräumen von anfangs 4, bei größeren Dosen dann von 8 Tagen beifolgende:

$^1/_{500}$, $^3/_{500}$, $^5/_{500}$, $^2/_{100}$, $^3/_{100}$, $^4/_{100}$, $^5/_{100}$, $^6/_{100}$, $^1/_{10}$, $^2/_{10}$, $^3/_{10}$, $^4/_{10}$, $^5/_{10}$, $^6/_{10}$,
1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 mg

Mengen verabreicht werden.

Als Schlußdosis kann 10 mg angesehen werden; Koch hat seinerzeit vorgeschlagen, noch höher mit der Dosis zu steigen; in der Tat sind auch nach der Injektion von 10 mg TR bei keinem Patienten beunruhigende Erscheinungen beobachtet worden.

Viel glatter und rascher verläuft die Immunisierung mit TR, wenn der Patient schon vorher eine gewisse Immunität gegen Alt-Tuberkulin erworben hat. Wie Löwenstein und Rappaport[557]) schon hervorgehoben haben, besteht eine weitgehende Analogie zwischen den einzelnen Kochschen Tuberkulinpräparaten, die auch darin in Erscheinung tritt, daß sowohl eine Immunität als eine Überempfindlichkeit für alle drei Tuberkulinpräparate zu Recht besteht, auch wenn dieser Zustand nur durch **ein** Präparat erzeugt wurde.

Besonders auffallend war die günstige Einwirkung einer Alt-Tuberkulin-Immunität auf den Verlauf einer Immunisierung mit dem

Neu-Tuberkulin oder der Bazillenemulsion.

Bei der Anfertigung dieses Präparates war Koch von den Gedanken geleitet, daß angesichts des weitgehenden Parallelismus zwischen

I.

Alt Tuberkulin 50,0 — Alt Tuberkulin 70,0 — Bazillen Emulsion subcut. 0,01 — 0,02 — 0,03 — 0,05 — 0,06 — 0,07 — 0,1 — 0,15 — 0,2 — 0,3 — 0,5 — 0,7 — 1,0 — 1,5 — Tub.Reat. — 1,5

Tuberkelbazillen spärlich

Tuberkelbazillen

II.

1,5 — 1,5 — 2,0 — Tub.R. — 2,0 — T.R. — 2,0 — 1,0 — 1,5 — 2,0 — 2,5 — 3,0 — T.R.

reichlich

Tuberkelbazillen positiv

Tuberkelbazillen +

III.

0,5 — 0,75 — Bazillen Emulsion intravenös 0,0005 — 0,00075 — 0,001 — 0,0015 T.R. — 0,0015 — 0,002 — 0,0025 — 0,003 — 0,004 — 0,003 — 0,004 Tub.Reakt.

(Urlaub)

Tuberkelbazillen 0

Tuberkelbazillen 0

Kurve 2. Immunisationskurve eines Patienten, welcher zuerst mit Alt-Tuberkulin, dann mit Neu-Tuberkulin subkutan und schließlich mit Neu-Tuberkulin intravenös behandelt wurde.

Agglutininen und Schutzkörpern auch die Entstehungsweise dieser Körper dieselbe sein könne. In dem Agglutiningehalt des Blutes wäre dann ein einfaches Mittel gegeben, um den Grad der durch die spezifische Behandlung erzielten Immunität festzustellen. Da nun die höchsten Werte für die Agglutination bei Injektion der Gesamtmasse der Tuberkelbazillen beobachtet wurden, so griff Koch auf diese Methode zurück. „Die Bazillenmasse muß aber, um resorbiert werden zu können, ... zu feinstem Staub verarbeitet sein. Nur durch diese mechanische Aufschließung der Tuberkelbazillen ist ihre Resorptionsfähigkeit zu erreichen, dieselbe bildet gewissermaßen den Schlüssel zu allen Methoden der Immunisierung gegen Tuberkelbazillen."

Dementsprechend ist das Neu-Tuberkulin eine Aufschwemmung der durch Kugelmühlen auf das feinste gemahlenen Tuberkelbazillen in Wasser, dem 50% Glyzerin zur Erhöhung der Haltbarkeit zugesetzt ist. Überdies wird das Präparat von den Höchster Farbwerken immer bei jeder Bestellung frisch hergestellt. Ein Kubikzentimeter enthält 5,0 mg der im getrockneten Zustande pulverisierten Tuberkelbazillen.

Koch empfiehlt, die Injektion mit 0,0025 mg Bazillensubstanz zu beginnen; die Herstellung der dazu nötigen Verdünnungen geschieht auf dieselbe Weise wie beim Alt-Tuberkulin. Die ersten Injektionen können rasch hintereinander folgen, da in der Regel stärkere Reaktionen ausbleiben; nur in den Fällen, in denen durch eine vorausgehende diagnostische Injektion von Alt-Tuberkulin eine Überempfindlichkeit erzeugt wurde, beobachten wir auch Reaktionen bei Bruchteilen der hundertsten Teile eines Milligramms.

Die ersten Reaktionen pflegen bei Dosen aufzutreten, bei denen es sich um den 10. bis 100. Teil eines Milligramms handelt. Koch hat vorgeschlagen, die Immunisation erst dann als abgeschlossen zu betrachten, wenn der Patient 20 mg der Bazillensubstanz reaktionslos vertragen hat. Wir selbst haben nie mehr als 1 ccm der Bazillenemulsion, also 5,0 mg, injiziert und dabei vereinzelt starke Allgemeinerscheinungen beobachtet. Die Temperatur stieg zwar selten über 38,5°, aber der außerordentlich heftige Schüttelfrost, der ungefähr drei Stunden nach der Injektion einzutreten pflegte, die starken subjektiven Beschwerden, insbesondere Magenschmerzen, waren wohl Umstände, welche dagegen sprechen, höhere Dosen anzuwenden. In der Regel waren die Injektionen innerhalb 24 Stunden abgeklungen. Über ein Jahr haben wir intravenöse Injektionen (siehe Kurve 2) mit Neu-Tuberkulin gemacht und dabei keineswegs etwa höhere Reaktionen oder bedrohliche Allgemeinerscheinungen beobachtet; die Reaktionen erstreckten sich auf eine kürzere Zeit und hatten noch den ganz besonderen Vorteil, daß die Bildung von Infiltraten vermieden wurde; gerade die Infiltrate sind bei dem Neu-Tuberkulin besonders lästig, da sie den Umfang eines Fünfmarkstückes überschreiten können und auch lange Zeit zu ihrer Resorption beanspruchen.

Zahlenmäßig verfolgt wurde dieses Verhalten bei einem Fall von Blasentuberkulose, den Rorert Koch uns zur Behandlung mit Neu-Tuberkulin zugewiesen hatte. Die ersten beiden Injektionen, welche unter die Bauchhaut erfolgt waren, führten zu walnußgroßen Infiltraten, welche sich sehr langsam verkleinerten und erst nach vier Wochen verschwunden waren. Die späteren Injektionen wurden unter die Haut des Oberschenkels gemacht, in der Voraussetzung, daß hier dnrch die straffen Faszien die Entstehung von Infiltraten erschwert werde. In der Tat dauerte die Resorption des talergroßen Infiltrates durchschnittlich nur

18 Tage. Im weiteren Verlaufe der Immunisierung stieg offenbar die Resorptionsfähigkeit, denn talergroße Infiltrate, die durch Injektion von stärkeren Dosen entstehen, verschwanden schließlich in sechs Tagen.

Die Art der Steigerung der Dosen ist vorwiegend von dem Verhalten des Patienten abhängig, im allgemeinen wird es nicht zu Störungen kommen, wenn man zwischen die einzelnen Injektionen acht Tage lange Ruhepausen einschiebt; die Steigerung kann ungefähr in der Weise vor sich gehen, wie sie in der angeschlossenen Temperaturtabelle ersichtlich ist.

Eine schnellere Steigerung müßte ungefähr nach folgendem Vorschlag verlaufen.

1.	V.	0,0025	3.	VI.	0,05	1.	VIII.	1,0
5.	V.	0,005	10.	VI.	0,1	11.	VIII.	2,0
10.	V.	0,01	17.	VI.	0,2	18.	VIII.	2,0
16.	V.	0,02	28.	VI.	0,3	25.	VIII.	3,0
22.	V.	0,03	5.	VII.	0,4	2.	IX.	4,0
28.	V.	0,04	12.	VII.	0,5	9.	IX.	5,0
			19.	VII.	0,6	1.	X.	5,0

Im Jahre 1903 berichte Bandelier[53]) über 37 mit Neu-Tuberkulin behandelte Fälle, unter denen „26 dem zweiten und 8 dem dritten Stadium nach Turban“ angehörten. „Von den 26 Patienten des zweiten Stadiums hatten 16 bazillenhaltiges Sputum. In sämtlichen Fällen wurden durch die Tuberkulinbehandlung die Tuberkelbazillen und bis auf einen Fall von begleitender Mischinfektion auch das Sputum vollständig beseitigt“. Auch bei den Patienten des dritten Stadiums beobachtete Bandelier günstige Erfolge; er faßt seine Resultate dahin zusammen, „daß bei ausreichend langer Behandlung auch noch ein erheblicher Prozentsatz dritter Stadien zur Heilung geführt werden kann“.

In der Tat hat Koch die Indikation zur Behandlung mit Neu-Tuberkulin auch auf leicht Fiebernde ausgedehnt. Koch[456]) selbst, Möller[612]), Bandelier[53]), Brecke[117]) haben gefunden, „daß bei fiebernden Phthisikern leichte und mittlere Temperatursteigerungen durch die Reaktionen günstig beeinflußt wurden. Zuerst trat ein Temperaturabfall nur vorübergehend vom dritten bis vierten Tage nach der Reaktion auf, also gerade in der Zeit, wo der Immunisierungsvorgang einsetzt. Die Temperatur blieb dann mehrere Tage niedrig, stieg aber allmählich wieder an. Wurde nun von neuem eine kräftige Reaktion hervorgerufen, dann fiel die Temperatur wieder, und zwar anhaltender als nach der vorhergehenden Reaktion. Durch fortgesetzte Reaktionen konnten derartige Temperatursteigerungen in solcher Weise dauernd beseitigt werden“.

Auch in 82 Fällen eigener Beobachtung ergaben sich Resultate, welche dafür sprechen, die Behandlung mit Neu-Tuberkulin im großen Umfange aufzunehmen. Ein besonderes Gewicht muß den Angaben von v. Hippel,[1068]) Dornbach[1029]) Elsässer[228]) beigelegt werden, die sich rückhaltlos für die Behandlung der Iristuberkulose mit Neu-Tuberkulin aussprechen.

In England hat man auf den Vorschlag Wrights davon abgesehen, die Dosen so zu steigern, sondern man geht mit der Dosis nicht über 0,01—0,05 mg Bazillensubstanz. Dort ist die Behandlung mit Neu-Tuberkulin unter dem Namen „Opsonic-Treatment“ außerordentlich populär geworden und wird in größtem Umfange auch bei chirurgischer Tuberkulose mit gutem Erfolge angewandt. In jüngster Zeit 1907 hat Birnbaum in Göttingen eine sehr interessante Arbeit über die Tuberkulinerfolge bei Urogenitaltuberkulose veröffentlicht. Die Resultate bei vier

Fällen von Adnextuberkulose, vier Fällen von Blasentuberkulose, 10 Fällen tuberkulöser Peritonitis sind außerordentlich günstig. Hoffentlich dauert es nicht zu lange, daß auch bei chirurgischer Tuberkulose die spezifische Behandlung mit Neu-Tuberkulin die gebührende Beachtung findet.

Koch hat sich wiederholt dahin geäußert, daß dem Neu-Tuberkulin unbedingt der Vorzug vor dem Alt-Tuberkulin einzuräumen sei. Auch theoretisch scheint die Behandlung mit Neu-Tuberkulin weit mehr gerechtfertigt, da ja im Neu-Tuberkulin alle Bestandteile des Tuberkelbazillus enthalten sind, während im Alt-Tuberkulin nur diejenigen Stoffe vorhanden sind, die durch das Extraktionsverfahren löslich gemacht werden.

Dennoch hat das Neu-Tuberkulin nur wenig Anhänger gefunden. Es ist schwer, dafür stichhaltige Gründe namhaft zu machen; es ist möglich, daß diejenigen Tuberkuloseärzte, welche mit Alt-Tuberkulin gearbeitet haben, dieses Mittel deshalb nicht aufgeben wollen, weil sie in der genauen Kenntnis seiner Anwendung eine Garantie für den überhaupt erreichbaren Heilerfolg erblicken, andrerseits mit den erzielten Erfolgen zufrieden sind.

In absehbarer Zeit dürfte die Behandlung mit Neu-Tuberkulin doch sich mehr Eingang in die Praxis verschafft haben.

Literatur.

1) Abraham, P. und Crookshank, E., Note on tubercular animals un du treatment with tuberculin. Pathol. Soc. Transact. 1891, Vol. XLII, pag. 343.
2) Ackermann, Th., Bericht über die Wirkung des Kochschen Heilmittels gegen Tuberkulose aus dem pathol. Institut in Halle a. S. Klinisches Jahrbuch 1891, Ergänzungsband.
3) Adler, Richard, Centralbl. f. Bakteriologie u. Parasitenkunde 1903, Bd. XXXIII, pag. 746.
4) Ders., Therapeutische und diagnostische Verwendung des Tuberkulins. Prager med. Wochenschr. 1903, Nr. 11.
5) Ders., Drei Tuberkulin-Todesfälle. Prager med. Wochenschr. 1904, Nr. 30, pag. 389.
6) Adrian, C., Bericht über die Resultate mit dem Kochschen Tuberkulin bei Lupus und Skrophuloderma. Archiv f. Dermatol. u. Syph. 1898, Bd. XLV, Heft 1.
7) Albrand, W., Erfahrungen über das Tuberkulin aus der Prof. Schölerschen Augenklinik in Berlin. Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde 1891, Bd. XXIX.
8) Ald, Deutsche med. Wochenschr. 1892, Bd. XVIII, Nr. 21.
9) Alexander, Über die Wirkung des Tuberkulins auf die Impftuberkulose des Kaninchenauges. Centralbl. f. prakt. Augenheilkunde 1891, Juni-Juliheft.
10) Alsberg, Bericht über 18 auf der chirurg. Abteil. des israelit. Krankenhauses in Hamburg mit dem Kochschen Verfahren behandelte Fälle. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Bd. XVIII, Nr. 2.
11) Amann, J., Der Einfluß der Kochschen Impfungen auf die Tuberkelbazillen im Sputum. Centralbl. f. Bakteriologie u. Parasitenk. 1891, Bd. X, Nr. 1.
12) Amrein, O., Beitrag zur Tuberkulinbehandlung der Lungentuberkulose. Beitr. z. Klinik der Tuberkulose 1905, Bd. IV, H. 5.
13) Anders, Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd. I, H. 2/3.
14) Anderson, The value tuberculin in diagnosis and treatment. Lancet 1900.
15) Ders., Some observations on the tuberculin treatment. Glasgow Med. Journal, Vol. I.
16) Angerer, O., Beobachtungen über das Kochsche Heilverfahren. Münchener med. Wochenschr. 1890, Nr. 49 u. 50.
17) Arendt, Über das Kochsche Heilverfahren gegen Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Bd. XVIII, Nr. 15.
18) Arloing, S. P., Journ. de physiol. et pathol. gén. 1903, Nr. 4. Ref. Centralbl. f. Bakt., Bd. XXXIV, pag. 585.
19) Ders., Leçon sur la tuberculose, pag. 278.

20) Arloing, S. u. Bancel, Comparaison de la tuberculine avec l'agent producteur de l'intoxication tuberculeux chez le malade. Journ. de Physiol. et de Pathol. gén. 1904, Nr. 3, pag. 497.
21) Arloing, Courmont u. Nicolas, Étude experimentale sur la tuberculine. Province méd. 1898, pag. 445.
22) Arloing, Rodet u. Courmont, Ann. univ. Lyon, Tome VI, pag. 81.
23) Arneth, J., Blutuntersuchungen bei der Tuberkulose der Lungen und bei der Tuberkulinkur. Sitzungsber. der phys.-med. Ges. Würzburg, 1905.
24) Ders., Die Lungenschwindsucht auf Grundlage klinischer u. experimenteller hämatologischer Untersuchungen (s. dort die andere Literatur). Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd. VII, pag. 309, 405, und Ambrosius Barth, Leipzig 1905.
25) Arning, Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
26) Ders., Wiener kl. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
27) Ders., In Strauß: La tuberculose et son bacille, Paris 1895.
28) Aroaz, Alfaro G., Ann. et Circ. méd. Argentins, 15. Mai 1877.
29) Amlair, Les poissons du bacille tuberculeux humain. Arch. de méd. expér. 1900, Tome XII, Nr. 1.
30) Aufrecht, Robert Kochs Tuberkulosebehandlung. Deutsches Arch. f. klin. Med. 1891, Nr. 1.
31) Ders., Pathologie u. Therapie der Lungenschwindsucht. Hölder, Wien 1905.
32) Baas, K. L., Experimentell-anatom. Untersuchungen über den Einfluß des Tuberkulocidins und Tuberkulins auf die Impftuberkulose des Kaninchenauges. Gräfes Arch. f. Ophthalmol. 1893, Bd. XXXIX, Heft 4.
33) Babès, V. u. Broca, G., Sur la sérotherapie de la tuberculose. Méd. mod. 1896, pag. 37.
34) Dies., Zeitschr. f. Hyg. 1896, Bd. XXIII.
35) Babès, V. u. Kalendero, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 3.
36) Baccelli, Verhandlungen des Kongresses f. innere Medizin 1891.
37) Baeri, Münchener med. Wochenschr. 1901, Nr. 48.
38) Ders., Nuova rivista clin.-therap. 1901, Nr. 6.
39) Baginsky, B., Arch. f. Kinderheilkunde 1891, Nr. 4, 5, 6.
40) Ders., Mitteilungen in der Diskussion zu dem Vortrag des Herrn B. Fränkel: Über die Anwendung des Kochschen Mittels bei Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
41) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1893, pag. 79.
42) Bahrdt, Deutsches Arch. f. klin. Med., Bd. LXXXVI, Nr. 4 u. 5.
43) Bail, O., Über Giftwirkung von Tuberkelbazillen beim Meerschweinchen. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 49.
44) Ders., Über das Aggressin des Tuberkelbazillus. Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 21.
45) Ders., Der akute Tod von Meerschweinchen an Tuberkulose. Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 9.
46) Ders., Überempfindlichkeit bei tuberkulösen Tieren. Aus dem hygienischen Institut der deutschen Universität Prag. Wiener klin. Wochenschr. 1905.
47) Baldwin, E. R., Anti-tuberkulin or tuberculin-precipitin serums. Journ. of med. research. 1904, Vol. XII, Nr. 2, pag. 235.
48) Bandelier, Weitere Beiträge zur Tuberkulinbehandlung. Deutsche med. Wochenschrift 1898, pag. 798.
49) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1899, Nr. 9.
50) Ders., Über die diagnostische Bedeutung des alten Tuberkulins. Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 20.
51) Ders., Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkde. 1902, Bd. XXXII, pag. 107.
52) Ders., Centralbl. f. innere Medizin 1902, pag. 832.
53) Ders., Über die Heilwirkung des Neutuberkulins (Bazillenemulsion). Zeitschr. f. Hyg. 1903, Bd. XCIII, Nr. 2.
54) Ders., Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkde. 1903, Bd. XXXIV, pag. 138.
55) Ders., Die Tuberkulindiagnostik in den Lungenheilstätten. Beitr. z. Klinik der Tuberkulose, Bd. II, Heft 4.
56) Ders., Die Maximaldosis in der Tuberkulindiagnostik. Ibid. 1906, Bd. VI, Heft 1.
57) Ders., Der diagnostische Wert der Tuberkulininhalation. Ibid. 1906, Bd. VI, Heft 1.
58) Ders., Zur Heilwirkung des Tuberkulins. Heilung eines Lupus durch Perlsuchtalttuberkulin. Ibid. 1906, Bd. VI, Heft 1.
59) Bang, Hosp. Tit. 3. R. Vol. IX, Heft 17/19, 1891.
60) Bardenheuer, Bericht über 100 nach Koch behandelte chirurgische Fälle. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Bd. XVII, Nr. 5.

61) Barney, The tuberculin test in man. Journ. of the Boston Soc. of med. Science 1898, Vol. II, pag. 210.
62) Barrier, G., Recherches experimentales sur les effets de la tuberculine de R. Koch. Recueil de Méd. vétér. f. séc., Tome VIII, pag. 469.
63) Barton, Joshua Lindley, The scieutific treatment of tuberculosis. New-York med. Rec. 1897, Nr. 11, Sept.
64) Baruchello, Leop., La resistenza del siera die sangue trattato con tuberculina ecc. studiata in qualche appicazioni terapeutiche. Il Policlinico 1897, Vol. IV, Nr. 24.
65) Baudach, J., Vorläufige Mitteilungen über Anwendung des neuen Kochschen Tuberkulins. Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 544.
66) Bauer, Jos., Über Tuberkulin. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 32.
67) Baumgarten, P., Baumgartens Jahresbericht 1891.
68) Ders., Über die Einwirkung des Kochschen Mittels (Tuberkulin) auf die Impftuberkulose der Kaninchen. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 19, 51.
69) Ders., Internat. Beitr. z. wiss. Medizin 1891, Bd. III, pag. 81.
70) Ders., Baumgartens Arbeiten 1894, Bd. II, pag. 91.
71) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 544.
72) Ders., Festschrift für Virchow (Hirschwald), Bd. III.
73) Ders., Über rezidivierende Tuberkulose nach Behandlung mittels Tuberkulins. Arbeiten aus dem pathol. Inst. zu Tübingen, herausgeg. v. Dr. P. Baumgarten, 1893, Bd. II, Heft 1.
74) Baumgarten, P. und Walz, K., Über den Heilwert des neuen Kochschen Tuberkulins nach Experimenten an tuberkulösinfizierten Kaninchen und Meerschweinchen. Centralbl. f. Bakt. und Parasitenkde. 1898, Bd. XXIII, pag. 14.
75) Bäumler, Ch., Beobachtungen über die Anwendung des Kochschen Heilverfahrens. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr 2.
76) Bayer, Über einige unter Zuhilfenahme des Tuberkulins mit günstigem Erfolge behandelte Fälle von chirurgischer Tuberkulose. Wiener med. Presse 1891, Bd. XXXII, Nr. 31.
77) Bechtin, J. W., Über deu Stickstoffwechsel bei Injektionen Kochscher Flüssigkeit in qualitativer und quantitativer Beziehung. Boln. gas. Botk. 1891, Nr. 45, 46, 47.
78) Ders., Petersburger med. Wochenschr. Russ. med. Lit. 1892, Nr. 2.
79) Beck, Max., Über die Kombination der Tuberkulinkur mit der Kreosotbehandlung. Charitee-Annalen 1896, Bd. XXI, pag. 815.
80) Ders., Über das neue Tuberkulin TR. Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 23, Beilage, pag. 33, 41.
81) Ders., Über die diagnostische Bedeutung des Kochschen Tuberkulins. Deutsche med. Wochenschr. 1899, Nr. 59.
82) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 20.
83) Ders., Zur Frage der säurefesten Bazillen. Tuberkulosearbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Heft 1. Berlin 1904, Springer.
84) Behrends, Arvosi Hetilap 1900, Nr. 23.
85) v. Behring, E., Deutsche med. Wochenschr. 1898, pag. 294.
86) Ders., Über die spezifisch giftigen Eigenschaften der Tuberkulinsäure. Berliner klin. Wochenschr. 1899, Nr. 25.
87) Ders., Beiträge zur experiment. Therapie 1904, Heft 8.
88) Benoit, Resultats obtenus sur l'homme et sur les animaux de la nouvelle tuberculine TR de Koch. Congrès de la tuberculose, Paris 1898, pag. 505.
89) Béraneck, Ed., Une nouvelle tuberculine. Rev. méd. de la Suisse Romande 1905, Nr. 10.
90) v. Bergmann, Mitteilungen über die mit dem Kochschen Heilverfahren gewonnenen Ergebnisse. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 47, Extrabeilage.
91) Ders., Ibid. Wiener med. Presse 1890, Bd. XXXI, Nr. 47.
92) Ders., Ibid. Wiener med. Blätter 1890, Bd. XIII, Nr. 48.
93) Ders., Ibid. Münchener med. Wochenschr. 1890, pag. 824.
94) Ders., Ibid. v. Volkmanns Sammlung klinischer Vorträge 1891, N. F. Nr. 22.
95) Ders., Einleitender Vortrag zu der Besprechung über die Kochsche Entdeckung, gehalten auf dem XX. Chirurgenkongreß, Berlin 1891. Berliner klinische Wochenschr. 1891, Nr. 15, 16.
96) Ders., Klinisches Jahrb. 1891, Ergänzungsband.
97) Bernheim, S., Die Behandlung der Tuberkulose mit immunisiertem Serum. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkde. 1894, Bd. XV, pag. 654.
98) Berthenson, Deutsche med. Wochenschr. 1892, Nr. 3, 4.
99) Besold, Diskussinn. 2. Versammlung der Tuberkulose-Ärzte zu Berlin, 1904.

100) Biedert, Deutsche Med.-Ztg. 1891.
101) Ders., Zur Anwendung von Robert Kochs Tuberculium R. Archiv f. öffentl. Gesundheitspflege in Elsaß-Lothringen 1897, Bd. I.
102) Bierk und Lesser, Verhandlungen der Berliner Dermatol. Gesellsch. 1898, pap. 6 und 7.
103) Biermer, Klinisches Jahrbuch 1891, Ergänzungsband.
104) Binswanger, Beiträge zur Klinik der Tuberkulose, Bd. IV, pag. 1.
105) Ders., Archiv f. Kinderheilkunde 1903, Bd. X, L. 3, pag. 1—4.
106) Blaschko, A., Das Tuberkulin in der Dermatologie. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 9.
107) Boinet und Jeannel, Traitement de la tuberculose humaine par le sérum de sang de chevre inoculée avec de la tuberculine. Semaine méd. 1891, Nr. 4.
108) Bond, C. J., The action of tuberculin of the blood. British med. Journal 1891, Nr. 5, Dec.
109) Borelius, Jacques, Den Kochska behandlingen af tuberculos inför tyska kirurgkongressen i Berlin, 1—2 april 1891. Hygiea 1891, Tome LIII, Nr. 4.
110) Bornträger, Resultate der Tuberkulinbehandlung in der Praxis. Deutsche med. Wochenschr. 1892, Nr. 18.
111) Bosquier, R., Thèse de Paris 1897.
112) Ders., La nouvelle tuberculine R. et son emploi en particulier dans la tuberculose pulmonaire, Paris 1898.
113) Botkin, S., Hämatologische Untersuchungen bei Tuberkulininjektionen. Deutsche med. Wochenschr. 1892, Nr. 15.
114) Bozzolo, C., Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 16 und 17.
115) Ders., Sul potere curativo della nuova tubercolina di Koch. Gazz. degli Osped. 1897, Vol. XVIII, Nr. 133.
116) Braun, H., Über das Kochsche Heilverfahren gegen Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 11.
117) Brecke, Jahresberichte der deutschen Heilstätte in Davos.
118) Brehm, Therapeutische Monatshefte 1891, Nr. 2.
119) Brieger, O., Über die Einwirkung des Kochschen Verfahrens auf Schleimhautlupus. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 5.
120) Ders., Kongreß zur Bekämpfung der Tuberkulose 1899, pag. 370.
121) Briggs, Reports from the Br. Sanitarium for 1901, 1902, 1903, 1907.
122) Ders., Charl. med. Journal 1895, Vol. XXVI.
123) Ders., Southern med. and surg. 1905, Vol. III.
124) Brocq, Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 16.
125) Broden, Archiv de med. exper. 1899, Tome XI, Nr. 1.
126) Browicz, T., Beitrag zur Histologie der Gewebsveränderungen nach Injektion der Kochschen Vaccine. Centralbl. f. die med. Wissenschaft 1891, Bd. XXII, Nr. 1.
127) Ders., Wiener med. Blätter 1891, Bd. XIV, Nr. 3.
128) Brown, T. Warren, Treament of tuberculosis and tuberculin inoculation. British med. Journ. 1905, Nr. 2316, pag. 1089.
129) Buchner, H., Berliner klin. Wochenschr. 1890, pag. 673 und 1084.
130) Ders., Über Robert Kochs Heilverfahren gegen die Tuberkulose. Münchener med. Wochenschr. 1890, Nr. 47.
131) Ders., Robert Kochs Heilverfahren gegen Tuberkulose und die sich zunächst anknüpfenden experimentellen Aufgaben. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 3.
132) Ders., Kritisches Referat über O. Hertwigs Arbeit: Über die physiologische Theorie der Tuberkulinwirkung usw. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 29, Sep.-Aufl.
133) Ders., Tuberkulinreaktion durch Proteïne nicht spezifischer Bakterien. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 49.
134) Ders., Münchener med. Wochenschrift 1897, pag. 298.
135) Ders., Zu Robert Kochs Mitteilungen über neue Tuberkulinpräparate. Berliner klin. Wochenschr. 1898, pag. 322.
136) Bujwid, O., Dos wiadczenia na zwierzetach z tuberkulina. Gazeta Lekarska 1891, pag. 584.
137) Ders., Tuberkulina i jej' przygotowanie. Gazeta Lekarska 1891, pag. 68.
138) Bukowsky, Jeroslaw, Vorläufiger Bericht über die Anwendung des Tuberkulins TR. Wiener med. Wochenschr. 1897, Nr. 40.
139) Ders., Die Ergebnisse der Behandlung tuberkulöser Hautinfektionen mit Tuberkulin R. Archiv f. Dermatol. und Syph. 1898, Heft 2.
140) Bullock, William, The treatment of tuberculosis by tuberculin. Lancet 1905, Vol. II, Nr. 23.

141) Burci, Enrico, Ricerche sperimentali sul valore chemiotattico della tubercolina. Rif. med. 1891, Bd. VII, Nr. 239 und 240.
142) Burckhard, E., Berliner klin. Wochenschr. 1898, pag. 143.
143) Burckhadrt, Emil, Beobachtungen über Tuberkulinbehandlung von Urogenitaltuberkulose. Schweizer Korrespondenzbl. 1891, Bd. XXI, Nr. 6.
144) v. Burckhardt, H., Mitteilungen über das Kochsche Heilverfahren, nebst pathologisch-anatomischem Untersuchungsbefund von Prof. Dr. Baumgarten. Med. Korrespondenzbl. des Württemberg. ärztl. Landesverein, 18. Dez. 1890, pag. 33—35.
145) Burghart, Über die Ergebnisse der Anwendung des neuen Kochschen Tuberkulins (TR.) bei Lungentuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 7.
146) Burkart, Berliner klin. Wochenschr. 1890, Nr. 53.
147) Bussenius, Einige Mitteilungen über die bisher bei Anwendung des TR.-Tuberkulins gesammelten Erfahrungen. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 28.
148) Ders., Über die Wirkung des neuen Tuberkulins TR. Nebst Entgegnung von L. Spengler. Schweizer Korrespondenzbl. 1898, Nr. 5.
149) Bussenius, W. und Cossmann, H., Das Tuberkulin TR, seine Wirkung und seine Stellung in der Therapie der inneren und äußeren Tuberkulose. Berlin 1898.
150) Ders., Petersburger med. Wochenschr. 1898, pag. 270.
151) Ders., Schweizer Korrespondenzbl. 1898, pag. 500.
152) Calmette und Breton, Sur les effects de la tuberculine absorbée par le tube digestif chez les animaux sains et chez les animaux tuberculeux. La Belgique méd. 1906, Nr. 12.
153) de la Camp, Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 30.
154) Campana, R., La tubercolina R. nel Lupus ed in alcune altre lesioni tuberculose. Policlinico 1897, Nr. 2—4.
155) Ders., Ref. d. Therapeut. Wochenschr. 1897, Nr. 46.
156) Campana, R. und Degola, N., Alcune osservazioni sugli effetti della linfa di Koch, sopra animali con tuberculosi sperimentale. Rif. med. 1891, Vol. VII, pag. 76.
157) Cantani, A., Über das Kochsche Heilverfahren in der Tuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 2 und 9.
158) Carrière, G., Ètude expérimentale des altérations histologiques du foie et du rein, produites par les toxines tuberculeuses (tuberculine). Archiv de med. expérim. 1897, Nr. 1 [Tome IX].
159) Caruccio, La tubercolina nel lupus. Clinica dermosi filopatica della R. Univ. di Roma 1894, Nr. 1 und 2.
160) Caspersohn, Ein Fall von Meningitis tuberculosa, entstanden unter der Behandlung mit der Kochschen Lymphe, Punktion des Seitenventrikels. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 12.
161) Castellini, F. F., Azione della linfa Koch sulla crasi sanguigna. Rif. med. 1891, Nr. 180.
162) Castranovo, A., Sopra le alterazioni dei bacilli tuberculari attribuite alla linfa Koch. Riv. di Clin. med. 1891, Vol. VII, Nr. 19.
163) Centanni, Eugenio, Sul mecanismo dell' azione e sul significato terapeutico della tubercolina. Archiv ital. di Clin. med. 1892, Vol. XXXI, pag. 1.
164) Cheyne, W. Watson, On tuberculin in relation to surgical tuberculous diseases. Lancet 1891, Vol II, pag. 6—7.
165) Chiari, H., Über den pathologisch-anatomischen Untersuchungsbefund in drei mit Kochschen Injektionen behandelten Fällen von schwerer Lungentuberkulose. Prager med. Wochenschr. 1890, Nr. 53.
166) Ders., Weitere pathologisch-anatomische Mitteilungen über mit Kochschen Injektionen behandelte Fälle von Tuberkulose. Prager med. Wochenschr. 1891, Nr. 9.
167) Ders., Wiener med. Presse 1891, Nr. 2 und 3.
168) de Christmas, J., Le diagnostic de la tuberculose par la tuberculineréaction. Compt. rend. de la soc. de biol. 1904, Nr. 6, pag. 239.
169) Coghill, J. G. Sinclair, Observations on the effect of the injection of tuberculin on the pulse. British med. Journal 1891, Nr. 14, Nov.
170) Ders., Sequel of a case treated by Koch's tuberculin, with the results of the necropsy. Lancet 1895, Vol. II, pag. 1219.
171) Cohn, E., Die Erfahrungen mit Tuberkulin R bei der Behandlung der Tuberkulose in der Kgl. med. Klinik in Breslau (Dissert.)
172) Cornet, G., Die Tuberkulose, Wien.
173) Ders., Die latenten Herde der Tuberkulose und der Tuberkulindiagnostik im Lichte neuer Forschung. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 15.
174) Cornet, G. und Meyer, A., Immunität bei Tuberkulose. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann, Jena 1904.

175) Cornil, Progrès med. 1890, Nr. 51.
176) de Coster, V., Action du sérum antituberculeux sur une tumeur fibri-tuberculeuse de la face. Presse med. Belge 1897, Nr. 15.
177) Courmont, J. und Le Dor, De la vaccination contre la tuberculose aviaire ou humaine avec les produits solubles du bacille tuberculeux aviaire. Arch. de méd. expér. 1891, 6. Nov., Tome VI.
178) Crisafalli, Guiglielmo, Modificazioni della urina e del potere urotossico negli iniettati colla linfa Koch. Arch. ital. di Clin. med. 1891, Vol. XXX, pag. 3.
179) Crocker, H., Radcliffe. Lancet 1896, Vol. II, 21. 22. Nov.
180) Cronquist, Johan, Tva fall behandlade med tuberkulinum TR. (Koch) i Malmö Barnsjukhus. Hygiea 1897, Vol. LIX, pag. 11.
181) Czaplewski, E. und Roloff, F., Beiträge zur Kenntnis der Tuberkulinwirkung bei der experimentellen Tuberkulose der Kaninchen und Meerschweinchen. Berliner klin. Wochenschr. 1892, Nr. 29.
182) Ders., Über den Heilwert des Tuberkulins nach Experimenten an tuberkulös infizierten Kaninchen und Meerschweinchen. Arbeiten an dem Tübinger pathol. Institut 1893, Bd. II, pag. 1.
183) Czerny, Erster Bericht aus der chirurgischen Klinik in Heidelberg über die Kochschen Impfungen. Deutsche med. Wochenschr. 1896, Nr. 51.
184) Danielsen, Monatshefte für prakt. Dermatologie 1891, Nr. 3, 4.
185) Dasara, D., Gazz. degli sieroterapia e delle clin. 1897, Nr. 34.
186) Dauriac, J. S., Notes cliniques sur l'emploi de la nouvelle tuberculine TR du Prof. R. Koch dans le traitement des tuberculoses. Le Progrès méd. 1897, Nr. 49, 50.
187) Dechandt, Das Tuberkulin. Inaug.-Dissert., Leipzig 1901.
188) Demuth, Vereinsblatt für die pfälz. Ärzte 1891, Bd. VIII, pag. 1.
189) Denison, Charles, Tuberculin and the living cell. Philadelphia med. News 1892, Vol. LXI, pag. 12.
190) Ders., The microscopical proof of a courative process in tuberculosis; or the reaction to tuberculin evidenced by blood changes. Med. Record. 1896, Nr. 5, Sept.
191) Denys, J., Sur le traitement de la tuberculose par la tuberculine. Compt. rend. et mem. du congr. de la tnberculose, Paris 1898, pag. 497.
192) Ders., Behandlung der Tuberkulose mit Tuberkulin aus dem bakteriol. Institute zu Löwen. Tuberkulosekongreß, Berlin 1899, pag. 696.
193) Ders., De l'emploi de la tuberculine bouillon filtré du bacille de Koch dans la tuberculose pulmonaire. Bull. de l'acad. de méd. de Belge, Bruxelles 1902, Nr. 3.
194) Ders., Quelques mots de réponse à Mr. le Dr. Leboeuf à propos de sa communication sur les tuberculines. Presse méd. Belge 1902, Nr. 27.
195) Ders., Le Bouillon filtré du bacille de la tuberculose dans le traitement de la tuberculose humaine. Paris 1905.
196) Zeitschr. für Tuberkulose, Bd. IV, pag. 237.
197) Dettweiler, Verhandlungen des Kongresses für innere Medizin 1891.
198) Deutsch, Superinfektion und Primaraffekt. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 27.
199) Diem, Versuche mit Tuberkulin bei Hühnertuberkulose. Monatshefte fur prakt. Tierheilkunde 1892, Bd. III, pag. 481.
200) Dinulescu, Centralbl. f. Bakteriologie u. Parasitenkunde, Bd. XXXII, pag. 277.
201) Dönitz, W., Untersuchungen über die Wertbestimmung des gewöhnlichen Tuberkulins. Aus: Klinisches Jahrbuch, Jena 1898.
202) Ders., Die Behandlung der Lungentuberkulose. Zeitschr. f. ärztl. Fortbildung 1904, Nr. 13.
203) Dörrenberg, Über die Aussichten der Serumtherapie bei Tuberkulose. Verhandl. d. Gesellsch. Deutscher Naturforscher u. Ärzte, 68. Vers., Teil II, 2. Hälfte, 1897, pag. 39.
204) Dörschlag, Iristuberkulose. Dissert., Greifswald 1905.
205) Dombrowsky, W., Die diagnostische und prophylaktische Bedeutung des Kochschen Tuberkulins. Wratsch 1901, Nr. 1.
206) Ders., Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd. II, p. 469.
207) Doutrelepont, J., Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 51.
208) Ders., Demonstration von mittelst Tuberkulin behandelten Lupusfällen. Sitzung d. Niederrhein. Gesellsch. f. Natur- u. Heilkunde v. 19. Jauuar 1891. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 9.
209) Ders., Über die Injektion mit Tuberkulin. Verhandl. der Deutschen dermatolog. Gesellsch., III. Kongr., Wien und Leipzig 1892.

210) Doutrelepont, Kurze Mitteilung über die bisherigen Erfahrungen bei der Anwendung des neuen Tuberkulins. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 34.
211) Ders., Weitere Erfahrungen bei der Anwendung des neuen Kochschen Tuberkulins. Separatausgabe aus dem Sitzungsbericht der Niederrhein. Gesellsch. f. Natur- u. Heilkunde zu Bonn 1898.
212) Ders., Über Tuberkulinwirkung bei Lupus. Deutsche med. Wochenschr. 1899, Nr. 21.
213) Dovertie, G. H., Om Koch's nya tuberculin. Eira 1897, Vol. XXI, Nr. 22.
214) Drasche, Wiener klin. Wochenschr. 1891, Nr. 67.
215) Dunin und Dabrowski, Badanie histologiczne plue w jednym przypadku leczonym metoda Koch'a. Gazeta Lekarska 1891, pag. 439.
216) Durel, New Orleans med. Journ. 1903, Nr. 5.
217) Durier, Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 16.
218) Duse, Sante und Pietro Rini, Contributo agli esperimenti colla linfa di Koch in un caso di lupus facciale. Gazz. Lomb. 1890, 9. Ser., Vol. III, pag. 50, 51.
219) Ebstein, Deutsche med. Wochenschr. 1890, pag. 51.
220) Ders., Klin. Jahrbuch 1891, Ergänzungsband.
221) Edgren, J. G., Försök med. R. Koch's nya tnberculin TR. Hygiea 1898, Nr. 4,
222) Edwards, Laudon, B., Antitubercle serum in tuberculosis. New York med. Record 1898, Vol. LIII, 15. April.
223) Egger, Korrespondenzbl. f. Schweizer Ärzte 1891, Nr. 6.
224) Ehrlich, Internationaler Kongr. f. Hygiene 1900.
225) Ehrlich und Güttmann, Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 5.
226) Eichberg, Joseph, Some experiments with modified tuberculin. Med. News 1893, Nr. 4, Jan.
227) Eichhoff, P. J., Über meine bisherigen Erfahrungen mit der Tuberkulintherapie bei Lupus und einigen anderen Dermatosen. Therap. Monatshefte 1891, Bd. V, pag. 9.
228) Elsässer, Klinische Beobachtungen bei Behandlung mit Neu-Tuberkulin (Bazillenemulsion) und Mitteilung eines Falles von mit Alt-Tuberkulin geheilter doppelseitiger Iristuberkulore. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 48.
229) Elsenberg, A., Die Behandlung des Lupus mittels der Kochschen Methode. Wiener med. Presse 1892, Bd. XXXIII, pag. 1, 2.
230) Emmerich und Buchner, Kochs Heilverfahren gegen die Tuberkulose. Wiener med. Blätter 1890, Bd. XXII, pag. 47.
231) Engelking, O., Zur Behandlung der Tuberkulose mit Tuberkulin R. Inaug.-Dissert., Marburg 1898.
232) Epstein, Prager med. Wochenschr. 1891, Nr. 1 u. 2.
233) Ernst, Harold, C., Tuberculin and tuberculosis. Transact. of the Assoc. of Americ. Phys. 1891, Vol. VI, p. 15.
234) Escherich, Die Resultate der Kochschen Injektion bei Skrophulose und Tuberkulose des Kindesalters. Jahrbuch f. Kinderheilkunde 1892, Nr. 4.
235) Ders., Klin.-kas. Beiträge 1897.
236) Ders., Prager med. Wochenschr. 1900, pag. 517.
237) v. Esmarch, Friedr., Bericht über die Anwendung des Kochschen Heilmittels bei Kranken. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 3, 4.
238) Eve, Frederic, Cases of surgical tuberculosis treated by Koch's new tuberculin. Lancet 1897, Nr. 18, Sept.
239) Ewald, C. A., Erfahrungen mit dem Kochschen Mittel. Berliner klin. Wochenschrift 1890, Nr. 51, und ibidem 1891, Nr. 3.
240) Fabian, E., Über das neue Tuberkulin TR. Dissert., Königsberg i. Pr. 1898.
241) Falckenberg, Kurt, Ein Beitrag zur Pathol. und Therapie der Irisdocyclitis tuberculosa. Inaug.-Dissert., Tübingen 1901.
242) Falckenberg, Kurt und Löwenstein, Ernst, Über die Inkubationszeit der Lungentuberkulose. Zeitschr. f. Tuberkulose 1906, Bd. VIII.
243) Falkenberg, Inaug.-Dissert. Tübingen 1901.
244) Farzier und Briggs, Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd. III, pag. 1.
245) Faure, Elié, Essai sur le traitement du lupus par la nouv. tuberculin TR de Koch. Thèse de Paris 1899.
246) Fauser, Über einige Sektionsbefunde nach Anwendung des Kochschen Verfahrens. Med. Korrespondenzbl. d. Württ. ärztl. Landesvereins 1891, No. 13.
247) Faust, John, Tuberculin as a means of diagnosis. Amer. vet. Review 1893, Vol. XVIII, pag. 174.
248) Feer, E., Auftreten von Diazoreaktion im Urin von mit Kochscher Lymphe behandelten tuberkulösen Kindern. Jahrbuch für Kinderheilkunde 1892, Nr. 3.
249) Fehling, Korrespondenzblatt für Schweizer Ärzte 1891, Nr. 1.

250) Feigel, Longin, Bis jetzt noch nicht beschriebene Veränderungen an Tuberkelbazillen nach subkutan injizierter Kochscher Lymphe. Centralbl. f. allgem. Pathol. u. pathol. Anat. 1891, Bd. II, pag. 4.
251) Ders., Zmiany w org kach gruiliazych pod wplywcm limfy Koch'a. Przeglad Lekarski 1891, pag. 71.
252) Feistmantel, Die Tuberkulinreaktion. Ein Beitrag zur Feststellung ihres Wesens als Gattungsreaktion. Centralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenkunde, 1. Abt., Bd. XXXVI, Nr. 2.
253) v. Fetzer, und Gussmann, F., Zur Kochschen Tuberkulosebehandlung. Stuttgart 1891.
254) Finger, 69. Versamml. d. Naturforscher u. Ärzte zu Braunschweig 1897.
255) Finkler, Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 52.
256) Fischer, Korrespondenzbl. f. Schweizer Ärzte, Bd. XXIII, pag. 19.
257) Ders., Münchener med. Wochenschr. 1903, Bd. II, pag. 1838.
258) Flatau, Berliner klin. Wochenschr. 1890, Nr. 3.
259) Ders., Demonstration zum Kochschen Heilverfahren. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 5.
260) Foss, Beitrag zur Tuberkulinbehandlung. Zeitschr. f. Tuberkulose 1905, Bd. VI, pag. 5.
261) France, E., London. Tuberculos. Congr. Deutsche med. Wochenschr. 1901, pag. 852.
262) Fränkel, A., Beobachtung über die Anwendung des Kochschsn Heilverfahrens. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 51.
263) Ders., Demonstration zum Kochschen Heilverfahren. Aus der Sitzg. der Berl. med. Gesellsch. vom 11. Febr. 1891. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 7.
264) Ders., Bemerkung in der Diskussion über den Vortrag des Herrn B. Fränkel: Über Anwendung des Kochschen Mittels bei Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
265) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1893, pag. 79.
266) Ders., Zeitschr. f. Tuberkulose u. Heilstättenwesen, 1900, Nr. 4.
267) Ders., Lehrbuch d. spez. Pathol. u. Therapie der Lungenkrankheiten.
268) Fränkel, B., Klin. Jahrbuch 1891, Ergänzungsband, pag. 259.
269) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1891, pag. 79.
270) Ders., Das Tuberkulin und die Frühdiagnose der Tuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1900, Nr. 12.
271) Ders., Das Tuberkulin aus der Frühdiagnose. Charitévortrag 1900.
272) Ders., Diskussionsbemerkungen zum Vortrag von Exzellenz v. Behring: „Phthisiognese und Tuberkulosebekämpfung". Sitz. d. Vereins f. innere Medizin vom 18. Jan. 1904. (Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 6.)
273) Fräntzel, Berliner klin. Wochenschr. 1890, Nr. 49.
274) Fräntzel und Runkwitz, Systematische Anwendung des Kochschen Spezifikums gegen Tuberkulose bei inneren Krankheiten. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 47.
275) Franz, Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd. III, pag. 338.
276) Ders., Die Bedeutung des Tuberkulins für die Frühdiagnose der Tuberkulose und die erste Anwendung desselben in der Armee. Wiener med. Wochenschr. 1902, Nr. 7.
277) Frazier und Briggs, Univ. of Penna, med. bult. 1900, Nr. 1.
278) Frey, Hermann, Über die spezifische Behandlung der Tuberkulose. Wien 1905, Deuticke.
279) Ders., Einige Bemerkungen zu Spenglers neuem Heilverfahren (Immunisierung mit Perlsuchttuberkulin). Wiener klin. Rundschau 1906.
280) Ders., Meine Erfahrungen mit dem Antituberkuloseserum Marmorek. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 44.
281) Freymuth, W., Vorläufige Erfahrungen mit TR. Therapeut. Monatshefte 1898, Nr. 6, pag. 310.
282) Ders., Diagnostische Erfahrungen mit Tuberkulin an Lungenkranken. Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 19.
283) Ders., Über Anwendung von Tuberkulinpräparaten per os. Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 2.
284) Ders., Centralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenkunde, Bd. XXIV, pag. 117.
285) Ders., Allgemeine Erfahrungen bei Tuberkulinanwendung am lungentuberkulösen Menschen. Verhandl. d. Gesellsch. Deutscher Naturforscher und Ärzte, Breslau 1904, II. Teil, 2. Hälfte.
286) Ders., Über Tuberkulin- und Heilstättenbehandlung Lungenkranker. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 43.

287) Fürbringer, M., Mitteilung in der Diskussion über den Vortrag des Herrn B. Fränkel: Über die Anwendung des Kochschen Mittels bei Tuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 5.
288) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 26.
289) Gabrilowitsch, J., Über Injektionen mit Kochscher Lymphe. Wiener med. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
290) Gamaleïa, N., Ann. Pasteur 1889, pag. 542.
291) Ders., Sur le traitement de la tuberculose par la méthode de Koch. Arch. de Méd. expérim. et d'Anatomie pathol. 1891, Nr. 2.
292) Ganghofner, Über die therapeutische Verwendung des Tuberkulins im Kindesalter. Jahrbuch f. Kinderheilkunde, Mai 1906, Bd. LXIII, H. 5.
293) Ganghofner, und Bayer, C., Mitteilungen über das Kochsche Heilverfahren aus dem Kaiser-Franz-Joseph-Kinderspital in Prag. Prager med. Wochenschr. 1891, Bd. XVI, pag. 3, 4.
294) Gärtner, G. und Römer, Fr., Über die Einwirkung von Tuberkulin und anderen Bakterienextrakten auf den Lymphstrom. Wiener klin. Wochenschr. 1892, Bd. V, pag. 2.
295) Gasparini und Mercantini, Sull' azioni della linfa di Koch nella tuberculosi oculare sperimentale. Ann. di Ottalmologia. 1891, Vol. XX, pag. 1, 2.
296) Gavello und Simoni, Gaz. med. Torino 1998, Nr. 35.
297) Geisler, Th., Über die Wirkung des Kochschen Tuberkulins auf gesunde Tiere (Kaninchen). Virchows Arch. 1891, pag. 601.
298) Gerber und Prang, Erste Erfahrungen mit Neu-Tuberkulin TR. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 39.
299) Gerhard, Klin. Jahrbuch 1991, Ergänzungsband.
300) Gerson. Karl, Eine Vereinfachung der Tuberkulininjektionstechnik. Zeitschr. f. ärztl. Fortbildung 1906, Nr. 13, pag. 15.
301) Giovanni de, Rif. med. 1891, Nr. 50.
302) Gluck, Th., Chirurgische Fälle von Tuberkulose bei Behandlung mit Tuberkulin. Arch. für Kinderheilkunde 1891, Bd. XIII, pag. 4—6.
303) Goeschel, Beobachtungen über die Behandlung mit dem Kochschen Mittel, Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 3.
304) Goetsch, Über die Behandlung der Lungentuberkulose mit Tuberkulin. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 25.
305) Ders., Centralbl. f. innere Med. 1902, pag. 144.
306) Goldschmidt, Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 3, pag. 15, 28.
307) Grabower, Demonstration zum Kochschen Heilverfahren. Berliner klin. Wochenschrift 1891, Nr. 6, pag. 8.
308) Gramatschikoff, A., Über die Wirkung des Kochschen Mittels auf tuberkulöse Kaninchen. In Baumgartens Arbeiten 1892, Rd. I, pag. 3.
309) Ders., Über die Wirkung des Kochschen Tuberkulins auf tuberkulöse Kaninchen. Wetnik obstschestwennoi Hygieny, Bd. XII.
310) Grassert und Vedel, Bull. de l'Académie de Méd. 1896, Tome XXXV, Nr. 8.
311) Grawitz, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 19.
312) Ders., Über Blutbefunde bei Behandlung mit dem Kochschen Mittel. Charité-annalen 1891, Bd. XVI, pag. 291.
313) Gray, Vaccine Treatment in Surgery, Lancet 4312.
314) Grigorjew, D. W., Pathol.-anatom. Veränderungen in den Organismen gesunder Tiere bei Tuberkulineinspritzungen. Inaug.-Dissert. Petersburg 1892.
315) Grünewald, Verwendung des alten Kochschen Tuberkulins zur Erkenntnis der Lungentuberkulose. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 43.
316) Grunewald, Münchener med. Wochenschr. 1903, pag. 1870.
317) Gualdi und Torti, Rif. med. 1891, Nr. 71.
318) Guida, T., Gli esperimenti eseguiti con la tubercolina di Koch nelle malattie dei bambini. Rif. med. 1898, Vol. VIII, pag. 41, 42.
319) Guidet, Essai hist. sur les indices du début de la Tub. pulm. Paris 1898.
320) Guinard, Les extraits de bacilles tuberculeux et les tuberculines, autres que celles de Koch· Revue de la tuberculose 1902, Nr. 3, pag. 289.
321) Ders., Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd. IV, pag. 459.
322) Ders., Valeux pratique de la tuberculine dans le diagnostic et dans le traitement des lésions tuberculeuses. Le Bull. méd. 1906, Nr. 60.
323) Guttmann, P., Über das Kochsche Heilverfahren bei Lungentuberkulose Berliner klin. Wochenschr. 1890, Nr. 52.
324) Ders., Über die Anwendung des Kochschen Mittels bei Lungentuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 1.

325) Guttmann, P., Demonstration eines Präparates von Heilung tuberkulöser Darmgeschwüre durch das Kochsche Mittel. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 5.
326) Ders., Monatshefte f. prakt. Tierheilkunde 1895, Bd. VI, pag. 433.
327) Guttmann, P. und Ehrlich, P., Entgegnung auf die Mitteilung über Tuberkelbazillen im Blut nach Kochschen Injektionen. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 6.
328) Guttstadt, A., Die Wirksamkeit des Kochschen Heilmittels gegen Tuberkulose. Klin. Jahrbuch 1891, Ergänzungsband.
329) Guyon und Albarran, Annales des malades des org. génito-urin 1891.
330) Haentgens, Näheres über die Unterstützung des Bindegewebes bei seinem Kampfe gegen das Tuberkulosevirus. Zeitschr. f. Tuberkulose Bd IX, Heft 2.
331) Hagenbach und Burchhardt, Korrespondenzbl. f. Schweizer Ärzte 1891, Nr. 1.
332) Hager, Ärztl. Sachverst. Ztg. 1903, Nr. 7.
333) Ders., Verhandlungen des VI. Verbandstages der deutschen Bahnärzte, Metz 1904.
334) Hahn, Eugen, Mitteilungen über die Anwendung Kochscher Lymphe auf der chirurgischen Station des Krankenhauses am Friedrichshain Berlin. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 1.
335) Hahn, M., Münchener med. Wochenschr. 1897, pag. 1344.
336) Hale, Wilfred S., Journal of Tub., July 1901.
337) Hallopeau, Ref. Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 16.
338) Hamerle, Jar., Untersuchung des Blutes auf Tuberkelbazillen nach Kochscher Injektion. Prager med. Wochenschr. 1891, Nr. 9.
339) Hammer, C., Über die diagnostische Tuberkulininjektion und ihre Verwendung beim Heilstättenmaterial. Beitr. z. Klinik der Tuberkulose, Würzburg 1903, Bd. I, Heft 4, pag. 325.
340) Hammerschlag, Centralbl. f. klin. Medizin 1891.
341) Hausemann, David, Pathologisch-anatomische und histologische Erfahrungen über die Kochsche Injektionsmethode. Therap. Monatshefte, Januar 1891 und Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 5.
342) Haslund, Nogle Betragtninger over Behandlingen af Lupus med. der Kochske Injectioner. Hosp. Tid. 3 R 1890, Vol. VIII, pag. 51.
343) Ders., Beretning an Tilfälde af Lupus behandlede med Kochs Tuberculin. Hosp. Tid. 3 R 1891, Vol. IX, pag. 33—37.
344) Heermann, Über Tuberkulinbehandlung seit 1891. Zeitschr. f. Krankenpflege 1904, Bd. XXVI, Nr. 58.
345) Ders., Über einen schmerzlosen Injektionsmodus des Alt-Tuberkulins. Zeitschr. f. Tuberkulose 1905, Bd. VII.
346) Heim, Discussion on the therapeutic and diagnostic value of tuberculin in human tuberculosis. Philadelphia med. Journal 1901, Vol. VIII.
347) Helferich, Über die Erfolge, welche mit dem Kochschen Heilmittel bei Kranken der chirurgischen Klinik bisher erzielt worden sind. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
348) Ders., Klinisches Jahrbuch 1891, Ergänz.-Band.
349) Heller. A., Bericht aus dem pathol. Institut in Kiel über die Wirksamkeit des Kochschen Heilmittels gegen Tuberkulose. Klinisches Jahrbuch, Berlin 1891, Ergänz.-Band, pag. 770.
350) Hellner und Speyer, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 9.
351) Helmann, C., Archiv des Scienees biol. publ. par l'Institute Impér. de Médecin expérim. à St. Petersbourg 1895, Tome I, pag. 140.
352) Henoch, Ed., Mitteilungen über das Kochsche Heilverfahren gegen Tuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1890, Nr. 51.
353) Ders., Klinisches Jahrbuch, Berlin 1891, Ergänz.-Band.
354) Henschen und Rosén, Årsberättelse från akademiska sjukhuset. Från. med. klin. 1890, pag. 31.
355) Heron, G. A., On Koch's treatment in tuberculosis of the lung and in lupus vulgaris. Lancet 18. May 1891, Vol I.
356) Ders., On the treatment of consumption and of lupus by tuberculin. British med. Journal, 9. July 1898.
357) Ders., Discussion on the therapeutic and diagnostic value of tuberculin in human tuberculosis. Philadelphia med. Journal 1901, pag. 494.
358) Ders., Zeitschr. f. Tuberkulose Heft 5.
359) Hertel. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 48.
360) Hertwig, O., Über die physiol. Grundlage der Tuberkulinwirkung. Jena 1891.
361) Herzfeld, J., Das Tuberkulinum R bei Larinxtuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 543.
362) Herzog, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 15.

363) Heubner, Verhandlg. des X. Kongr. f. innere Medizin 1891.
364) Ders., Erste Versammlung der Tuberkuloseärzte zu Berlin 1903.
365) von Heusinger, Über die anatom. Veränderungen tuberkuloser Lungen nach Behandlung mit Kochschen Injektionen. Inaug. Dissert. Marburg 1891.
366) Hildebrand, Tuberkulose-Archiv f. Chirurgie 1901.
367) Hime, Thos Whiteside. Case of facial lupus healed by Koch's method. Lancet 16. April 1891, Vol. I.
368) Hink, Adolf, Die Injektionen mit Kochs Tuberkulin. Wiener med. Bl. 1891, Nr. 23.
369) Hinz, Reinhold, Über den diagnostischen Wert des Tuberkulins in der Kinderpraxis. Dissert. med. Rostock 1905.
370) Hoen, Centralbl. f. Bakt. und Parasitenk. Bd. XXXI, pag. 216.
371) Hofmeier, Berliner klin. Wochenschr. 1890, Nr. 53.
372) Hofmokl, Mitteilungen über die Resultate der mit Tuberkulin behandelten chirurgischen Krankheitsfälle. Wiener med. Presse 1891, Nr. 18, 19, 20.
373) Holdheim, W., Über Erfahrungen mit Alt-Tuberkulin in der Privatpraxis Verh. d. Ges. deutscher Naturforscher und Ärzte, Breslau 1904, II. Teil, 2. Hälfte.
374) Ders., Die Tuberkulintherapie der ambulanten Behandlung. Zeitschr. f. ärztl. Fortbildung 1904, Nr. 11, pag. 780.
375) van Hoorn, W., Over tuberculine en tuberculocidine by lupus. Nederl. Weekbl. 1892, Vol. II, pag. 14. Monatshefte f. prakt. Dermatologie 1892, Bd. XV, Nr. 112, pag. 615.
376) Ders., Über das neue Tuberkulin TR bei der Behandlung des Lupus und der Blasentuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 39.
377) Ders., Voortgenette mededeelingen over Tuberculine R-behandeling by lupus. Nederl. Tijdschr. v. Geneesk 1898, Vol. II, Nr. 8, pag. 269. Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 7.
378) van Hoorn und Spruyt-Landskroon, J., Die Behandlung von Lupuskranken mit Tuberkulin. Monatshefte f. prakt. Dermatologie 1891, Bd. VIII, Nr. 6, pag. 237.
379) Hoppe-Seyler, Virchow Archiv 1892, Bd. CXXVIII.
380) Huber, Über Tierversuche mit dem neuen Tuberkulin Kochs (TR). Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 7.
381) Hueppe, F., Über Heilung der Tuberkulose unter spezieller Berücksichtigung der neuen Methode von R. Koch. Wiener med. Presse 1890, Nr. 48.
382) Ders., Kochs Mitteilungen über Tuberkulin. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 12, pag. 46, Sep.-Ausg.
383) Hueppe, Ferd. und Scholl, Herm., Über die Natur der Kochschen Lymphe. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 4, pag. 8.
384) Hulot und Ramond, F., Action de la tuberculine sur le sang. Compt. rend. de la Soc. de Biol., pag. 736.
385) Hunter, William, On the nature action and therapeutic value of the active principles of tuberculin. British. med. Journal July 1891, Nr. 25.
386) Immermann, Korrespondenzbl. f. Schweizer Ärzte 1891, Nr. 1.
387) Irimesat, Ref. der Münchener med. Wochenschr. 1906, Bd. XXVII Nr. 2.
388) Irimescu, Die Reaktion der Paratuberkeln bei der experimentellen und menschlichen Tuberkulose. Ref. in der Münchener med. Wochenschr. 1906, Bd. III, Nr. 27.
389) Ders., Die Reaktionen der Paratuberkuline bei der experimentellen und menschlichen Tuberkulose. Revista stiintelor medicale, 1. Aug. 1905.
390) Irsai, A., Erfahrungen über das Kochsche Mittel bei Lungen- und Kehlkopftuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 6.
391) Israel, O., Bericht über die anatomischen Befunde an zwei mit dem Kochschen Heilmittel behandelten tuberkulösen Lokalerkrankungen. Berliner klin. Wochenschrift 1890, Nr. 48.
392) Iwanow, W., Die Resultate der Behandlung Tuberkulöser nach der Kochschen Methode in Jalta. Russk. Med. Nr. 26, 27, 28.
393) Ders., Petersburger med. Wochenschr., Russ. med. Lit. 1891, Nr. 7.
394) Jaboulay und Leclerc, La tuberculine TR dans la tuberculose chirurgicale et pulmonaire. Lyon med. 1898, pag. 393.
395) Jacobi, E., Histologische Untersuchungen über die Einwirkung des Kochschen Mittels auf Lupus. Centralbl. f. allgem. Pathol. und pathol. Anatomie 1891, Bd. II, Nr. 2.
396) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1891, pag. 387.
397) v. Jaksch, R., Über die Wirkung des Kochschen Heilmittels. Sitzungsber. des Vereins deutscher Ärzte in Prag, 28. Nov. 1890 (Wiener med. Presse).
398) Ders., Prager med. Wochenschr. 1891, Nr. 2.

399) Verhandlg. des X. Kongr. f. innere Medizin 1891.
400) Jarisch, A., Lupus vulgaris; Tod 36 Stunden nach Injektion von 2 mg Kochsche Lymphe. Wiener klin. Wochenschr. 1890, Nr. 3, pag. 50.
401) v. Jasinski, R., Pierwsze wyniki leczenia gruzlicy kostney metoda Koch'a. Gaz. Lekarska 1891, pag. 114.
402) Ders., Zur Behandlung der Knochentuberkulose mittels der Kochschen Flüssigkeit. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 11.
403) Jeffries, Boston med. and surg. Journ. 1891, Nr. 8.
404) Jessler, Prager med. Wochenschr. 1906.
405) Jez, Wiener med. Wochenschr. 1897, Nr. 30.
406) Joël, 2. Versammlung der Tuberkulose-Ärzte zu Berlin, 1904.
407) Johne, A., Tabellarische Zusammenstellung d. im Jahre 1892 mit Tuberkulin zu diagnost. Zwecken angest. Impfversuche.
408) Jolly, Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 6.
409) Jürgens, Deutsche med. Wochenschr. 1890 Nr. 52.
410) Ders., Experimentelle und klinische Untersuchungen über Tuberkulin. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie 1905, Heft 3, pag. 569.
411) Ders., Tuberkulinbehandlung und Tuberkuloseimmunität. Berliner klin. Wochenschrift 1905, Nr. 34.
412) Kaatzer, P., Zur Behandlung mit dem Kochschen Heilverfahren gegen Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 3.
413) Ders., Über das Kochsche Heilverfahren. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Sep.-Aufl.
414) Ders., Über 14 Dauerheilungen (Sitz.-Ber. d. V. d. Ä. v. Schaumbg.-Lippe 91) von Lungenschwindsucht nach Tuberkulinbehandlung. Zeitschr. f. Hyg. 1893, Bd. XIX, pag. 76.
415) Ders., Bericht über 5 Jahre Tuberkulinbehandlung bei Lungenschwindsucht. Deutsche Medizinalztg. 1896, Nr. 43, pag. 471.
416) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 39.
417) v. Kahlden, Histologische Untersuchungen über die Wirkung des Kochschen Heilmittels. Centralbl. f. allgem. Pathol. u. path. Anatomie 1891, Bd. II, Heft 4, 7.
418) Kahler, O., Wiener klin. Wochenschr. 1890, Nr. 49.
419) Ders., Peptonurie nach Injektionen des Kochschen Mittels. Wiener klin. Wochenschr. 1891, Bd. IV, Nr. 2.
420) Kalindéro, N. u. Babès, V., Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 14.
421) Dies., Résultats obtenus par les injections de lymphe de Koch dans les différentes formes de lèpre. Rév. de Méd. 1891, Tome XI, pag. 10.
422) Kanda, M., Vergleichende Studien über die Tuberkuline von Menschen- und Rindertuberkelbazillen bei der Diagnose der Rindertuberkulose. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. 1904, Bd. XLVII.
423) Kaposi, M., Wiener med. Presse 1890, pag. 1950.
424) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
425) Ders., Zur Behandlung des Lupus vulgaris mittels Kochscher Lymphe. Wiener klin. Wochenschr. 1891, Bd. IV, Nr. 4, 12.
426) Ders., Über die Behandlung von Lupus, Lepra und and. Hautkrankheiten mit Tuberkulin. Wien 1891.
427) Kappeler, O., Das Kochsche Heilverfahren im Spital Münsterlingen. Korrespondenzbl. f. Schweizer Ärzte 1891, Bd. XXI, Heft 9.
428) Kapralik und Erich v. Schrötter, Erfahrungen über die Wirkung der Einführung von Tuberkulin im Wege des Respirationsapparates. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 22.
429) Kartulis, Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 15.
430) Ders., Heilerfolge mit dem alten Tuberkulin. Festschrift für Rob. Koch, Jena 1903.
431) Kasan, Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 10.
432) Kaspareck, Th., Experimentelle Beiträge zur Tuberkulinwirkung und Tuberkuloseinfektion. Wiener klin. Wochenschr. 1897, Bd. X, pag. 26.
433) Kast, Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
434) Kernig, Petersberger med. Wochenschr. 1898, pag. 53.
435) Kinghorn, H. M., Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde, Bd. XXXII, pag. 767.
436) Ders., Action of pepsin digestion on tuberculin. Journ. of med. research. 1904, Vol. XII, Nr. 2, pag. 213.
437) Kitasato, Über die Tuberkulinbehandlung tuberkulöser Meerschweinchen. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1892, Bd. XII, Heft 3.
438) Klebs, A. C., The diagnostic therapeutic value of tuberculin and its derivates. Boston med. and surg. Journ. 1898, Nr. 5, 6. Febr.

439) Klebs, E., Die Zusammensetzung des Tuberkulins. Deutsche med. Wochensch. 1891, Nr. 45.
440) Ders., Über die Wirkung des Kochschen Mittels auf Tuberkulose der Tiere nebst Vorschlägen zur Herstellung eines unschädlichen Tuberkulins. Wiener med. Wochenschr. 1891, Nr. 15.
441) Klein, A., Ursachen der Tuberkulinwirkung. Beitr. z. klin. Med. u. Chir. Wien 1893, pag. 2.
442) Klemperer, G., Zeitschr. f. klin. Med. 1892, Bd. XX, pag. 165.
443) Klingmüller, Zur Wirkung abgetöteter Tuberkelbazillen und der Toxine von Tuberkelbazillen. Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 34.
444) Ders., Beiträge zur Tuberkulose der Haut. Archiv f. Dermat. u. Syphilis, Bd. LXIX, Heft 1, 2.
445) Kluge, R., Chemotaktische Wirkungen des Tuberkulins auf Bakterien. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1891, Bd. X, pag. 20.
446) Knopf, Pulmon. Tuberkulose. P. Blackiston's Sons and Co., Philadelphia 1899.
447) Ders., Les Sanatoria. 2me Edition. Paris 1900.
448) Ders., Die Früherkennung der Tuberkulose. Zeitschr. f. Tuberkulose u. Heilstättenwesen 1900, Nr. 3.
449) Koch, Rob., Weitere Mitteilungen über ein Heilmittel gegen Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Bd. XLVIII a. Extraausgabe.
450) Ders., Heilmittel gegen Tuberkulose, Leipzig 1891, Heft 8—10.
451) Ders., Fortsetzung der Mitteilungen über ein Heilmittel gegen Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 3; Wiener med. Blätter 1891, Nr. 4.
452) Ders., Weitere Mitteilungen über das Tuberkulin. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 43.
453) Ders., Neue Tuberkulinpräparate. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 14.
454) Ders., Die Ätiologie der Tuberkulose, 1884.
455) Ders., Weitere Mitteilungen über das Tuberkulin. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 43; Therap. Monatshefte 1891, Bd. XI, pag. 581; Wiener med. Blätter 1891, Nr. 44; Wiener med. Presse 1891, Nr. 43; Lancet, Vol. II. 18. Okt. 1891.
456) Ders., Über die Agglutination der Tuberkelbazillen und über die Verwertung dieser Agglutination. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 48.
457) Köhler, Mitteilungen über das Kochsche Heilverfahren der Tuberkulose bei chirurg. Krankheiten. Berliner klin. Wochenschr. 1890, Nr. 48, 51.
458) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 47.
459) Ders., Allgemeine Übersicht über die Anwendung der Kochschen Methode in der chirurg. Klinik der Charitee. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 24; Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 25.
460) Ders., Zur Tuberkulinfrage. Zeitschr. f. Tuberkulose 1904, Bd. V, Nr. 3.
461) Ders., Tuberkulin und Organismus, Jena 1905.
462) Ders., Über die Grundlagen zur Wertung des therapeutischen Effekts des Tuberkulins. Zeitschr. f. diätet. u. physik. Therapie 1905. Bd. IX.
463) Köhler, F. u. Behr, M., Über suggestives „Injektionsfieber" bei Phthisikern. Deutsches Archiv f. klin. Med. 1905, Bd. LXXXII, Heft 3, 4.
464) Köhler u. Westphal, Über die Versuche mit dem von Herrn Geheimrat Koch gegen die Tuberkulose empfohlenen Mittel. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 48a. Extraausgabe.
465) König, F., Bericht über die im Winterhalbjahr 1890/91 zur Beobachtung gelangten Organe von mit Tuberkulin behandelten Individuen. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 25 u. 27. Sep.-Abdr.
466) Ders., Klinisches Jahrbuch 1891, Ergänzungsband.
467) König u. Hildebrand, Klinisches Jahrbuch 1891, Ergänzungsband.
468) Königshöfer u. Maschke, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 2.
469) Köppen, Über die probatorische Tuberkulininjektion. Beitr. z. Klinik der Tuberkulose 1904, Bd. II, Heft 3.
470) Körte, Mitteilung in der Diskussion über den Vortrag des Herrn B. Fränkel. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 3.
471) Ders., Über die Anwendung des Kochschen Verfahrens bei Tuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1893, Nr. 79.
472) Köster, K., Bericht aus dem patholog. Institut in Bonn über die Wirksamkeit des Kochschen Heilmittels gegen Tuberkulose. Klinisches Jahrbuch 1891, Ergänzungsband.
473) Kohts, Therap. Monatshefte 1891, Nr. 4.
474) Kolle, W. u. Wassermann, A., Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. G. Fischer, Jena 1904.

475) Korach, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 3.
476) Korczynsky u. Adamkiewicz, Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
477) Kossel, H., Zur Frage des Nachweises von Tuberkelbazillen im Blut nach Tuberkulininjektionen. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 12.
478) Ders., Nochmals über den angeblichen Befund von Tuberkelbazillen im Blut nach Kochschen Injektionen. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 19.
479) Kossel, Weber u. Heuss, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Heft 1—3.
480) Kostenitsch, J., De l'évolution de la tuberculose provoquée chez les lapins par les bacilles morts et son traitement par la tuberculin. Arch. de méd. expérim. 1893, Tome V, 1. Janv.
481) Kosturin, S. D. und Krainsky, St. N. B., Über die vergleichende Wirkung der Fäulnisprodukte und der Toxine von Tuberkelbazillen und ihren Einfluß auf den Verlauf der experimentell hervorgerufenen Tuberkulose bei Tieren. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 21 u. 22.
482) Kraemer, C., Fortschritte der Tuberkulosebehandlung. Zeitschr. für Krankenpflege 1905, Nr. 5, pag. 161.
483) Ders., Die Häufigkeit der Tuberkulose des Menschen nach den Ergebnissen von Leichenuntersuchungen und Tuberkulinprüfungen und ihre Bedeutung für die Therapie. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh., Bd. L, H. 5.
484) Kraske, P., Über die Heilwirkung des Tuberkulins. Beitr. zur klin. Chirurgie 1891, Bd. VII, pag. 3.
485) Krause, Die Tuberkulintherapie in der ambulanten Behandlung und bei Fiebernden. Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 52.
486) Krause, H., Ein Fall von Lupus der Nase und Schleimhäute nach fünfwöchentlicher Behandlung mit Kochschem Tuberkulin. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 11.
487) Ders., Sechsjährige Erfahrungen bei der Behandlung der Tuberkulose nach R. Koch. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. 1899, Bd. XXXII, pag. 42.
488) Krause, P., Erfahrungen aus der Praxis über das Kochsche Tuberkulin. Deutsche med. Wochenschr. 1895, Nr. 108, 129.
489) Ders., Über den diagnostischen und therapeutischen Wert des Tuberkulins. Allgem. med. Centralztg. 1895, Nr. 43.
490) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1899, pag. 340.
491) Krause, P. F., Die Kochsche Behandlung der Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 21.
492) Kremser, II. Versamml. der Tuberkulose-Ärzte zu Berlin 1904.
493) Kressling, Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 6.
494) Kröger, Petersburger med. Wochenschr. 1891, Nr. 22.
495) Kromeyer, E., Histologisches über die Wirkung des Kochschen Heilmittels gegen Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 49.
496) Ders., Histologische Mitteilungen über die Wirkungsweise des Tuberkulins. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 8.
497) Krompecher, Recherches sur le traitement des animaux tuberculeux par la méthode de Landerer et sur la virulence des bacilles tuberculeux. Ann. de l'Institut Pasteur 1900, pag. 723.
498) Krüger, Neutuberkulin bei der Behandlung von Lungenschwindsucht. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 26.
499) v. Krynski, Przyczynek do zachowiania sie laseczników gruzliczych w lupus pod rolywem plynu Koch'a. Prezgl. Lekarska 1891, pag. 129.
500) Ders., Ein Beitrag zum Verhalten der Tuberkelbazillen bei Lupus unter Einwirkung des Kochschen Heilmittels. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 22.
501) Krzysztalowich, Fr., Kochs neues Tuberkulin (TR) bei Lupus vulgaris. Wiener med. Wochenschr. 1898, Nr. 2, 3.
502) Kühne, W., Erfahrungen über Albumosen und Peptone. V. Weitere Untersuchungen über die Proteine des Tuberkulins. Zeitschr. f. Biologie 1893, Bd. XII, pag. 221.
503) Kümmell, Beobachtungen mit dem Kochschen Heilmittel. Deutsche med. Wochenschrift 1891, Nr. 20.
504) Kurrer, A., Tod nach Tuberkulineinspritzung. Med. Korrespondenzbl. des Württembg. ärztl. Landesvereins 1904, Bd. 74, Nr. 18, pag. 366.
505) Kurz, E., Die Kochsche Behandlung der Tuberkulose in der chirurgischen Poliklinik zu Florenz. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
506) Lahrtz, H., Über Tuberkulininjektion mit besonderer Berücksichtigung der in der Greifswalder med. Universit. Klinik angestellten Versuche. Inaug.-Dissert. Greifswald 1898.
507) Landgraf, Tuberkulöse Geschwüre der Urethra mit Kochscher Flüssigkeit behandelt. Berl. klin. Wochenschr. 1891, Nr. 11.

508) Landmann, Hygien. Rundschau 1898.
509) Ders., Centralbl. f. Bakteriologie u. Parasitenkunde, Bd. XXVII, pag. 870.
510) Ders., Hygien. Rundschau 1900, Nr. 8.
511) Lange, Kochs Monatsschr. 1893, Bd. XVIII, pag. 97.
512) Lassar, Demonstration zum Kochschen Heilverfahren. Berlin. klin. Wochenschr. 1891, Nr. 5.
513) Ders., Über vorläufige Resultate mit dem Kochschen Tuberkulin. Dermatolog. Zeitschr. 1997, Bd. IV, pag. 4.
514) Lawrason-Browne, A study of the cases of pulmonery tuberculosis treated with tuberculin at the Adirondack Cottage-Sanatorium. Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd. VI.
515) Lazarus, Mitteilung in der Diskussion über den Vortrag des Herrn B. Fränkel: Über Anwendung des Kochschen Mittels bei Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, pag. 175.
516) Lehnert, Atteste über die Tuberkulinimpfung. Deutsche Landwirtsch. Presse 1900, pag. 308.
517) Ders., Centralbl. f. Bakteriologie u. Parasitenkunde, Bd. XXVII.
518) Leichtenstern, O., Mitteilung über das Kochsche Heilverfahren gegen Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 1.
519) Leik, Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 34.
520) Leloir, H., Remarques sur la nature tuberculeuse du lupus et son traitement par la lymphe de Koch. Arch. de Physiologie 1891, Ser. 5, Tome III, H. 1, pag. 243, Janvier.
521) Lenharz, Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 51.
522) Leo, Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 52.
523) Leser, E., Über die Erfolge der Tuberkulinbehandlung bei chirurgischer Tuberkulose der Kinder. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 47, 48.
524) Letulle und Perron, Presse médic. 1897, Nr. 69.
525) Levy, William, Bericht über die ersten nach der Methode des Herrn Geheimrath Dr. Koch behandelten Fälle von chirurg. Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 48a, Extraausgabe.
526) Lewin, Zur Behandlung der Tuberkulose mit dem Kochschen Verfahren. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
527) Ders., Wiener med. Presse 1890, pag. 1951.
528) v. Leyden, Berliner klin. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
529) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 12, 13.
530) Ders., Klin. Jahrbuch 1891, Ergänzungsband.
531) Lichtheim, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 7.
532) Liebe, Kurze Bemerkung über Tuberkulin. Arch. f. physik.-diätet. Therapie 1905, Heft 5, pag. 132.
533) Liebmann, V., Il Bacillo della tuberculosi nel sangue degli ammalati, trattati colla linfa di Koch. Lo Sperimentale 1891, Vol. XLV, H. 2, pag. 30.
534) Ders., Tuberkelbazillen im Blute von Kranken, die mit dem Kochschen Mittel behandelt wurden. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
535) Ders., Studien über das Kochsche Tuberkulin. Virchows Arch. 1896, Bd. CXLIV, Suppl., pag. 123.
536) Lindemann, L., Erfahrungen über das Kochsche Tuberkulin. Ann. des städt. Krankenkauses zu München 1894, pag. 219.
537) Linden, Fall behandlade med tuberculin. Finska läkaresällsk handl. 1891, Vol. XXXII, H. 10, pag. 891.
538) Lindner, H., Über die auf der chirurgischen Abteilung des Augusta Hospitals in Berlin mit der Kochschen Methode gemachten Erfahrungen. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 51.
539) v. Lingelsheim, Über die Wertbestimmung der Tuberkulosegiftpräparate. Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 37, pag. 583.
340) Lipari, Rif. med. 1891, Vol. VII, pag. 106, 107.
541) Ders., Relazione e studio sugli inoculati colla tubercolina. Arch. ital. di clin. med. 1892, Vol. XXXI, pag. 3.
542) Litten, Berlin klin. Wochenschr. 1891. Nr. 50.
543) Löffler, Über die Veränderung der Pathogenität und Virulenz pathogener Organismen durch künstliche Fortzüchtung in bestimmten Tierspezies und über die Verwendung solcher Organismen zu Schutzimpfungszwecken. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 31.
544) Loesch, A., Contribution au diagnostic de la tuberculose par la tuberculine. Arch. des Sc. biol. de St. Petersbourg 1896, Tome IV, Nr. 5.

545) Loewenstein, E., Über Resorption und Immunitätserscheinungen. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. 1905, pag. 341.
546) Ders., Über Septikämie bei Tuberkulose. Zeitschr. f. Tuberkulose u. Heilstättenwesen 1905, Bd. VII, pag. 6.
547) Ders., Die innerliche Darreichung des Alt-Tuberkulins. Zeitschr. f. Tuberkulose 1906, Bd. IX, H. 4.
548) Ders., Überempfindlichkeit und beschleunigte Reaktion. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 5.
549) Ders., Eiterzellen und Tuberkelbazillen. Zeitschr. f. Hygiene Bd. LV.
550) Loewenstein und Kaufmann, Die diagnostische Tuberkulinreaktion. Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd. IX.
551) Loewenstein und Rappoport, Über den Mechanismus der Tuberkulinimmunität. Zeitschr. f. Tuberkulose 1904, Bd. V, pag. 6.
552) Loewy, A., Die Wirkung der Kochschen Flüssigkeit auf den Stoffwechsel des Menschen. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
553) Longstreet, Klinische Ergebnisse mit Tuberkulin und seiner Modifikation, dem Antiphtisin Klebs, bei Lungenphthise. Transactions of the Amer. Assoc. 1896, Vol., XI, pag. 74.
554) Lom, R. Cranston, Tuberculin as an aid to diagnosis an treatment. Scottisch med. and surg. Journ., May 1905.
555) Lublinsky, Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 48.
556) Ders., Wiener med. Presse 1890, Nr. 58.
557) Lüdke, H., Beobachtungen über 100 mit altem Kochschen Tuberkulin behandelte Fälle. Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd IX, Heft 2.
558) Ders., Tuberkulinreaktion und Tuberkulinimmunität. Beitr. z. Klinik der Tuberkulose 1906, Bd. VI, Heft 2.
559) Lumniczer, Über Versuche mit dem Kochschen Mittel. Wiener med. Presse 1891, Nr. 5, 6, 7.
560) Lyneker, Zur Tuberkulinbehandlung. Vereinsbl. der Pfälz. Ärzte Oktob. 1891, Bd. VIII, pag. 208.
561) Madison, A report on tuberculins as a means of diagnos. Americ. Med. 20. Februar 1902.
562) Maës, Deutsche med. Wochenschrift 1890, Nr. 50.
563) Maffucci, A., und di Vesten, A., Experimentelle Untersuchungen über die Serumtherapie bei Tuberkulininfektion. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1896, Nr. 6, 7.
564) Ders., Weitere experimentelle Untersuchungen über die Serotherapie der Tuberkulose. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1899, Nr. 23.
565) Magdal, International. klin. Rundschau 1890. Nr. 50.
566) Magelson. M., A case of lupus of 11 years standing cured by the tuberculin treatment. Philadelphia Med. News 12. Sept. 1891, Vol. LIX.
567) Maksutow, A. M., Vorläufige Mitteilung über Immunisierungsversuche gegen Tuberkulose (russisch). Wratsch 1896, Nr. 51.
568) Ders., Über Immunisierung gegen Tuberkulose mittels Tuberkeltoxins. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1897, Nr. 8, 9.
569) Malas. New Orleans med. Journ. 1903, Nr. 5.
570) Malm, O., Om Tuberculin, Christiania 1894.
571) Maragliano, E., Rif. med. 1890, Vol. VI, Nr. 51.
572) Ders., La linfa Koch. Rif. med. 1891, Vol. VII, Nr. 1, pag. 296.
573) Ders., Heilung der Lungentuberkulose mittels des Tuberkuloseheilserums. Berliner klin. Wochenschr. 1895, pag. 689.
574) Ders., Gli accidenti cutanei che si possono avere nelle sieroterapia della tuberculosi. Rif. med. 1895, Vol. XI, pag. 288.
575) Ders., La cura della tuberculosi col siero antitubercolare. Garz. degli Osped 1897, Vol. XVIII, pag. 79.
576) Ders., Sur l'empoissonnement par la tuberculine. Compt. rend. de la Sic. de Biol. 1897, pag. 309 u. 561.
577) Marfan, A., De l'immunité conferée par la guérison d'une tuberculose locale pour phthisie pulmonaire. Archiv gén. Avril 1886, pag. 423, Mai, pag. 575.
578) Marchand, F., Bericht aus dem pathol. Institut zu Marburg über die Wirksamkeit des Kochschen Heilmittels gegen Tuberkulose. Klin. Jahrbuch, Berlin 1891, Ergänzungsband.
579) Marmorek, Alexander, Antituberculous serum and vaccine. Lancet 1903, Nr. 24, pag. 1642.
580) Ders., Effects de la luberculine injectée immédiatement après l'injection tuberculeuse. Compt. rend. soc. biol. 1903, Nr. 37, pag. 1650.

581) Martin, C. F. und Robins, G. D., On the diagnostic value of tuberculin. Brit. med. Journal 5. Febr. 1898.
582) Martins, Über das Auftreten von Polyurie nach Injectionen von Tuberculin. Deutsche med. Wochenschrift 1891, Nr. 13.
583) Matthes, M., Über die Wirkung einiger subkutan einverleibten Albumosen auf den tierischen, insonderheit auf den tuberkulos infizierten Organismus. Deutsches Archiv f. klin. Medizin 1894, Sep.-Abdr.
584) Ders., Über das Zustandekommen der fieberhaften Allgemeinreaktion nach Injektionen von Tuberkulin beim tuberkulösen Organismus. Centralbl. f. innere Medizin 1895, Be. XVI.
585) Matthes und Krehl, Deutsches Archiv f. klin. Medizin Bd. LIV.
586) Mayer. Berliner dermatol. Gesellsch., 7. Nov. 1897.
587) Mazzotti, L., Clin. med. Ital. 1901, Nr. 9.
588) Ders., Centralbl. f. innere Medizin 1902, pag. 319.
589) Mazzucchelli, A., Osservazioni sulla cura della tubercolose chirurgica con la linfa di Koch. Rif. med. 1891, Vol. VII, Nr. 71.
590) Meissen, In Handbuch der Therapie der Lungenschwindsucht von Schröder und Blumenfeld.
591) Ders., Die Tuberkulinprobe. Die Heilkunde 1903, Bd. VII, Heft 11.
592) Menzer, Zur Frage nach dem Wesen der Tuberkulinreaktion. Beiträge zur klin. Medizin. Festschrift für Senator z. 70. Geburtstag. Berlin 1904, pag. 221.
593) Merkel, Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 2.
594) Meschede, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 10, 11.
595) Metschnikoff und Rudenko, Recherches sur l'accoutumance aux produits microbiens. Annales Pasteur 1891, pag. 567.
596) Meyer, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 11.
597) v. Meyer, Edward, Deutsche med. Wochenschr. 1893, Nr. 9.
598) Michael, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 2.
599) Middendorp, W. H., Tuberkulin. Lancet 14. April 1892, Bd. I.
600) Mikulicz, Die bisherigen Erfolge des Kochschen Heilverfahrens gegen Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 10.
601) Ders., Klinisches Jahrbuch, Berlin 1891, Ergänz.-Bd.
602) Ders., Über die in der chirurg. königl. Klinik zu Breslau mit dem Kochschen Heilmittel gewonnenen Erfahrungen. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 19.
603) Mittetal, Fr., Thèse de Paris 1900.
604) Ders., Valeur de la tuberculine dans la diagnostic de la tuberculose de la première enfance. Paris 1900.
605) Mitulescu, Der Einfluß des neuen Tuberkulins auf den Zellstoffwechsel. Deutsche med. Wochenschr. 1902, pag. 697.
606) Ders., Die Ergebnisse der spezifischen Therapie in der chronischen ,Lungenschwindsucht. Zeitschr. f. Tuberkulose Bd. IX, Heft 3.
607) Moeller, A., Handbuch der Therapie der Lungenschwindsucht von Schröder und Blumenfeld.
608) Ders., Zweiter Jahresbericht der Heilstätte Belzig. Zeitschr. f. Tuberkulose 1902.
609) Ders., Dritter Jahresbericht der Heilstätte Belzig. Zeitschr. f. Tuberkulose 1903, Nr. 4.
610) Ders., Zur Frühdiagnose der Tuberkulose. Münchener med. Wochenschr. 1901 Nr. 50.
611) Ders., Über aktive Immunisierung gegen Tuberkulose. Zeitschr. f. Tuberkulose 1904, Bd. V, pag. 206.
612) Ders., Vierter Jahresbericht der Heilstätte Belzig. Zeitschr. f. Tuberkulose 1905, Bd. VII.
613) Moeller und Kayserling, Über diagnostische und therapeutische Verwendung des Tuberkulins. Zeitschr. f. Tuberkulose 1902, Bd. III, pag. 4.
614) Moeller, A., Löwenstein, E. und Ostrowsky, Une nouvelle méthode de diagnostic de la tuberculose pulmonaire par la tuberculine du Koch, Paris 1905.
615) Mongour und Buard, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1898, Nr. 39.
616) Morard, G., Traitement de la tuberculose experimentale par les injektions sous cutanées de serum artificiel à petites doses. Compt. rend. de la Soc. de Biol. pag. 335.
617) Morelle, De l'ancienne tuberculine de Koch comme moyen de diagnostic Presse méd, 1903. pag. 800, Nr. 51, 52.
618) Moreschi, Berliner kl. Wochenschr. 1906.
619) Morris, Malcolm, Derm. Soc. of London, 14. July 1897.
620) Morris, Malcolm und Whitefield, Arthur, 6 cases of lupus vulgaris treated by Koch's new tuberculin. Brit. med. Journal, 24. Juli 1897.

621) Mouton, J. M. C., Münchener med. Wochenschr. 1897, pag. 357.
622) Müller, R., Ein Fall von Erkrankung au akuter tuberkulöser Mittelohrentzündung während einer Kur mit Neu-Tuberkulin (TR). Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 541.
623) Münzer, Bemerkungen zur Tuberkulinbehandlung. Prager med. Wochenschr. 1903, pag. 145.
624) Muhlack, Lupus mit Tuberkulin behandelt. Berliner klin. Wochenschr. 1891. Nr. 25.
625) Naegeli, Virchows Archiv 160, pag. 426.
626) Nagel, Tausend Heilstättenfälle (Aus der Lungenheitstätte Kottbus). Beitr. z. Klinik der Tuberkulose Bd. V, Heft 4.
627) Napp, H. u. Gronoen, C., Über die Resultate der Tuberkulinbehandlung an der Bonner Hautklinik. Archiv f. Dermat. u. Syphilis 1898, Nr. 3.
628) Naumann, Über Tuberkulin als diagnostisches Mittel. Reichs-Med. Anzeiger 1992, Nr. 9.
629) Ders., Berliner klin. Wochenschr., Bd. L, pag. 41.
630) Naunyn, B., Verhandlungen d. Kongr. f. innere Med. 1891.
631) Ders., Bericht über die mit dem Kochschen Heilverfahren auf der med. Klinik zu Straßburg erzielten Erfolge. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 9. Sep.-Ausg.
632) Nauwebck, C., Pathologisch-anatomische Mitteilungen zu dem Kochschen Heilverfahren gegen Tuberkulose. Sitzungsber. d. Ver. f. wissenschaftl. Heilkunde zu Königsberg i. Pr. 2. Febr. 1891.
633) Ders., Über das Kochsche Heilverfahren gegen Tuberkulose. Deutsche med Wochenschr. 1891, Nr. 13.
634) Neisser, A., Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 5.
635) Ders., Über die Behandlung der tuberkulösen Haut- und Schleimaffektionen mit Tuberkulin. Verhandl. d. deutschen dermat. Ges. Kongr. 1891.
636) Ders., Einige Bemerkungen über den therapeutischen und diagnostischen Wert des Alttuberkulins. Therap. d. Gegenwart 1900, Nr. 1, pag. 22.
637) Neisser, E., Weitere Erfahrungen über Tuberkulinanwendung in Heilstätten. Bericht über die 2. Versamml. d. Tuberkulose-Ärzte zu Berlin 1904.
638) Neisser u. Kahnert, Aus der Beobachtungsstation. Zeitschr. f. Tuberkulose, Bd. III, pag. 2.
639) Neisser u. Pollak, Tuberkulosebüchlein des Stettiner Krankenhauses. Klinisches Jahrbuch. Berlin 1904. Ergänzungsband.
640) v. Nencki, v. Maczewski, v. Logucki, Presse méd. 1897, Nr. 46.
641) Neufeld, E., Deutsche med. Wochenschr. 1899, Nr. 13.
642) Ders., Centralbl. f. innere Med. 1899, pag. 545.
643) Neumann, E., Bericht über die Wirksamkeit des Kochschen Heilmittels gegen Tuberkulose aus dem pathologischen Institut zu Königsberg. Klinisches Jahrb. Berlin 1891. Ergänzungsband.
644) Neumann, J., Über die Einwirkung des Tuberkulins auf Lupus, Lepra, Syphilis und Psorias vulgaris. Wiener Klinik 1891, Nr. 5 u. 6.
645) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1891, Nr. 12.
646) Ders., Über die Wirkung des Tuberkulins. Wiener med. Blätter 1891. Nr. 48.
647) Neumann u. Schwerin, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 6.
648) Nicolaysen, J., Ein Fall von durch Kochsche Lymphe geheilter Tuberculosis genu. Norsk Magazin for Laegewid, pag. 177. Christiania 1893.
649) Niemann, F., Über Tuberkuloseheilserum. Münchener med. Wochenschr. 1897, Nr. 3.
650) van Niessen, Ein Protest gegen Kochs Tuberkulosierung. Wiener med. Wochenschrift 1902, Nr. 5.
651) Ninni, G., La linfa Koch nelle affezioni tuberculari chirurgiche. Giorn. de la Assoc. Napol. di Med. et Nat. 1893, Vol. III, H. 3 u. 4.
652) Nitta, Bull. of the college of agric. Tokia 1902.
653) Ders., Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkde., Ref. 1903, pag. 110.
654) Nocard, Ed., Bull. de l'acad. de méd. 1891, Nr. 40.
655) Ders., Ann. d'Hygiène publ. 1891, Nr. 5.
656) Ders., Ann. d'Hyg. publ. 1892, Nr. 5.
657) Ders., Gaz. de Paris 1895, Nr. 49.
658) Ders., Nouvelle tuberculine de Koch. Gaz. des Hôp. 1897, Nr. 62.
659) Northrup, W. P., The tuberculin test for the presence of tuberculosis. Presbyt. Hosp. Rep. 1898, Bd. III, pag. 271.
660) Nourney, Eine ungefährliche Methode der Tuberkulinanwendung und Versuch ihrer Begründung. Deutsche Medizinalzeitung. 1903, Nr. 14.

661) NOURNEY, Bakterielle Immunität und Tuberkulin. Deutsche Medizinalztg. 1904, Nr. 8.
662) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 1.
663) Ders., Das Tuberkulin, Hoffnungen und Enttäuschungen. Verhandl. d. Ges. Deutscher Naturforscher u. Ärzte zu Breslau 1904, II. Teil, 2. Hälfte.
664) OKA, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 12.
665) OLSHAUSLN, Klinisches Jahrbuch, Berlin 1891. Erg.-Bd.
666) OPPENHEIM, Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 3.
667) ORTH, J., Bericht aus dem pathol. Institut zu Göttingen über die Wirksamkeit des Kochschen Mittels. Klinisches Jahrbuch, Berlin 1891. Erg.-Bd.
668) OSGOOD, Boston med. and surg. Journ. 1894, Vol. CXXXI, pag. 3.
669) Ders., Boston med. and surg. Journ. 1895, Vol. CXXXII, pag. 14.
670) OSTROVSKY, E., Du traitement de la phtisie pulmonaire par le serum anti-streptococcique de Menzer, Steinheil, Paris 1903.
671) OTTO, R., Prüfungstechnische Erfahrungen bei der Wertbestimmung des Tuberkulins. Klinisches Jahrbuch 1904, Bd. XIII, Heft 1.
672) PANE, N., Modificazione osservata nei bacillide tubercolo durante la cura con la linfa del Koch 1891. Rif. med. 1891, Vol. III, Nr. 25.
673) PARDOE, JOHN G., Lancet 1905. 16. Dez.
674) PARHAM, New Orleans med. journ. 1903, Nr. 5.
675) PARKER, W. T., Serumtherapy in tuberculosis. Journ. of the Americ. med. Association, Vol. XXXII, pag. 73.
676) PAULY, 2. Versammlung der Tuberkulose-Ärzte zu Berlin 1904.
677) PÉAN, Bull. med. 1890, Nr. 95. Refer. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 51.
678) Ders., Traitement des tuberculoses chirurgicales par la méthode de Koch. Gaz. des Hôp. Nr. 138; Gaz. de Paris 1890, Nr. 49.
679) PEIPER, E., Über die Wirkung des Kochschen Mittels auf gesunde oder nicht tuberkulöse Individuen. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
680) PELS-LEUSDEN, FR., Histologische Untersuchungen tuberkulöser Knochen- und Gelenkaffektionen sowie zweier Fälle von Lupus und Lupus erythematodes nach Tuberkulinbehandlung mit Berücksichtigung der Veränderungen durch Jodoforminjektionen. Aus d. pathol. Institut zu Marburg. Marburg 1891.
681) PETERS, Boston med. and surg. Journ. 1894, Nr. 3.
682) Ders., Zur TR-Behandlung. Münchener med. Wochenschr. 1897, Nr. 45.
683) PETERSEN, O. W., Über die Wirkung des Tuberkulins Kochs auf gesunde Tiere. Wratsch 21. Petersburger med. Wochenschr. Russ. med. Lit., Nr. 6, 1891.
684) Ders., Klinisches Jahrbuch, Berlin 1891. Erg.-Bd.
685) PETERSSON, O. V., Om tuberculinprofvet och tidigdiagnosen af lungtuberculos. Upsala Läkarefören, förhandl. 1904, N. F., Bd. IX.
686) PETRUSCHKY, J., Deutsche med Wochenschr. 1899, Bd. XXVIII, Nr. 16.
687) Ders., Über die fragliche Einwirkung des Tuberkulins auf Streptokokkeninfektionen. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. 1895, pag. 450.
688) Ders., Über die Behandlung der Tuberkulose nach Koch. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 39 u. 40.
689) Ders., Bemerkungen zu den Versuchen des Stabsarzt Dr. Huber mit Neutuberkulin. Berliner klin. Wochenschr. 1898, pag. 259.
690) Ders., Zur Kochschen Tuberkulinbehandlung. Tuberkulosekongreß Berlin 1899.
691) Ders., Internat. Ärztekongreß zu Moskau: Über die Behandlung der Tuberkulose nach Koch. Leipzig 1900.
692) Ders., Über Heilstätten und Tuberkulosebehandlung. Leipzig 1901.
693) Ders., Festschrift für Robert Koch. Jena 1903.
694) Ders., Die spezifische Behandlung der Tuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1899, Nr. 51 u. 52, pag. 1120 u. 1141.
695) Ders., Zur Kochschen Tuberkulinbehandlung. Gesundheit, Nr. 11, pag. 201.
696) Ders., Die Heilung der Tuberkulose; ihre Feststellung und Nachprüfung. Leipzig 1904.
697) Ders., Der gegenwärtige Stand der Tuberkulosebehandlung. Leipzig 1904.
698) Ders., Kochs Tuberkulin und seine Anwendung beim Menschen. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Heft 188.
699) Ders., Kriterien und Kontrolle der Heilung der Lungentuberkulose. G. Fischer, Jena 1905.
700) Ders., Beobachtungen über Ehen und Nachkommenschaft Tuberkulöser, die mit Tuberkulin behandelt wurden. Zeitschr. f. Tuberk. 1904, Bd. VI.
701) PFEIFER, E., Zur Tuberkulin- und Antitoxinbehandlung. Korrespondenzbl. d. allgem. ärztl. Vereins f. Thüringen 1897, Nr. 15.

702) Pfeifer, W., Zeitschr. f. prakt. Ärzte. 1897, Nr. 15.
703) Pfuhl, E., Zeitschr. f. Hyg. 1891, Bd. XI, Heft 2.
704) Ders., Beitrag zur Behandlung tuberkulöser Meerschweinchen mit Tuberkulinum Kochii. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1892, pag. 241.
705) Philip, R. W., Personal impressions of Koch's treatment at Berlin, with early notes of cases treated in the Royal Infirmary of Edinburgh. Transact. of the med. chir. Soc. of Edinburgh 1891, N. S., Vol. X, pag. 31.
706) Philippi, H., Die Lungentuberkulose im Hochgebirge. Enke, Stuttgart 1906.
707) Pick, F. J., Vorläufige Mitteilungen über die Versuche mit dem Kochschen Mittel an der K. K. dermat. Klinik zu Prag. Prager med. Wochenschr. 1890, Nr. 52.
708) Ders., Wiener med. Wochenschr. 1891, Nr. 5.
709) Pickert, Über den Wert der Tuberkulindiagnostik für die Lungenheilstätten. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 43.
710) Ders., 2. Vers. der Tuberkulose-Ärzte zu Berlin 1904 und Zeitschr. für Tuberkulose und Heilstättenwesen, Bd. IV.
711) Ders., Zur Tuberkulindiagnose in den Heilstätten. Zeitschr. f. Tuberkulose 1902, Bd. IV.
712) Pirquet, C. v., u. Schick, B., Überempfindlichkeit und beschleunigte Reaktion. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 2.
713) Poissenot, L., Valeur diagnostique de la tuberculine R; quelques remarques sur la réaction thermique. Thèse de Paris 1905.
714) Poncet, A., La lymphe de Koch dans les polyadénites tuberculeuses. Lyon méd. Jan. 1891, pag. 75.
715) Ders., De la lymphe de Koch comme réactif des tuberculoses chirurgicales. Lyon méd. Férrier 1891, pag. 151.
716) de Ponthière, Ann. mal. oreille 1903, Nr. 8.
717) Popoff, P. M., Das Kochsche Heilmittel nach Versuchen an Tieren. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 35.
718) Pöppelmann, Die Behandlung der Lungenschwindsucht mit Bazillenemulsion Koch. Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 36.
719) Porges, Alexand., Das Tuberkulin bei tuberkulösen Hautaffektionen. Wiener klin. Wochenschr. 1898, Nr. 13.
720) Port, Conrad, Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 30 u. 40.
721) Ders., Über die Wirkung des Tuberkulinum Kochii bei Lupus nach den Beobachtungen an der Münchener chirurg. Klinik. Münchener med. Abhandl. 3. R. 2. München 1892.
722) Pospelow, A. J., Einige Daten aus den Beobachtungen über Lupusbehandlung mittels Tuberkulinum Kochii. Westn. obschtsch. gig. ssud. i. pract. med. Okt. 1891; Petersburger med Wochenschr.; Russ. med. Lit. 1892, Nr. 2.
723) Pottenger, Cultur products in the treatment of tuberculosis. Therap. Gaz. 1902, Vol. 26.
724) Ders., Specific medication in pulmonary tuberculosis. Zeitschr. f. Tuberkulose 1904, Bd. VI.
725) Preisich, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkde. Bd. XXXI, pag. 712.
726) Preisich u. Hein, Über das Wesen der Tuberkulinreaktion. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkde. 1902, pag. 713.
727) Prior, J., Das Kochsche Heilverfahren gegen Tuberkulose in seiner Einwirkung auf den gesamten Organismus und den Sitz der Erkrankung. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 3—7.
728) Prudden u. Hodenpyl, New York med. Journ. 1891.
729) Purjesz, S., Über die Gefährlichkeit des Tuberkulins, mit Bemerkungen über die Ätiologie der Tuberkulose. Ungarisches Archiv f. Medizin 1892, Bd. I, Heft 3 u. 4.
730) Quincke, Klinisches Jahrbuch. Berlin 1891. Erg.-Bd.
731) Radigner, P., Rôle des toxins tuberculeuses locales dans le processus tuberculeux; la tuberculose maladie d'intoxication surtout locale (étude de pathologie générale). Thèse de Paris 1905.
732) Ramond, F. u. Ravout, P., Sur me nouvelle tuberculine. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1898, pag. 587.
733) Ranke, H. v., Über Tuberkulinwirkung im Kindesalter. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 42 u. 43.
734) Rappin u. Fortiveau, Recherche de la réaction de la tuberculine dans l'urine des tuberculeux. Assoc. franç. pour l'avancement des sciences. Sept. 1899.
735) Raude, Albert, Über einige mit Tuberkulin R Behandelte. Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 7.

736) RAUDI, ALESSANDRO, Modificazioni osservate nei bacilli tubercolari durante la cura con la linfa die Koch. Rif. med. 1891, Nr. 52.
737) RAW, NATHAN u. HILL, ABRAM JOHN, The treatment of tuberculosis by tuberculin. Lancet. 23. Juli 1890.
738) REINERT, Württembergisches Correspondenzblatt 1897, Nr. 46.
739) REINHOLD, H., Klinische Erfahrungen über die Behandlung mit dem neuen Tuberkulin TR. Münchener med. Wochenschr. 1898, Nr. 22.
740) REMBOLD, Zeitschr. f. Hyg., Bd. XXVI, pag. 192.
741) RENNERT, Tonsillartuberkulose, ein weiterer Beitrag zur Behandlung mit Neutuberkulin. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 3.
742) RENVERS, V., Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 18.
743) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1892, Nr. 12.
744) REUCHLIN, H., Über Erfahrungen mit dem Kochschen Tuberkulin. Klinische Monatsbl. f. Augenheilk. 1906, pag. 352.
745) RÉVILLIOD, Révue méd. de la Suisse rom. 1891, Nr. 5.
746) RHYN, VAN, Journ. méd. de Bruxelles 1898, Nr. 35.
747) Ders., Centralbl. f. innere Med. 1898, pag. 545.
748) RIBBERT, H., Mitteilungen über das Kochsche Heilverfahren. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 52.
749) Ders., Die Wirkung des Tuberkulins und die nach Anwendung desselben bisher erhaltenen pathologisch-anatomischen Befunde. Deutsche med. Wochenschrift 1892, Nr. 16.
750) RIEGNER, O., Bericht über meine Erfahrungen mit dem Kochschen Mittel bei chirurgischer Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 9.
751) RIEHL, G., Über histologische Veränderungen an tuberkulöser Haut nach Anwendung der Kochschen Injektionen. Wiener klin. Wochenschr. 1890, Nr. 51.
752) RIEMER, BR., Ein Fall chirurgischer Tuberkulose durch Tuberkulin geheilt. Deutsche Zeitschr. f. Chirurgie 1892, Bd. XXXIV, pag. 357.
753) RINDFLEISCH, V., Die histologischen Heilungsprozesse tuberkulöser Schleimhautgeschwüre unter Kochscher Behandlung. Sitzungsber. der physik.-med. Ges. zu Würzburg 1891, Heft 2, pag. 20; Deutsche med. Wochenschr. 1891, Bd. XVII.
754) ROBERTS, LESLIE, Klinische Beobachtungen über die Wirkung von Tuberkulin auf Lupus. Monatsschrift f. prakt. Dermat. 1891, Bd. XIII, Nr. 5.
755) ROEMER, FR., Berliner klin. Wochenschr.
756) Ders., Tuberkulinreaktion durch Bakterienextrakte. Wiener klin. Wochenschr. 1891, Nr. 45.
757) Ders., Beiträge z. exper. Therap. 1903, Nr. 6.
758) ROEPKE, Das Tuberkulin in der Behandlung der Kehlkopftuberkulose. Beitr. z. Klinik der Lungentuberkulose, 1905, Bd. IV, Heft 1.
759) Ders., Tuberkulosis 1902, pag. 104.
760) Ders., 2. Vers. d. Tuberkulose-Ärzte zu Berlin 1904.
761) ROSENBACH. O., Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 49.
762) Ders., Vers. d. schles. Ges. f. natürl. Kultur zu Breslau 1891.
763) Ders., Grundlagen, Aufgaben und Grenzen der Therapie. Wien u. Leipzig 1891.
764) Ders., Einige Gesichtspunkte zur Beurteilung des Kochschen Verfahrens, nebst Bemerkungen über den Einfluß antipyretischer Maßnahmen auf das Reaktionsfieber. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 8.
765) ROSENBERGER, Beobachtungen bei Behandlung von Phthisikern mit Tuberkulin. Centralbl. f. innere. Medizin 1903, Nr. 13 u. 19.
766) Ders., Münchener med. Wochenschr. 1903, Bd. I, pag. 872.
767) ROSENTHAI, O., Weitere Mitteilungen über die Behandlung des Lupus nach Koch. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 6.
768) ROSI, ULISSE, Sugli effeti della tubercoline. Arch. ital. di Clin. méd. 1894, Nr. 2.
769) ROSSMANN, Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 34.
770) RÓTH-SCHULZ, Über den diagnostischen Wert des alten Kochschen Tuberkulins. Beitr. z. Klinik der Tuberkulose 1906, Bd. VI, Heft 2.
771) RUCK, CARL V., Contribution to the treatment of pulmonary tuberkulosis with Prof. Koch's Tuberculin. Therap. Gaz. 1893, Nr. 6.
772) Ders., The results in 90 cases of pulmonary tuberculosis treated the Wingat Sanitarium at Asherville N.C. with a comparison of results obtained with or without the use of tuberculin. Med. News 1893, Nr. 12.
773) Ders., The clinical value of the culture products of the bacillus of tuberculosis. Therap. Gaz. Juni 1897, pag. 388; 1899, 1902.
774) Ders., Münchener med. Wochenschr. 1899, pag. 533.

775) Ruck, Carl, v., Über Immunisierung gegen Tuberkulose. Zeitschrift für Tuberkulose 1906, Bd. VIII.
776) Rumpf, Vorläufiger Bericht über 60 nach der Methode von R. Koch behandelte Krankheitsfälle. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 3.
777) Ders., 2. Vers. d. Tuberkulose-Ärzte zu Berlin 1894.
778) Ders., Über Anstaltsbehandlung Lungenkranker aus der versicherten Bevölkerung. Zeitschr. f. Tuberkulose Bd. III, Heft 1.
779) Ruetimeyer, L., Ein Fall von akuter Meningitis tuberkulosa nach Kochscher Behandlung einer Phthisis pulmonum. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 5.
780) Rydygier, L., Mitteilungen über das Kochsche Heilverfahren bei Tuberkulose. Wiener klin. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
781) Sacerdotti, Cesare, Sulla pretesa comparsa dei bacilli tubercolari nel sanque dei curati con la linfa di Koch. Rif. med. 1891, Nr. 145.
782) Sahli, Korrespondenzblatt f. Schweizer Ärzte (Beraneksches Tuberkulin) 1906, Nr. 13.
783) Saksch, v., Prager med. Wochenschr. 1891, Nr. 1 u. 2.
784) Salomonsen, C. J. u. Tscherning, E. A., Bibliothek for Laeger, 1891.
785) Salter, Alfred, The elimination of bacterial toxins bymeans of the skin, with especial reference the presence of tuberculin in the sweat of phthisical patients. Lancet, 15. Jan. 1898.
786) Samuel, Über die Prinzipien der Kochschen und der Liebreichschen Tuberkulosebehandlung. Sitzungsbericht des Vereins für wissenschaftl. Heilkunde. Sitzung vom 16. III. 1891. Deutsche med. Wochenschr. 1891.
787) Sandberg, Brit. med. Journ. 1896, Vol. II, pag. 1108.
788) Sarcharjin, G. A., Über die Behandlung der Tuberkulose mit Tuberkulin. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 30.
789) Saruntowski, v., Beiträge zur Tuberkulose von „Wolff“ in Görbersdorf. Wiesbaden 1891.
790) Sattler, H., Über die Wirkung des Tuberkulins auf die experimentelle Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 1 und 2.
791) Ders., Über die Behandlung der verschiedenen Formen der Konjunktivaltuberkulose mit Tuberkulin nebst experimentellen Untersuchungen über die Wirkung derselben. Sitzungsbericht der Heidelberger Ophthalmol.-Vers. 1891, pag. 33.
792) Sawyer, The use of specific products of tubercle bacilli in the treatment of tuberculosis. Zeitschr. für Tuberkulose- und Heilstättenwesen 1905, Bd. VIII, pag. 3.
793) Schäfer, Erfahrungen über die Behandlung mit Tuberkulin im Kgl. Zuchthause Kaisheim. Münchener med. Wochenschr. 1893, Nr. 34.
794) Schaffranek, Ein Fall von Lupusheilung durch Tuberkulininjektion und gleichzeitige innerliche Verabreichung von Hydrarg. bichlor. corrosianu. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 43.
795) Schede, M., Zur Behandlung des Lupus mit Kochschen Injektionen. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 49.
796) Ders., Über die Erfolge des Kochschen Verfahrens bei der Behandlung der chirurgischen Tuberkulose. Vortrag vom XX. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie vom 20. April 1891. Sep.-Ausg.
797) Scheube, Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 36.
798) Scheuber, A., Über die therapeutische Verwendung des Tuberkulins R. Arch. für Dermat. und Syphilis 1898, Bd. XLII, pag. 215, 378.
799) Schick, Bela, Die diagnostische Reaktion im Kindesalter. Jahrbuch für Kinderheilkunde 1905, Bd. LXI, Heft 6.
800) Schieck, Franz, Klinische und experimentelle Studien über die Wirkung des Tuberkulins auf die Iristuberkulose. Gräfes Archiv, Bd. L, pag. 2.
801) Ders., Archiv für Ophthalmologie, Bd. L. Sep.-Ausg.
802) Schiess, Bey und Kartulis, Uber die Resultate von 48 mit Tuberkulin behandelten Tuberkulösen. Zeitschr. für Hyg. 1893, Bd. XV, pag. 229.
803) Schiller, Wiener klin. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
804) Schimmelbusch, C., Mikroskopische Befunde bei Tuberkulose der Haut und der sichtbaren Schleimhäute nach Anwendung des Kochschen Mittels. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 6.
805) Schlossmann, Verhandl. der Gesellschaft für Kinderheilkunde. Karlsbad 1902.
806) Schlüter, Rob., Über den diagnostischen Wert der Tuberkulinreaktion. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 8.

807) SCHMIDT, ADOLF, Bemerkungen zur Diagnose der Lungenschwindsucht. Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 40.
808) SCHMIDT, HANS, Erster Bericht über die Behandlung der Tuberkulose nach Koch. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 1.
809) SCHMORL und GEIPEL, Verhandl. der pathologischen Gesellschaft 1904.
810) SCHNABEL, Centralbl. f. die gesamte Therapie, Oktober 1897.
811) SCHNEIDEMÜHL, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 46.
812) SCHNEIDER, J., Tuberkulose und Tuberkulin. Memorabilien 1891, Bd. XXXV, pag. 4.
813) Ders., Tuberkulinversuche am pharmakologischen Institut der tierärztl. Hochschule zu München. Jahresber. der tierärztl. Hochschule zu München 1896/97, pag. 73.
814) SCHNEIDER, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 10, 11.
815) SCHNITZLER, Wiener klin. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
816) SCHNOELLER, Theoretisches und Praktisches über Immunisierung gegen Tuberkulose nebst Statistik über 211 mit Denysschem Tuberkulin behandelten Lungenkranken. G. F. Schmidt, Straßburg i. E. 1905.
817) SCHOELER, Zweite Versammlung der Tuberkulose - Ärzte zu Berlin 1904.
818) SCHRADER, Jahresbericht der Heilstätte Loslau 1901.
819) Ders., Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten 1903, Bd. XLIII.
820) SCHREIBER, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 8.
821) Ders., Ref. Med. der Gegenwart 1898, Nr. 2.
822) Ders., Tuberkulinversuche bei älteren Kindern und Neugeborenen. Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 51.
823) SCHRÖDER, G., Über das neue Tuberkulin. Münchener med. Wochenschr. 1897, Nr. 29.
824) Ders., Zeitschr. f. Tuberkulose 1902, Bd. III, Heft 4.
825) Ders., Jahresbericht der Heilstätte Schömberg, Stuttgart 1904.
826) Ders., Zeitschr. f. Tuberkulose 1905, Bd. VI, Heft 5.
827) SCHÜLE, Über die probatorische Tuberkulininjektion. Beitr. z. Klinik der Tuberkulose 1903, Bd. II, Heft 1, pag. 69.
828) SCHÜLER, Jahresbericht d. Heilstätte Waldbreitbach 1903.
829) SCHULTZE, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 1.
830) Ders., Kurze Mitteilung über das neue Kochsche Tuberkulin. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 28.
831) SCHURIG, Über die diagnostische und therapeutische Anwendung des alten Tuberkulins in der Armee. Verh. d. Ges. deutscher Naturf. und Ärzte, Kassel 1903, Teil 2, Hälfte 2, pag. 446.
832) Ders., Über die diagnostische Anwendung des alten Tuberkulins. Deutsche militärärztl. Zeitschr. 1903, Heft 10, pag. 699.
833) DE SCHWEINITZ, E. A., The attenuated bacillus tuberculosis, its use in producing immunity to tuberculosis in guinea-pigs. Med. News 1894, Bd. LXV, pag. 23 (Dec.).
834) DE SCHWEINITZ, E. A. und DORSET, MARION, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1896.
835) Ders., Some products of the tuberculosis bacillus and the treatment of experimental tuberculosis with antitoxic serum. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1897, Nr. 8, 9.
836) SCHWIMMER, ERNST, Die Behandlung mit Kochscher Lymphe vom dermatologischen Standpunkte aus beurteilt. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 1.
837) SCIALLERO, Il Polichinico 1904, Nr. 66.
838) SECHI, F., Di un caso di lupus eritematoso guarito con le iniezoni ipodermiche di tubercolina Koch. Rif. med. 1893, Vol. IX, pag. 169.
839) SEELIGLANN, L., Über einen Fall von Genital- und Hauttuberkulose behandelt mit Tuberkulinum R. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 30.
840) SEEMANN, Plyn Koch'a w chorobach chirurgicznych. Gazeta Lekarska 1891, pag. 8.
841) SEHRWALD, ERNST, Hautnekrose nach Tuberkulininjektion. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 39.
842) SEIBERT, A., Zur Anwendung des neuen Tuberkulins. New Yorker med. Monatsschr. Juni 1897, Bd. IX, pag. 6.
843) SEILER, F., Les nouvelles tuberculines du Dr. Koch. Schweizer Wochenschr. f. Chemie und Pharmakol. 1897, Nr. 22.
844) SEMMER, E., Sur la valeur diagnostique de la malléine et de la tuberculine. Archiv des Scienees biol. de St. Petersbourg 1894, Tome III, pag. 2.
845) SEMMOLA, Die Serumtherapie der Tuberkulose. Wiener med. Presse 1896, Nr. 3.
846) SENATOR, Klinisches Jahrbuch Berlin 1891, Ergänzungsband.
847) SENN, N., Away with Koch's lymph. Philadelphia med. News Juni 1891, Nr. 23.

848) Servaes, C., Bemerkungen über die Gefährlichkeit der probatorischen Tuberkulinimpfung. Beitr. z. Klinik der Tuberkulose 1904, Bd. II, Heft 3, pag. 243.
849) Seydel, Mitteilungen über das Kochsche Heilverfahren aus der chirnrg. Abteilung des kgl. Garnisonlazarettes München. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 11.
850) Siegmund, P., Zur Stellung des Arztes zur Tuberkulinbehandlung. Therap. Monatshefte 1891, Bd. V, pag. 8.
851) Singer, Gustav, Zur Behandlung des Lupus mit Kochschen Injektionen. Wiener klin. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
852) Ders., Wiener med. Presse 1890, Bd. XXXI.
853) Sirot, Oct., Sérothérapie, diagnostic précore de la tuberculose. Gaz. des Hôp. 1897, Nr. 132.
854) Slawyk, Die bisherigen Erfahrungen mit Tuberkuline R auf der Kinderstation der Charité. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 34.
855) Smidt, Beiträge zur Beurteilung der Tuberkulinreaktion. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 18.
856) Sobernheim, G., Immunität bei Milzbrand, im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann. Gustav Fischer, Jena 1904.
857) Ders., Korrespondenzbl. f. Schweizer Ärzte 1891, Nr. 1.
858) Sokolowsky, A., Gruzlicze owrzodzemie wargi leczone pynem Koch'a. Gazeta Lekarska 1891, pag. 468.
859) Sömme, J., Det mye tuberculin, dets virkemaade og dosering. Norsk Mag. 4. R. 1898, Vol. XIII, pag. 1.
860) Sonnenburg, E., Das Kochsche Heilverfahren kombiniert mit chirurgischen Eingriffen. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 1, 3. — Wiener med. Blätter 1891, Nr. 2.
861) Ders., Weitere Mitteilungen über die chirurgische Behandlung der Lungencavernen. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 6.
862) Spengler, Korrespondenzbl. f. schweizer Ärzte 1897, pag. 604.
863) Ders., Korrespondenzbl. f. schweizer Ärzte 1898, pag. 140.
864) Ders., Tuberkulinbehandlung im Hochgebirge Davos. Richtersche Buchdr 1900.
865) Spengler, C., Vorläufige Mitteilung über eine kombinierte Tuberkulin-Tuberkulocidinbehandlung. Deutsche med. Wochenschr. 1892, Nr. 14, Sep.-Ausg.
866) Ders., Resultate einer kombinierten Tuberkulin-Tuberkulocidinbehandlung. Verhandl. des XI. Kongresses für innere Medizin 1892, pag. 420.
867) Ders., Über die Behandlung tuberkulöser Meerschweinchen mit Originaltuberkulin. Zeitschr. für Hyg. u. Infektionskrankheiten 1897, Nr. 2.
868) Ders., Ein Beitrag zur Tuberkulinbehandlung mit TR. Deutsche med. Wochenschrift 1897, Nr. 36.
869) Ders., Über Tuberkulinbehandlung. Davos 1897.
870) Ders., Zur Diagnose der geschlechtlichen Tuberkulose. Davos 1900.
871) Ders., Klassenstadieneinteilung der Lungentuberkulose und Phtise und über die Tuberkulinbehandlung. Festschrift für Robert Koch, Jena 1903.
872) Ders., Ein neues immunisierendes Heil-Verfahren der Lungenschwindsucht mit Perlsuchttuberkulin. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 31, 34.
873) Spiegel, Albert, Erfahrungen mit dem neuen Tuberkulin TR. Münchener med. Wochenschr. 1897, Nr. 51.
874) Springthorpe, J. W., A plea for the re-use of tuberculin. Glasgow med. Journ. 1896, Nr. 5. Nov.
875) Starck, H., Zur Behandlung mit Tuberkulin R. Münchener med. Wochenschrift 1898, Nr. 17.
876) Staub, Alfred, Beitrag zur Anwendung des Tuberkulins bei Lupus erythematodes und Lupus vulgaris. Archiv für Dermat. u. Syphilis 1891, Nr. 5.
877) Steele, J. Dutton, A review of the literature of Koch's tuberculin R. Proced of the pathol. Soc. of Philad. 1898, Vol. I, pag. 3. Januar.
878) Stempel, Hermann, Über Versuche mit dem neuen Tuberkulin. Münchener med. Wochenschr. 1897, Nr. 48.
879) Stepanow, Anwendung des Tuberkulins in der Praxis. St. Petersburger Archiv für veterin. Med. 1893, Bd. II, pag. 231.
880) Stern, Max, Zur Frage der „Tuberkelbazillen im Blute nach Tuberkulininjektionen". Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 23.
881) Sternberg, Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung toter Tuberkelbazillen. Centralbl. für allgem. Pathologie u. pathol. Anatomie 1902, Nr. 19.
882) Sternthal, Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte. Braunschweig 1897.
883) Stinzing, Münchener med. Wochenschr. 1891, pag. 167.

884) Straus, Über die Wege zur Frühdiagnose der Lungentuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1900, Nr. 25.
885) Strauss und Gamaleia, Arch. de méd. expérim. 1891, Nr. 6.
886) Strauss und Teissier, Sem. méd. 1893, pag. 364.
887) Dies., Congr. pour l'étude de la tuberculose 1893.
888) Stroebe, H., Über die Wirkung des neuen Tuberkulins TR auf Gewebe und Tuberkelbazillen. Experimentelle Untersuchungen, Jena 1898.
889) Sutherland, Journ. of Tuberculose 1899. Juli.
890) Tangl, F., Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 19. Sep.-Ausg.
891) Tauszk, Fr., Kochs Tuberkulin R. Ungarische med. Presse 1898, Bd. III, pag. 4.
892) Tavel, Korrespondenzblatt für Schweizer Ärzte 1888, Nr. 10.
893) Ders., Über das Tuberkulin. Korrespondenzblatt für Schweizer Ärzte 1898, pag. 481.
894) Taylor, G. G. Stopford, Short notes on the treatment of lupus vulgaris with TR-tuberculin. Brit. med. Journ. 1898. Nr. 9. Juli.
895) Terre, L. B., Recherches expérimentales sur la valeur diagnostique du sérum artificiel dans la tuberculose. Gaz. des Hôp. 1898, Nr. 82.
896) Ders., Kongr. Dijon 1902. Ref. Centralbl. für Bakt. u. Paras. 1903, Bd. XXXIII.
897) Thibierge, Le traitement du lupus vulgaire par les injections de lymphe de Koch. Ann. de Dermat. et de Syph., 3. Sér. 1890, Tome I, pag. 12.
898) Thiersch, Bericht über das Kochsche Mittel und Vorstellung von Kranken. Münchener med. Wochenschr. 1890, Nr. 21.
899) Thomas, Verhandl. d. Kongr. f. innere Med. 1891.
900) Thorner, Ed., Über die Tuberkulinbehandlung eines an Syphilis und Tuberkulose leidenden Kranken. Deutsche med. Wochenschr. 1892, Nr. 25.
901) Thorner. M., The treatment of tuberculosis laryngitis with modified tuberculin. Med. News, Jan. 1898, Vol. LXII, pag. 88—90.
902) Ders., Über den Gebrauch des Tuberkulins in vorgeschrittenen Fällen von Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1893, Nr. 37.
903) Tizzoni, G. und Centanni, E., Sull' esistenza di un principio immunizzanti contro la tubercolose nel sangue di animali sottoposti alla cura di Koch. Rif. med. 1891, Vol. VII, pag. 283.
904) Ders., Über das Vorhandensein eines gegen die Tuberkulose immunisierenden Prinzips im Blute von Tieren, welche nach der Methode von Koch behandelt worden sind. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk 1892, Bd. XI, pag. 82.
905) Trendelenburg, Klinisches Jahrbuch Berlin 1891, Ergänzungsband.
906) Trojanow, A. A., Über die Behandlung der Tuberkulose nach dem R. Kochschen Verfahren. Boln. gas. Botk. 20—27, Petersburger med. Wochenschr., Russ. med. Literatur 1891, Nr. 7.
907) Trudeau, E. L. und Baldwin, E. R., The need of an improved technic in the manufacture of Koch's TR-tuberculin New York med. News 28. Aug. 1897.
908) Ders., A resume of experimental studies on the preparation and effects of antitoxic serum in tuberculosis. Transact. of the Assoc. of Amer. Phys. 1898.
909) Ders., Experimental studies on the preparation and effects of antitoxins for tuberculosis. Amer. Journ. of the med. Sc. 1898, Vol. 116, pag. 692.
910) Trudeau, E. L., Baldwin, E. R. und Kinghorn, Studies on the tuberculin reaction. Journ. of med. research. 1904, Vol. 12, Nr. 2.
911) Trudeau und Pfeiffer, Fortschr. d. Med. 1898, Nr. 43.
912) Truhart, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 36, 37, 38.
913) Tschistowitsch, N., Über die morphologischen Veränderungen des Blutes bei der Kochschen Flüssigkeit. Berliner med. Wochenschr. 1891, Nr. 34.
914) Turban, Beitr. z. Klinik der Lungentuberkulose Bd. II, Heft 3.
915) Ders., Beitr. z. Klinik der Tuberkulose Wiesbaden (Bergmann).
916) Ders., Zit. n. Freymuth. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 43.
917) Tusa, S., Sulle alterazioni istologiche riscontrate in un caso di lupus eritematosus durante la cura di Koch. Archiv ital. di Clin. med. 1891, Vol. XXX, pag. 3.
918) Tuwim, Raph., Eine bequeme Methode der Aufbewahrung und Verdünnung des Tuberkulins. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 49, Beilage.
919) Tyson, Philadelphia med. times 1884, Vol. 14.
920) Unna, P. G., Über die Verwendung des Tuberkulins bei der Lupusbehandlung und einige neue Mittel gegen Lupus. Monatsschr. für prakt. Dermatol., 15. April 1891, Bd. XII, pag. 8.
921) Ders., Über Autotuberkulinisation bei Lupus. Berliner med. Wochenschr. 1891 Nr. 25.
922) Ungar, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 2.

923) Unverricht, Petersburger med. Wochenschr. 1891, Nr. 2.
924) Varese, A. und Pinna, G., La tuberculina Koch nella cura della tuberculosi. Archiv ital. di Clin. med. 1891 Vol. XXX, pag. 5.
925) Vernenil, Gas. des Hôp. 1891.
926) Vesely, Antonin, Des effects des produits du bacille de Koch sur la tuberculose humaine et sur la tuberculose expérimentale. Gaz. hebd. 1897, Tome LXIV, pag. 89.
927) Ders., Über die Wirkungen verschiedener Produkte des Tuberkelbazillus auf die menschliche und experimentelle Tuberkulose. IV. bull. intern. med. Prague 1897, pag. 39—42.
928) Viquerat, A., Zur Gewinnung von Antituberkulin. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1896, Bd. XX, pag. 18, 19.
929) Ders., Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1899, Bd. XXVI.
930) Virchow, R., Demonstration zum Kochschen Heilverfahren. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 4, 5, 6, 9; 1893 Nr. 5.
931) Ders., Über die Wirkung des Kochschen Mittels auf innere Organe Tuberkuloser. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 3.
932) Ders., Demonstration in der Diskussion zu dem Vortrag des Herrn B. Fränkel: Über die Anwendung des Kochschen Mittel bei Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
933) Ders., Bericht aus dem pathol. Institut in Berlin über die Wirksamkeit des Kochschen Heilmittels gegen Tuberkulose. Klinisches Jahrbuch Berlin 1891, Ergänzungsband.
934) Vissmann, W., Wirkung toter Tuberkelbazillen und des Tuberkulins auf den tierischen Organismus. Virchows Archiv 1892, Nr. 1; Berliner klin. Wochenschr. 1892, Nr. 28.
935) Vogl, Mitteilungen klinischer Erfahrungen mit dem Kochschen Heilverfahren im Garnisonlazaret München. Münchener med. Wochenschr. 1891, Nr. 9, 10, 11.
936) Waelsch, Untersuchungen über die Wirkung des Tuberkulins R auf lupöses Gewebe. Archiv f. Dermat. u. Syph. 1898, Bd. XLIV, pag. 359.
937) Wassermann-Bruck, Deutsche med. Wochenschr. 1906.
938) Watson-Cheyne, De la tuberculine dans ses rapports avec la chirurgie de la tuberculose. Gaz. de Paris 1891, Nr. 43. Lancet 1906, Tome I, pag. 13.
939) Weber, Bericht über die Impfungen mit Kochscher Lymphe im Jahre 1890. Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
940) Ders., Klinisches Jahrbuch, Berlin 1891. Erg.-Bd.
941) Mc. Weeney, Edm. J., Histology of tubercular tissnes treated by Kochs tuberculin. Dublin Journ., Juni 1891, Vol. XCI.
942) Wegener, Über die Tuberkulineinspritzung, insbesondere die Zweckmäßigkeit derselben in den Heilstätten der Versicherungsanstalten. Zeitschr. f. Tuberk. 1904, Bd. VI, Heft 5.
943) Weigert, Les tuberculines; expérimentation, diagnostic, thérapeutique. Thèse de Lyon 1902. (Centralbl. f. Bakt. u. Paras., Bd. XXXII, pag. 670.)
944) Weintraud, Die bisherigen Erfahrungen über Tuberkulin R. Fortschr. d. Med. 1898, Bd. XVI, Heft 2.
945) Weischer, Th., Zur Tuberkulinbehandlung. Zeitschr. f. Tuberkulose u. Heilstättenwesen 1905, Bd. VII, pag. 131.
946) Welsch, Untersuchungen über die Anwendung des Tuberkulins R auf lupöses Gewebe. Archiv f. Dermat. u. Syph. 1899, Bd. XLIV, pag. 359.
947) Weyl, Th., Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 6.
948) White, F. W., Boston med. and surg. Journ. 1897, Nr. 6.
949) Whittaker, J. F., Generalisations from six years use of tuberculin. Brit. med. Journ. 1897, Vol. II, pag. 1053.
950) Wiesel, J., Beiträge zur Statistik und Klinik der Tuberkulose. Beitr. z. Klinik d. Tuberkulose, Bd. V, Heft 4.
951) Winchester, Boston med. and surg. Journ. 1894, Vol. CXXXI, Heft 3.
952) Wörner, Über das TR-Tuberkulin. Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 30.
953) Wolbach, S. B. u. Harold, Ernst C., Experiments with tuberculins made from human and bovine tubercle bacilli. Journ. of med. research. 1904, Vol. XII, Nr. 3, pag. 295.
954) Wolf, Versammlungen der Tuberkulose-Ärzte.
955) Wolff-Eisner, A., Centralbl. f. Bakteriologie 1994, Bd. XXXVII.
956) Wolff, Julius, Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 50.
957) Ders., Mitteilung zu der Diskussion über den Vortrag des Herrn B. Fränkel: Über Anwendung des Kochschen Verfahrens bei Tuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 7.

958) WOLFF, JULIUS, 2. Versamml. der Tuberkulose-Ärzte zu Berlin 1904.
959) WOLELER, Sitzungen der Prager Ärtze-Gesellschaft.
960) WRIGHT, A. E., u. DOUGLAS, STEWART R., On the action exerted upon the tubercle bacillus by human blood fluids, and on the elaboration of protective elements in the human organism in response to inoculations of a tubercle vaccine.
961) WÜRTZEN, Tuberkulosis, Vol. III, pag. 2.
962) YAMAGIVA, Versuchsresultate über die Wirkung des Tuberkulins auf die Impftuberkulose des Meerschweinchens und Kaninchens. Virchows Archiv 1892, Nr. 2.
963) ZAHN, GEORG, Württemberg. Korrespondenzblatt 1884, Nr. 17.
964) ZIEGLER, E., Über die Heilwirkung des Tuberkulins. Vortrag auf dem X. Kongreß für innere Medizin in Wiesbaden 1891. Ref. im Centralbl. f. allgem. Pathologie u. path. Anatomie 1891, Bd. II, pag. 4. Seper.-Abd.
965) ZIEMSSEN, v., Münchener med. Wochenschr. 1890.
966) Ders., Münchener med. Wochenschr. 1898, Nr. 1.
967) ZIMMERMANN, Über den Heilwert der neuen Kochschen Tuberkulinpräparate O und R. Centralbl. f. allgem. Pathol. u. path. Anat. 1898, Nr. 12.
968) Ders., Experimentelle und anatomische Untersuchungen über die Einwirkung der neuen Kochschen Tuberkulinpräparate „O" und „R" auf den Verlauf künstlich erzeugter Augentuberkulose beim Kaninchen. Ophthalmol. Klinik 1899, Nr. 8, 9, 10.
969) ZÜLZER, W., Berliner klin. Wochenschr. 1891, Nr. 4.
970) ZUPNIK, L., Über die Tuberkulinreaktion. Archiv f. klin. Med. 1903, Heft 1—3.
971) Ders., Münchener med. Wochenschr. 1903, Bd. II, pag. 1219.

Nachtrag.

972) ABADIE, J., L'épreuve de la tuberculine dans le diagnostic les affections tuberculeuses et non tuberculeuses. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1902, Nr. 34.
973) ADAMI, J. und MARTIN, C. F., Report on observations made upon the cattle at the experimental station at Outremont, P. Q. recogniced to be tuberculous by the tuberculin test. Ottave. Gov. Printing Bureau 1900.
974) ADLER, RICHARD, Erwiderung auf die Bemerkungen zur Tuberkulinbehandlung von Doc. Dr. Münzer. Prager med. Wochenschr. 1903, Nr. 16.
975) ANDERS, J. M., The value of the tuberculin test in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. New York Med. Journ. 1900, Vol. XXI, Nr. 25.
976) ARLOING, Des ulcérations tuberculeuses de l'estomae. Paris 1902, Anelin et Houzeau.
977) ARLOING u. COURMONT, De l'agglutination du bacille de Koch. Zeitschr. f. Tuberkulose u. Heilstättenwesen Bd. I, Heft 2.
978) Dies., Sur la valeur de la séroréaction pour le diagnostic précoce de la tuberculose. Presse med., Tome VIII, pag. 73.
979) Dies., Wert der Serumreaktion für die frühzeitige Diagnose der Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 48.
980) ARLOING, S. u. DESCOS, A., Des toxones de la tuberculine. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1901, Nr. 40.
981) Dies., Des toxones de la tuberculine et de leur influence sur le développement de la tuberculose expérimentale. Compt. rend. de la Soc. de Biol 1902, Nr. 2 u. Journ. de physiol. et de pathol. gén. 1902, Nr. 1.
982) AUFRECHT, Erfolgreiche Anwendung des Tuberculins bei fiebernden Phthisikern. 77. Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte, Meran 1905.
983) BÄR, A., Die Spitalsbehandlung der Lungentuberkulose. Wiener med. Wochenschr. 1904, Nr. 33—35.
984) BAKER, S. J., The treatment of tuberculosis. Lancet 1901. Okt.
985) BALDWIN, Journ of Amer. Assoc. 1904, Nr. 22.
986) BANDELIER, Über die Auswahl der Lungenkranken für die Heilstättenbehandlung. Monatsschr. f. Unfallheilk. 1901, Nr. 9.
987) BARADAT, Remarks on tuberculosis and its treatment. Boston Med. Journ. 1901 u. Dublin Journ. 1901. Okt.
988) BARDELEBEN, Siehe Guttstadt: Klinisches Jahrbuch 1891. Erg.-Bd.
989) BARTH, Beziehungen der Tuberkulinempfindlichkeit zum tuberkulösen Prozeß. 77. Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte, Meran 1905.

990) Bauer, 2. Jahresbericht der Heilstätte „Engelthal“ des Nürnberger Heilstättenvereins für 1901.
991) Bauermeister, Über die wichtigsten bis jetzt bekannten Tuberkuline, ihre Herstellung, ihre Unterschiede. Archiv f. wissenschaftl. u. prakt. Tierheilkunde, 1900, Nr. 4—5.
992) Bäumler, C., Lungenschwindsucht und Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 21.
993) Ders., Die Behandlung der Tuberkulose im 19. Jahrhundert. Berliner klin. Wochenschr. Bd. XXXVII, Nr. 14.
994) Beneden, van, A., Temperature et tuberkuline. Le Scapel 1902, Nr. 31.
995) Benda, In der Diskussion der 2. Versammlung der Tuberculose-Ärzte. Berlin 1904.
996) Bernheim, Samuel, Traité clinique et thérapeutique de la tuberculose pulmonaire. Paris 1902.
997) Bernheim, Samuel u. Quentin de Paris, Traitement de la tuberculose par l'emploi combiné de la tuberculine et de les éthères de créosot. Presse méd. de Belg. 1903, Nr. 55 u. Bull. gén de thér 1903.
998) Bertheraud, Le diagnostic de la tuberculose pulmonaire chez les jeunes enfants. Gaz. hebd. 1900, April; Gaz de Hôp., März.
999) Billroth u. Eiselsberg, Cit. nach Cornet.
1000) Blum, M., Die Tuberkulinfrage einst und jetzt. Inaug.-Dissert. Würzburg 1902.
1001) Boeuf, le, Tuberculines. Presse méd. de Belg. 1901, Nr. 28; Journ. méd. de Bruxelles 1901, Nr. 29.
1002) Boëgart, van u. Klynens d'Anvers, Diagnostic précore de tuberculose pulmonaire. Zeitschr. f. Tuberkulose u. Heilstättenwesen, Bd. I.
1003) Bordet, Cit nach Wassermann-Bruck. Deutsche med. Wochenschr. 1906.
1004) Brandenburg, Kurt, Die Auswahl der Kranken für die Lungenheilanstalten und die frühzeitige Erkennung der Lungentuberkulose in der ärztlichen Praxis. Berliner klin. Wochenschr. Nr. 138.
1005) Ders., Über die Frühdiagnose der Lungentuberkulose und die Auswahl der Kranken für die Lungenheilstätten. Med. Reform 1902, Nr. 49.
1006) Ders., Erfahrungen über die Voruntersuchungen zur Aufnahme in die Lungenheilstätte Grabowsee. Berliner klin. Wochenschr. Bd. XXXVII, Nr. 16.
1007) Brieger, L., Zur Behandlung der Lungentuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 15.
1008) Bullock, E., A report on the use of antiphthisin serum TR. Med. News, Vol. LXXX, Nr. 12.
1009) Burghardt, Die Behandlung der Lungenschwindsucht im Krankenhause und in der inneren Praxis. Berliner klin. Wochenschr. 1900, Nr. 27 u. 28.
1010) Casselberg, W. E., The tuberculin test. Med. News 1901, Bd. LXXIX, Nr. 15.
1011) Mc. Caskey, G. W., Tuberculosis of bronchial glands; tuberculin. Amer. Med. 1903, Nr. 14.
1012) Cattle, C. H., Attempts to find a specific remedy for tuberculosis. Practitioner 1005, Vol. LXXIV, Nr. 4.
1013) Combemal u. Mouton, Le serum artificiel, moyen de diagnostic, précore de tuberculose pulmonaire. Echo méd. du Nord, Tome III, Nr. 44; Gaz. hebd., Tome XLVII, Nr. 7.
1014) Cole, Zeitschrift für Hygiene.
1015) Courtois-Suffit, Sur traitement de la phthisie pulmonaire. Gaz. des Hôp. 1900, Nr. 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21.
1016) Courtois-Suffit u. Levy-Sirugue, Le diagnostic précore de le tuberculose pulmonaire. Gaz. des Hôp. 1900, Nr. 11.
1017) Daman, Note sur la valeur de la méthode de Maréchal dans la tuberculose pulmonaire. Presse méd. belg. 1904, Nr. 49.
1018) Denison, Charles, The uses of tuberculin. Journ. of the Amer. Med. Assoc. 1902, Vol. XXXVIII, Nr. 6.
1019) Ders., Ten years experieuce with the tuberculines. The Journ. of Tuberculosis, Bd. III, Nr. 2.
1020) Ders., The specific therapie of tuberculosis. Med. News 1905, Vol. LXXXVI, Nr. 13.
1021) Denys, J., Réponse aux objections formulées par M.M. Malvoz et van Beneden contre le traitement de la tuberculose par le bouillon filtré du bacille de Koch.
1022) Ders., La tuberculine dans les tuberculoses. Bruxelles 1902.
1023) Ders., De l'action curative des bouillons filtrés du bacille tuberculeux dans la tuberculose pulmonaire. Bull. de l'acad. r. de méd. de belg. 1902. 22. März.

1024) De Renzi, Tuberculosi pulmonare. Rif. med. 1900, Nr. 1—5.
1025) Derscheid, Sitzung vom 1. April 1901 der Soc. royal. des sciences méd. Bruxelles.
1026) Deutsch u. Feistmantel, Impfstoffe und Sera. Leipzig 1903, Thieme.
1027) Dieudonné, Adolf, Schutzimpfung und Serumtherapie. Leipzig 1900. A. Barth.
1028) Dönitz, W., Welche Aussichten haben wir, Infektionskrankheiten, insbesondere Tuberkulose auszurotten? Berliner klin. Wochenschr. 1900, Nr. 17 u. 18.
1029) Dornbach, Inaug.-Dissert. Greifswald.
1030) Dubois-Havenith, Sitzung vom 1. April 1901 der Soc. royal. des sciences méd. Bruxelles.
1031) Duffield, George, A plac of au earlier diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis. Phys. and Surg., Vol. XXII, Nr. 3.
1032) Dunn, W. L., Special tids to the early regonition of pulmonary tuberculosis. Amer. Med. Okt. 1903.
1033) Eichberg, Joseph, The treatment of consumption at home. Med. News, Vol. LXXVII. Okt.
1034) Elsässer, Einiges über Tuberkulinbehandlung. Ärztl. Mitteilungen aus u. für Baden, Bd. LIX, Nr. 11.
1035) Engel, Über die Behandlung der Tuberkulose mit Tuberkulin. Berliner. klin. Wochenschr. 1902, Nr. 19.
1036) Ferrer, P., Contributo alla patogenesi della tuberculosi polmonare e alla sua terapia specifica. Gaz. degli osped., Fasc. XXVI, Nr. 16.
1037) Flick, Lawrence F., The therapeutic of tuberculosis. Ther. Gaz. 1900, Nr. 1.
1038) Forssmann, Erfarenheten on tuberculinet sas om diagnostic medel. Hygiea 1901, Nr. 1.
1039) Fränkel, Albert, Das Tuberculinum Kochii als Diagnosticum. Zeitschr. f. Tuberkulose u. Heilstättenwesen, Bd. I, Nr. 3.
1040) Fränkel, B., Der Stand der Tuberkulosebekämpfung in Deutschland. Denkschrift, dem internationalen Tuberkulosekongreß in Paris 1905 vorgelegt vom „Deutschen Centralkomitee zur Errichtung von Heilstätten für Lungenkranke". Berlin 1905, Selbstverlag.
1041) France, E., Mitteilung auf dem Londoner Tuberkulosekongreß 1901.
1042) Francé, Siehe Koch, Deutsche med Wochenschr. 1901.
1043) Frey, Herrmann, Zur Therapie der Tuberkulose. Korrespondenzblatt für Schweizer Ärzte 1903, Nr. 3.
1044) Ders., Einige Bemerkungen zur Vollandschen Kritik der Tuberkulinbehandlung. Neue Therapie 1905, Nr. 1.
1045) Freymuth, Über die diagnostischen Erfahrungen mit Tuberkulin bei Lungenkranken. Allgem. med. Centralztg. 1903, Nr. 16.
1046) Fürst, Ernst, Positiver Ausfall der Tuberkulinreaktion, vorgetäuscht durch hysterisches Fieber. Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 14.
1047) Fuld, Ernse, Gedanken über die Prophylaxe und Therapie der Tuberkulose. Therap. Monatsschr. Dez. 1902.
1048) Gantz, Miecislav, Oberny stan nauki o tuberkulinie. Nowiny lek. Poznan. 1904, Nr. 6.
1049) Gerhardt, C., Die Behandlung der Tuberkulose. Therapie der Gegenwart, Bd. II, pag. 5.
1050) Gläser, Ketzerische Briefe über Tuberkulose. Allgem. med. Ztg. 1903, Nr. 24.
1051) Greene, Chas. Symon, Pulmonary tuberculosis as an insurance problem. Amer. Med. Aug. 1901.
1052) Grundmann, Merkbuch für Tuberkulinproben. Hanover 1902.
1053) Guinard, L., Sur les injections diagnost. de tuberculine; technique et resultats. Lyon méd. 1902, Mr. 19 u. 20.
1054) Ders., Les tuberculines de R. Koch, 1902, Tome II.
1055) Hagadorn, The diagnosis and treatment of incipient tuberculosis. Phys. and Surg., Vol XXIV, Nr. 1.
1056) Hager, Zur spezifischen Behandlung der Tuberkulose. Münchener med. Wochenschrift 1902, Nr. 28, 29.
1057) Ders., Zur Therapie der Lungenschwindsucht. Berlin, Verlag medizin. Warenhaus.
1058) Ders., Diskussion der 2. Vers. der Tuberkulose-Ärzte. Berlin 1904.
1059) Hammer, Die Heilstättenbehandlung der Tuberkulose. Münchener med. Wochenschrift, 1902, Nr. 26.
1060) Ders., Diskussion der Tuberkulose-Ärzte, Berlin 1904.
1061) Harbitz, Untersuchungen über Häufigkeit, Lokalisation und Ausbreitungswege der Tuberkulose. Christiania 1905.
1062) Hippel, v., Deutsche med. Wochenschr. 1897, 1905.

1063) Hocke, Über die Behandlung der Lungentuberkulose mit Ponzios Tuberkulin. Zeitschr. f. Heilkunde 1901, Bd. XXII. pag. 8, 9.
1064) Honl, Iwan, Über die bakteriologischo Diagnose der Tuberkulose. Časopis českých lékařů 1902.
1065) Houzé, Soc. des sciences méd. Bruxelles, Sitzung v. 1. April 1901.
1066) Jakob, Paul u. Pannwitz, G., Die Entstehung und Bekämpfung der Tuberkulose. Leipzig 1901, Thieme.
1067) Jakob, Paul u. Rosenberg, A., Die Technik der Lungeninfusion. Zeitschr. f. ärztl. Fortbildung 1904, Nr. 13.
1068) Jakobsohn, La fluorescence et la tuberculine réaction précore. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1904, Tome LVI, Nr. 15.
1069) Jaksch, R. v., Gedenkrede auf Herrmann Nothnagel. Prager med. Wochenschr. 1905, Nr. 42.
1070) Jolles, Chemie des Tuberkulins. In: „Ott, Chem. Path. d. Tuberk.“ Berlin 1903.
1071) Joseph, Cit. nach Cornet (im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann).
1072) Jourdin, Ch. u. Fischer, Le diagnostic précoce de la tuberculose pulmonaire. Maloine, Paris 1902.
1073) Kaminer, S., Zur Frage der Heilstättentherapie. Therapie d. Gegenwart. N. F., Bd. II, Nr. 9.
1074) Ders., Über den Stand der Frage nach der diagnostischen Bedeutung der Tuberkulininjektionen. Festschrift f. Senator. Berlin 1904.
1075) Kaminer, S. u. Meyer, E., Eyperimentelle Untersuchungen über die Bedeutung des Applikationsortes für die Reaktionshöhe bei diagnostischen Tuberkulininjektionen. Verh. des XII. Kongr. f. innere Medizin, Wiesbaden 1905.
1076) Kinghorn, H. M., Researches in the action of tuberkulin. Journ. of med. research. 1900, Nr. 2.
1077) Kirchner, M., Aufgaben und Erfolge der Tuberkulosebekämpfung. Zeitschr. f. ärztl. Fortbildung 1904, Nr. 13.
1078) Klimowitz, Die Tuberkulinprobe zur Abwehr der Tuborkulose in der Armee. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 1902, Bd. XL, Nr. 1.
1079) Koch, Adolf, Jahresbericht des Sanatoriums Schönberg, 1904.
1080) Koch, Robert, Über Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1890, Nr. 7.
1081) Köhler, F., Bewertung der modernen Lungenheilstättenbehandlung. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 19.
1082) Ders., Jahresbericht der Heilstätte Holsterhausen. Zeitschr. f. Tuberk. 1903, Bd. V, Nr. 1.
1083) Ders., Zur Tuberkulindiagnostik nebst Bemerkungen zu Schüles Aufsatz. Beitr. z. Klinik der Tuberk. Würzburg 1904.
1084) Ders., Temperatursuggestionen bei Tuberkulösen. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 48.
1085) Köppen, Die tuberkulöse Konstitution. 77. Vers. der Naturforscher u. Ärzte, Kassel 1902.
1086) Krämer, C., Die früheste Diagnose der Tuberkulose. Med. Korresp.-Bl. des Württemb. ärztl. Vereins 1902, Nr. 23.
1087) Ders., Prinzip der Dauerheilung der Tuberkulose. Tübingen 1904.
1088) Ders., Zur Tuberkulosebekämpfung bei den Krankenschwestern. Zeitschr. f. Krankenpflege 1904, Bd. XL.
1089) Kraus, F., Die Erkennung der Tuberkulose. Zeitschr. f. ärztl. Fortbild. 1904, Nr. 3.
1090) Krause, P. F., Auf welche Ursache ist der Mißerfolg der Tuberkulintherapie des Jahres 1891 zurückzuführen? Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt. 1901, Bd. XXXIII, Nr. 1.
1091) Krautstrunk, Zur Frage der Gleichheit oder Verschiedenheit der Schweineseuchestämme. Zeitschr. f. Hyg, u. Infekt. 1904, Bd. XXXXVII.
1092) Kurrer, Todesfall nach Tuberkulininjektion. Med. Korresp.-Bl. d. Württemb. ärztl. Landesvereins, 1904, Nr. 18.
1093) Lame, Louis, Diagnostic précose de la tuberculose pulmonaire chronique. Thèse de Paris 1901.
1094) Latham, Arthur, A clinical lecture on the early diagnosis of pulmonary consumption, with especial reference to the value of tuberculin. Lancet 1901, Nr. 4087.
1095) Latham, N., The diagnosis and modern treatment of pulmonary tuberculosis. London 1905.
1096) Lenhartz, Die Krankheit der Lungentuberkulose, spezifische Behandlung. In Ebstein-Schwalbes Handbuch der prakt. Medizin 1905.

1097) LEVY, ERNST und HAYO BRUNS, Über die Frühdiagnose der Lungentuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 9.
1098) MARAGLIANO, E., L'antitossina tubercolare. Clin. med. Ital. 1900, Nr. 10—12.
1099) MARECHAL, Résultats de la méthode combinée de la tuberculine et du phosote dans la tuberculose pulmonaire. Presse méd. Belg. 1904, Nr. 28.
1100) MARIANI, JUAN MANUEL, Traitement de la tuberculose pulmonaire par les injections de tuberculine. Presse méd. Belg. 1904, Nr. 15.
1101) MARMOREK, Serum et vaccin antituberculeux. Arch. gén. de méd. 1903.
1102) MARX, Die experimentelle Diagnostik, Serumtherapie und Prophylaxe der Infektionskrankheiten. Berlin 1902.
1103) MATTHÄI, Bedeutung des Perlsuchttuberkulins. Militärarzt, Bd. XXIX, Nr. 7.
1104) MAZZOTTI, Della tubercolina adoperata a scopo diagnostico. Mem. de Royal Acad. della Sc del Inst. di Bologna 1905, Vol. IX, pag. 403.
1105) MEESSEN, Deux cas de tuberculose pulmonaire traités par la tuberculine de Denys. Presse méd. Belg. 1901, Nr. 2.
1106) MEINECKE, Referat „Aus dem Gebiete der Bakteriologie". Zeitschr. für ärztliche Fortbildung 1904, Nr. 23.
1107) MEISSEN, E., Zur Heilstättenbehandlung der Tuberkulose. Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 33.
1108) MEISSNER, In der Diskussion über den Vortrag Aufrecht. Meran 1905.
1109) MIDDENDORPF, H. W., Die Ursache der Tuberkulose nach Prof. Dr. Koch und dessen Heilverfahren. Freies hygien. Blatt, Leipzig 1902.
1110) MIRCOLI, Sull' iperglobulia dei tuberculosi. Gaz. degli ospedali 1904, Nr. 70.
1111) MITULESCU, Die systematische Behandlung der Tuberkulose. Spitalul 1905, Nr. 10.
1112) Ders., Die sicheren diagnostischen Zeichen für die beginnende Lungentuberkulose. Spitalul 1904. Nr. 8 u. 9.
1113) MÖLLER, A., Nach welchen Bedingungen soll die Aufnahme von Lungenkranken in Heilstätten erfolgen. Zeitschr. f. Tuberkulose Bd. IV, pag. 2.
1114) Ders., Zur Auswahl geeigneter Fälle von Tuberkulose für die Heilstättenbehandlung. Zeitschr. f. Tuberkulose Bd. I, pag. 2.
1115) Ders., Die Behandlung Tuberkuloser in geschlossenen Heilanstalten. Deutsche Klinik am Eingange des 20. Jahrhunderts, Bd. IV.
1116) Ders., Bekämpfung der Tuberkulose und Heilstättenwesen. Zeitschr. f. ärztl. Fortbildung 1904, Nr. 14.
1117) Ders., Die Behandlung der Lungenschwindsucht in Heilstätten. In Fränkels „Stand der Tuberkulosebehandlung", Berlin 1905.
1118) NATTAU-LARRIEZ, L., Étude des liquides tuberculeux par le tuberculin-réaction indirecte. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1904, Tome LVI, Nr. 4.
1119) NEISSER, E., Zur Frühdiagnose der Tuberkulose bei der versicherungspflichtigen Bevölkerung. Klinisches Jahrbuch 1902.
1120) Ders., Die Schlußtabelle in der Arbeit von Löwenstein und Rappaport. Beitr. z. Klinik d. Tuberkulose Bd. III, pag. 4.
1121) NEISSER und POLLAK, Tuberkulosebüchlein des Stettiner Krankenhauses. Klinisches Jahrbuch 1904.
1122) NELSON, C. D., Experieme with tuberculin. Boston med. Journal Vol. CXLII, Nr. 24.
1123) NEUFELD, F., Spezifisches Mittel. In Fränkels „Stand der Tuberkulosebekämpfung" 1905.
1124) NIENHAUS, Jahresbericht der Baseler Heilstätte 1904.
1125) VAN NIESSEN, Verteidigung meines Protestes gegenüber Kochs Tnberkulosierung gegenüber Sprenglers Angriffen. Wiener med. Wochenschr. 1902, Nr. 30, 31.
1126) NOURNEY, Praktische Beiträge zur Tuberkulinanwendung. Deutsche Med.-Ztg. 1905, Nr. 19.
1127) OSLER, Diskussion am Tuberkulosekongreß in London 1901.
1128) OTIS, EDWARD, Further notes upon the diagnostic test of tuberculin. Med. News. 1901, Nr. 8.
1129) PARIS, La tuberculine Bèraneck dans la tuberculose pulmonaire. Lévue méd. de la Suisse Rom. 1904, Nr. 10.
1130) PENROSE, Tuberculin obtained from bovine tubercle bacilli confrasted with tuberculin abtained from the human tubercle bacilli, in their effects on humain patients. Journal of Tubercul. 1901, Vol. IV, Nr. 4.
1131) PEGURIER, A., La méthode de Maréchal; emploie combiné de la tuberculine et de composes créosotes dans le traitement de la tuberculose pulmonaire; son principe, son innocuité, ses indications. Bull. génér. de thérap. 1904, Tome XCVII, Liv. 4.

1132) PERKINS, The diagnosis of incipient pulmonary tuberculosis. Boston Med. and Surg. Journal 1904, Dec.
1133) PISCHINGER, Jahresbericht der Heilstätte Lohr 1902/03.
1134) PONZIO, La tuberculose pulmonaire, son traitement par une nouvelle tuberculine. Paris 1900.
1135) ROTTENGER, A critical study of tuberculin. Therap. Gaz. Detroit 1903.
1136) RICHER, The sanatorium treatment of tuberlosis. Philadelphia Med. Journal 1901.
1137) RITTER, JOHANN, Stellung und Aufgaben des Arztes in den Volksheilstätten für Lungenkranke. Handbuch d. sozialen Med. Bd. IV, Teil 3, Fischer, Jena.
1138) Ders., Jahresbericht der Heilstätte Edmundsthal 1902.
1139) ROAERTSON, Tuberculosis and the use of tuberculin. Agricult. Journal of the Cape of good hope 1903, Vol. XXIII, Nr. 5.
1140) RÖMISCH, Über Erfolge mit Tuberkulinbehandlung nach Götschschem Verfahren. Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 46, 47.
1141) RÖPKE, Die Anlage und Führung des Krankenjournals in der Heilstätte Belzig. Zeitschr. f. Tuberkulose 1901, Bd. IV.
1142) Ders., Über die Frühdiagnose der Lungentuberkulose in der Praxis und die Indikationen zur Heilstättenbehandlung. Ärztl. Sachverst. Ztg. 1904, Nr. 15.
1143) Ders., Zur Diagnostik der Lungentuberkulose. Beitr. z. Klinik der Tuberkulose, Bd. I, pag. 3.
1144) ROSENBERG, Zur Serumdiagnose der Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 18.
1145) ROSENBERGER, Beobachtungen bei Behandlung von Phthisikern mit Tuberkulin. Centralbl. f. innere Med. 1903, Nr. 19.
1146) ROSENFELD, Über Tuberkulineinspritzungen. Med. Korrespondenzbl. d. Württemb. ärztl. Landesv. 1904, Nr. 38.
1147) VAN RUCK, SILVIO, The use of tuberculin in medicine. The therap. Gaz. May 1902.
1148) Ders., The early diagnosis of pulmonary tuberculosis. Buffalo Med. Journal 1902/03, Vol. XLII, Nr. 2.
1149) RUDOLF, Kombinierte Behandlung der Lungentuberkulose mit Kalk und Tuberkulin. Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 48.
1150) RUMPF, ERNST, Über diagnostische Tuberkulineinspritzungen. Ärztl. Mitteil. Baden 1901, Nr. 22, 1902 Nr. 15.
1151) Ders., Über die Auswahl der in die Heilstätten entsandten Lungenkranken. Württemb. Korrespondenzbl., Bd. LXX, Nr. 17.
1152) Ders., Jahresberichte der Heilstätte Friedrichshain.
1153) RUMPF und GUINARD, Über die Agglutination der Tuberkelbazillen und die Verwertung dieser Agglutination. Deutsche med. Wochenschr. Bd. XXVII, Nr. 8.
1154) SCHMIDT, H., Beiträge zur Beurteilung der Tuberkulinreaktion. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 18.
1155) SCHRANK, Das Tuberkulin Koch. Zeitschr. d. Allg. österr. Apothekervereins 1901, Nr. 27—30.
1156) SCHREIBER, Klinisches Jahrbuch 1891, Ergänzungsband.
1157) SCHRÖDER, Bemerkungen zu Weiker und Petruschky, Heilstätten- und Tuberkulinbehandlung. Deutsche Med.-Ztg 1902, Nr. 7.
1158) Ders., Über neue Medikamente und Nährmittel bei der Behandlung der Tuberkulose. Zeitschr. f. Tuberkulose u. Heilstättenwesen 1901, Bd. III, pag. 1, 1904, Bd. VI, pag. 5.
1159) Ders., Zu den Streitfragen in der Pflege der Lungenschwindsüchtigen. Zeitschr. f. Krankenpflege 1904, Nr. 12.
1160) SCHRÖDER und BLUMENFELD, Handbuch der Therapie der chronischen Lungenschwindsucht, Leipzig 1904, Barth.
1161) Stand der Tuberkulosebekämpfung in Deutschland im Frühjahr 1904. Herausgegeben von Pannwitz, als Geschäftsbericht des „Deutschen Zentralkomitees zur Errichtung von Lungenheilstätten in Deutschland.
1162) Dasselbe für 1905, herausgegeben von NIETNER.
1163) SCHÜLE, Entgegnung auf vorstehende Abhandlungen (Köppen, Köhler, Servaes). Brauer, Beitr. z. Klinik d. Tuberkulose, Bd. II, pag. 3.
1164) DE SCHWEINITZ, Tuberculins and their use. Journal of the Amer. Med. Assoc. 1900, Nr. 15.
1165) SENATOR, Über einige ausgewählte Punkte der Diagnose und Therapie der Lungentuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1900, Nr. 15, 16.
1166) SESSIONS-HARALD, Tuberculin as an diagnosti agens. Lancet, Juli 1901.
1167) SORGO, Jahresbericht der Heilstätte „Alland“ 1903.

1168) Spengler, Die Diagnose geschlossener Tuberkulose, der Sekundärinfektion, tuberkulöse und syphilitische Phthise. Davos 1900.
1169) Ders., Über das Kochsche TR und Tuberkelbazillensplitter. Wiener med. Wochenschr. 1902, Nr. 14.
1170) Ders., Anatomisch nachgewiesene Tuberkulinleitung einer Miliartuberkulose der Lungen. Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankh. 1905, Bd. XLVII, pag. 1.
1171) Stiemann, Sitzung vom 1. April 1901 der Soc. des Sciences med., Bruxelles.
1172) Tarchetti, Sull' iperglobulia tubercolare. Gaz. degli Osped 1904, Nr. 154.
1173) Thellung, Experimentelle Beiträge zur Frage der Agglutination der Tuberkelbazillen und zur Behandlung mit Neu-Tuberkulin (Bazillenemulsion). Centralbl. f. Bakt. 1902, Bd. XXXII, Nr. 1.
1174) Thildges, Des résultats obtenus par la tuberculine Denys dans la tuberculose pulmonaire. Presse méd. Belg. 1903, Nr. 32—34.
1175) Thoner, Tuberkulin und Tuberkulose. Leipzig 1901, „Gesundheit", pag. 1.
1176) Trudeau, The importance of a recognition of the significance of early tuberculosis in its relation to treatment.
1177) Ders., Transact. of Assoc. of Amer. Phisicians 1901.
1178) Uhthoff, Ein Beitrag zur Behandlung Augenkranker nach dem Kochschen Verfahren. Berliner klin. Wochenschr. Nr. 7.
1179) Vallee, Sur l'accoutumance à la tuberculine. Ann. de l'Instit. Pasteur 1904, Nr. 9.
1180) Vinke, H. H., Tuberculosis and modern methods for its treatment. Med. News. Nr. 77, pag. 8.
1181) Volland, Über ein Hilfsmittel zur Beseitigung des chronischen tuberkulösen Fiebers und einige Bemerkungen zur Tuberkulinbehandlung. Neue Therapie 1904, Nr. 11.
1182) Wagner, Die Tuberkulose des Auges und der Erfolg der Anwendung des Kochschen Tuberkulins bei derselben. Münchener med. Wochenschr. pag. 266.
1183) Wassermann, A. und Ostertag, R., Bisherige Ergebnisse der Bekämpfung der Schweineseuche mit Hilfe des polyvalenten Serums. Monatshefte f. prakt. Tierheilkunde 1903, Bd. I, pag. 4.
1184) Ders., Über polyvalente (multipartiale) Sera mit besonderer Berücksichtigung der Immunität gegenüber den Erregern der Schweineseuche. Zeitschr. f. Hygiene u. Inf. 1904, Bd. XLVII.
1185) Weber, On the home treatment of pulmonary tuberculosis. Postgraduate, Vol. XVI, Nr. 11.
1186) Weicker, Über die Heilstätten- und Tuberkulinbehandlung in gegenseitiger Beziehung. Berliner klin. Wochenschr. Bd. XXXIX, Nr. 4.
1187) Ders., Die bisher in Heilstätten erzielten Erfolge. Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 4.
1188) Weigert, De l'Agglutination des bacilles tuberculeux et de son application au traitement des phthisiques. Gaz. des hôpit 1902, Nr. 2.
1189) Weintraud, Die Fürsorge für die ambulant zu behandelnden Schwindsüchtigen. Zeitschr. f. Tuberkulose u. Heilstättenw. 1902, Bd. IV, pag. 1.
1190) Weismayr, Die medikamentöse und symptomatische Behandlung der Lungentuberkulose. Zweite Behandlung durch Bakterien, deren Produkte und Serotherapie. Wiener klin.-therap. Wochenschr. 1902, Nr. 18, 19.
1191) Weiss, Gustav, Die diagnostische und therapeutische Anwendung des Tuberkulins. Centralbl. f. d. Grenzgebiete d. Med. u. Chirurg. 1906, Bd. IX, Nr. 11.
1192) Williams, Diskussion am internat. Tuberkulosekongreß, London 1901.
1193) Wilson, The treatment of tuberkulosis by the tuberculin of Prof. Béraneck of Neuchâtel. Med. Mag. London 1904, Nr. 2.
1194) Wolff, In der Diskussion d. zweiten Versamml. der Tuberkuloseärzte, Berlin 1904.
1195) Wood, The diagnostic value of tuberculin. Journal of the Amer. Med. Assoc. 1902, Vol. XXXVIII, Nr. 16.
1196) Würtzen, Forsög med Tuberkulinbehandlung ved Lungentuberkulose. Nordisk Tidskrift, for Therapi 1903.
1197) Zibulsky, Auswahl der passenden Fälle von Schwindsucht für die Behandlung in Sanatorien und über die Frühdiagnose der Schwindsucht. Wratschebn. gaz. 1902, Nr. 40—42.
1198) Ziegelroth, Kann man durch Tuberkulininjektionen tuberkulös werden? Archiv f. physiol. u. diätet. Therapie 1901, pag. 3.
1199) Zupnik, Diskussion in Meran, Naturforscherversammlung 1905.
1200) Lissauer, Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 33. Tuberkulinsuppositorien.
1201) Ruhmann, Med. Klinik 1907, zit. nach Lissauer.
1202) Birnbaum, das Kochsche Tuberkulin in der Gynäkologie und Geburtshilfe. Springer, Berlin 1907.

Wiener med. Presse 1890, Bd. XXXI, Heft 49, pag. 1935. Verhandl. der K. K. Ges. der Ärzte in Wien.
Deutsche med. Wochenschr. 1890, Bd. XVI, Nr. 50, pag. 1171. Demonstration der Ergebnisse der Versuche mit dem Kochschen Mittel gegen Tuberkulose in den allgemeinen Krankenhäusern in Hamburg.
Ärztliche Mitteilungen für Baden, 1890, 15. Dez., Bd. XLIV, Nr. 23. R. Kochs Heilverfahren.
Vereinsblatt der Pfälzer Ärzte 1890, Dez., Bd. VI. Zum Kochschen Heilverfahren.
Deutsche med. Wochenschr. 1891, Bd. XVII, Nr. 49. Sitzung des ärztlichen Vereins zu Hamburg.
Deutsche med. Wochenschr. 1891, Bd. XVII, Nr. 9, pag. 348; Nr. 15, pag. 584. Sitz. der Niederrhein. Ges. für Natur- und Heilkunde in Bonn vom 19. Januar und 23. Februar 1891.
Berliner klin. Wochenschr. 1891, Bd. XXVIII, Nr 4, pag. 107; Nr. 6, pag. 159; Nr. 7, pag. 185; Nr. 8, pag. 213; Nr. 10, pag. 271; Nr. 17, pag. 427; Nr. 18, pag. 457. Aus den Sitzungen der Berliner med. Gesellschaft.
Münchener med. Wochenschr. 1891, Bd. XXXVIII, Nr. 6, pag. 114. Sitzung des ärztlichen Vereins in Hamburg vom 3. Februar 1891.
Wiener klin. Wochenschr. 1891, Bd. IV, Nr. 5, pag. 91; Nr. 6, pag. 111; Nr. 12, pag. 233. Sitzungsbericht der K. K. Gesellschaft der Ärzte in Wien.
Schweizer Korrespondenzblatt 1891, Bd. XXI, Nr. 4, pag. 108. Sitzung der Gesellsch. der Ärzte in Zürich vom 20. Dezember 1890.
Berliner klin. Wochenschr. 1891, Bd. XXVIII, Nr. 32, 33 und 34. Diskussion über die mit dem Kochschen Heilmittel gewonnenen Erfahrungen.
Brit. med. Journal 8. Aug. 1891. Diskussion on tuberculin in relation to surgical tuberculous discases.
Sächs. ärztl. Korrespondenzbl. 1891, L. 4. Über die in d. Dresdener Krankenanst. bei Anwendung des Kochschen Verfahrens gemachten Beobachtungen.
Brit. med. Journal 8. Aug. 1891, pag. 294. A Discussion on tuberculin in relation to surgical tuberculous discases. Vgl. auch Watson-Cheyne, Gaz. med. de Paris 1891, Nr. 42, 43.
Hygiea 1891, Vol. LIII, pag. 4. Sv. läkaresällsk. forh. pag. 28, Discussion om det Koch'ska medlet mor tuberkulos.
Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 7. Verhandl. d. VIII. vläm. Naturf. u. med. Kongresses zu Antwerpen 1905.

XXIV.

Darstellung der Schutzstoffe und Methoden der Schutzimpfung gegen Milzbrand.

Von

Prof. Dr. G. Sobernheim

in Berlin.

I. Aktive Immunisierung (Vaccination).

A. Gewinnung abgeschwächter Milzbrandstämme.

1. Züchtung bei höheren Temperaturen (Pasteursche Methode).

Die Abschwächung virulenter Milzbrandkulturen gelingt nach allgemeiner Erfahrung am sichersten mit Hilfe des zuerst von Pasteur, Chamberland und Roux empfohlenen Verfahrens, das in einer mehr oder minder lange dauernden Züchtung bei 42—43° besteht. Nach der ursprünglichen Vorschrift werden hierbei die Bakterien in Hühnerbouillon kultiviert, doch kann man auch bei Benutzung gewöhnlicher Rinderbouillon oder Pferdebouillon, sowie auch auf Agarnährböden zu dem gleichen Ergebnis gelangen. Werden virulente Milzbrandbakterien in dieser Weise gezüchtet, so macht sich sehr bald eine Abnahme der Virulenz bemerkbar. Wie Koch, Gaffky und Löffler festgestellt haben, gibt sich die Abschwächung der Kulturen darin zu erkennen, daß ihre Pathogenität für Kaninchen, später Meerschweinchen und zuletzt Mäuse in der genannten Reihenfolge allmählich abnimmt, in dem Sinne, daß zunächst Kaninchen, später Meerschweinchen und zuletzt Mäuse auf die Impfung mit den entsprechenden Kulturen nicht mehr reagieren.

Der Zeitpunkt, zu dem ein bestimmter Grad der Abschwächung erreicht werden kann, ist nicht nach Tag und Stunde genau zu fixieren. Eine ganze Reihe von unbekannten und unberechenbaren Einflüssen, wie Zusammensetzung des Nährbodens, Luftzutritt, Menge des verimpften Materials, Temperatur usw. spielen offenbar eine nicht unwichtige Rolle. Will man daher der Kultur einen ganz bestimmten Grad der Abschwächung verleihen, so ist man genötigt, in gewissen regelmäßigen Zwischenräumen Virulenzprüfungen vorzunehmen. In der Regel läßt sich eine Abnahme

der Virulenz schon nach 4—5 Tagen konstatieren. Hinsichtlich der Züchtungstemperatur sind geringe Differenzen und Schwankungen, wie sie auch bei den bestregulierten Brütschränken fast unvermeidlich sind, anscheinend ohne erheblichere Bedeutung. Am besten ist es, den Thermostaten auf 42,5 ° einzustellen. Bei 43 ° pflegt überhaupt kein Wachstum mehr oder höchstens noch sehr kümmerlich zu erfolgen, während bei einer Temperatur unter 42 ° eine Abschwächung zwar möglich, aber weniger leicht erreichbar ist als bei 42—43 °.

Will man einen Milzbrandstamm nur in geringem Grade abschwächen, so genügt es, die einmal angelegte Bouillon- oder Agarkultur für eine gewisse Zeit, z. B. 5—6 Tage, im Brütschrank bei 42,5 ° zu belassen. Soll eine stärkere Abschwächung erzielt werden, so kann man in der gleichen Weise verfahren, nur daß die Kulturen etwas längere Zeit bei höheren Temperaturen gezüchtet werden, oder aber man geht so vor, daß von Zeit zu Zeit neue Kulturen abgeimpft und diese letzteren wiederum bei 42—43 ° gehalten werden.

2. Nach Toussaint ist es möglich, Milzbrandbakterien dadurch künstlich abzuschwächen, daß man defibriniertes Milzbrandblut 10 Minuten auf 55 ° erhitzt. Toussaint selbst war freilich der Ansicht, daß hierdurch die Bakterien völlig abgetötet würden, wogegen Pasteur darauf hinwies, daß es sich lediglich um eine Abschwächung der Bakterien handelt. Die Methode ist jedenfalls in ihrem Erfolge recht unsicher und zur Gewinnung eines brauchbaren Vaccins ungeeignet. Überdies ist es fraglich, ob durch die kurzdauernde Erhitzung auf 55 ° wirklich ein abgeschwächter Stamm gewonnen werden kann und nicht einfach eine vorübergehende Schädigung der an sich virulenten Keime die Ursache der geringeren Pathogenität ist.

3. Auch die Anwendung höheren Drucks mit oder ohne gleichzeitige Einwirkung höherer Temperaturen steht an Sicherheit hinter der Pasteurschen Methode entschieden zurück. Nach Chauveau gelingt es, durch Züchtung von Milzbrandbazillen bei 38—39 ° unter gleichzeitigem Druck von 8 Atmosphären eine Abschwächung herbeizuführen; Wossnessensky erreichte das gleiche durch Züchtung der Kulturen bei 42—43 ° unter einem Druck von 3—6 Atmosphären.

4. Durch Zusatz von Desinfizientien zum Nährsubstrat ist nach Chamberland und Roux eine künstliche Abschwächung von Milzbrandkulturen erreichbar. In einer Bouillon, die mit Karbolsäure (1 Teil auf 600—800 Teile Bouillon) oder Schwefelsäure (1 auf 20) oder doppelt chromsaurem Kali (1 auf 2000—5000) versetzt wird, bleibt nach ihren Beobachtungen Sporenbildung aus und es kommt zu einer raschen Abschwächung der Kulturen, derart, daß bereits nach 10 Tagen ein für Schafe völlig avirulenter Milzbrandstamm erhalten werden kann.

5. Eine Reihe weiterer Eingriffe, wie z. B. Einwirkung des Sonnenlichts (Arloing) oder längerer Aufenthalt im Körper refraktärer oder wenig empfänglicher Tierarten, wie Lubarsch, Sanarelli, Ogata u. a. an Fröschen, Phisalix an Hunden, Frank an weißen Ratten beobachtet haben, sind von biologischem Interesse, kommen aber als praktische Methoden der Abschwächung nicht in Betracht.

B. Eigenschaften der abgeschwächten Kulturen.

1. Feststellung des Virulenzgrades.

Der Virulenzgrad, der auf dem Wege künstlicher Abschwächung einem Milzbrandstamm verliehen worden ist, erweist sich im großen und

ganzen als unveränderlich. Im Gegensatz zu der geringeren pathogenen Wirksamkeit, wie sie natürlich auch bei an sich virulenten Stämmen in älteren Bouillon-, Agar- usw. Kulturen nachgewiesen werden kann, ist die echte Abschwächung dadurch charakterisiert, daß selbst junge, unter den besten Wachstumsbedingungen entwickelte Kulturen niemals volle Virulenz an den Tag legen. Will man daher untersuchen, ob ein Milzbrandstamm abgeschwächt oder virulent ist, so hat als erste Vorbedingung zu gelten, daß zur Prüfung eine frisch angelegte, bei ca. 37° gezüchtete, am besten 16—18 Stunden alte Kultur verwendet wird. Nur in diesem Falle kann man darauf rechnen, einwandfreie Resultate zu erhalten.

Die Virulenzprüfung ist gleichzeitig an verschiedenen Tierarten, und zwar an Kaninchen, Meerschweinchen und Mäusen vorzunehmen, da andernfalls der Abschwächungsgrad eines Milzbrandstammes nicht exakt ermittelt werden kann. Kaninchen von 1200—1500 g, Meerschweinchen von 300—400 g Körpergewicht sind besonders geeignet. Am zweckmäßigsten erscheint es, von jeder dieser Tierarten drei Tiere zum Versuche zu benutzen, die mit verschiedenen Kulturmengen infiziert werden. Eine möglichst genaue Dosierung des Impfmaterials ist von großer Bedeutung. Junge Bouillonkulturen in entsprechender Verdünnung oder besser noch Aufschwemmungen von jungen Agarkulturen gestatten auch beim Milzbrand bei Anwendung gewisser Vorsichtsmaßregeln ein ebenso genaues quantitatives Arbeiten wie bei anderen Bakterienarten. Bei der Verwendung von Agarkulturen empfiehlt es sich, das mit der Platinöse entnommene Bakterienmaterial zunächst an der Innenwand eines Reagenzröhrchens unter Zusatz von einigen Tropfen Kochsalzlösung sehr sorgfältig zu verreiben und allmählich mit Kochsalzlösung bis zu einem bestimmten Volumen aufzufüllen. Die so erhaltene Bakterienaufschwemmung ist auch bei sorgfältigstem Vorgehen immer noch durch kleinere und größere Flocken von zusammenhängenden Milzbrandbakterien durchsetzt und muß daher vor der Verwendung erst durch ein sterilisiertes Papierfilter von diesen gröberen Bakterienteilcheu befreit werden. Die filtrierte Aufschwemmung erscheint deutlich getrübt, doch weist diese Trübung eine homogene Beschaffenheit auf, so daß man selbst unter dem Mikroskop keine größeren Verbände von Milzbrandfäden mehr zu erkennen vermag. Die Aufschwemmung wird am einfachsten zunächst in der Konzentration von einer Öse auf 10 ccm Kochsalzlösung hergestellt und kann nun in beliebiger Weise verdünnt werden. Bei der Herstellung der Verdünnungen ist darauf Rücksicht zu nehmen, daß die gewünschte Kulturmenge stets in dem gleichen Flüssigkeitsquantum, $^1/_2$ bzw. 1 ccm, enthalten ist. Im allgemeinen ist es empfehlenswert, den drei Tieren einer jeden Kategorie die Dosen von $^1/_{10}$, $^1/_{100}$ und $^1/_{1000}$ Öse zu injizieren. Die Injektion ist subkutan auszuführen, als Injektionsstelle möglichst die Bauchhaut zu wählen.

In welcher Weise die Tiere auf diesen Eingriff reagieren und wie es möglich ist, unter Berücksichtigung der eben beschriebenen Versuchsbedingungen über den Virulenzgrad eines Milzbrandstammes Aufschluß zu erlangen, möge durch die folgenden Beispiele kurz illustriert werden. Es sind hier die Ergebnisse der Virulenzprüfung bei vier in verschiedenem Grade abgeschwächten Milzbrandkulturen aufgeführt und zum Vergleich ein Infektionsversuch mit einem hochvirulenten Milzbrandstamm angefügt.

Milzbrand A, 6 Tage bei 42,5°.

Nr.	Kaninchen Infektion	Kaninchen Erfolg	Meerschweinchen Infektion	Meerschweinchen Erfolg	Mäuse Infektion	Mäuse Erfolg
1	1/1000 Öse	† 3 Tage	1/1000 Öse	† 72 St.	1/1000 Öse	† 48 St.
2	1/100 „	blt. leben	1/100 „	† 48 St.	1/100 „	
3	1/10 „	† 4 Tage	1/10 „	† 72 St.	1/10 „	

Milzbrand B, 11 Tage bei 42,5°.

Nr.	Kaninchen Infektion	Kaninchen Erfolg	Meerschweinchen Infektion	Meerschweinchen Erfolg	Mäuse Infektion	Mäuse Erfolg
1	1/1000 Öse	bleiben leben	1/1000 Öse	† 96 Stunden	1/1000 Öse	† 34—42 St.
2	1/100 „		1/100 „	† 10—11 Tg.	1/100 „	† 52—54 „
3	1/10 „		1/10 „	† 52—54 St.	1/10 „	† 34—42 „

Milzbrand C, 20 Tage bei 42,5°.

Nr.	Kaninchen Infektion	Kaninchen Erfolg	Meerschweinchen Infektion	Meerschweinchen Erfolg	Mäuse Infektion	Mäuse Erfolg
1	1/1000 Öse	bleiben leben	1/1000 Öse	bleibt leben	1/1000 Öse	† 34—42 St.
2	1/100 „		1/100 „	„ „	1/100 „	† 34—42 „
3	1/10 „		1/10 „	† 6½ Tagen	1/10 „	† 82—90 „
4			1/100 „ unfilt.	† 74—82 St.		
5			1/10 „ „	† 50—58 „		
6			1 „ „	bleibt leben		

Milzbrand D, 10 Wochen bei 42,5°.

Nr.	Meerschweinchen Infektion	Meerschweinchen Erfolg	Mäuse Infektion	Mäuse Erfolg
1	1/200 Öse	bleiben leben	1/2000 Öse	bleiben leben
2	1/20 „		1/200 „	
3	1/2 „		1/20 „	
4	1 „		1/2 „	

Milzbrand, virulent.

Nr.	Kaninchen Infektion	Kaninchen Erfolg	Meerschweinchen Infektion	Meerschweinchen Erfolg	Mäuse Infektion	Mäuse Erfolg
1	1/10 Öse	† 24—28 St.	1/100 Öse	† 28—34 St.	1/100 Öse	† 29 St.
2	1/100 „	† 34—42 „	1/1000 „	† 32—40 „	1/1000 „	† 32—40 „
3	1/1000 „	† 34—42 „	1/5000 „	† 36—44 „	1/10000 „	† 32—40 „
4	1/5000 „	† 52—56 „	1/20000 „	† 32—40 „	1/50000 „	† 34—42 „
5	1/10000 „	† 52 „	1/50000 „	† 32—40 „	1/100000 „	† 50—58 „
6	1/50000 „	† 58—66 „	1/200000 „	† 49 „	1/200000 „	† 58—66 „
7	1/200000 „	† 75—82 „	1/500000 „	† 48—52 „	1/500000 „	† 75—83 „
8	1/500000 „	† 82—90 „	1/2000000 „	† 52—60 „	1/2000000 „	† 96 „
9	1/2000000 „	† 100—108 „	1/5000000 „	† 58—66 „	1/5000000 „	† 94 „
10	1/20000000 „	† 13—14 Tg.	1/20000000 „	lebt	1/20000000 „	† 5—6 Tage

Die Wirkung der abgeschwächten Milzbrandstämme unterscheidet sich von derjenigen der virulenten Kultur nach verschiedenen Richtungen hin. Während die Infektion mit vollvirulentem Material bei sämtlichen Tieren, Kaninchen, Meerschweinchen und Mäusen, selbst bei Verwendung minimaler Bakterienmengen regelmäßig zum Tode führt und einen Unterschied in der Empfänglichkeit dieser drei Tierarten nicht zutage treten läßt, ändern sich die Verhältnisse sofort bei der Verwendung abgeschwächter Milzbrandstämme. Milzbrand A würde in dem angeführten Beispiel zwar für Meerschweinchen und Mäuse noch sicher tödlich sein, fast genau wie ein virulenter Stamm, bei Kaninchen aber schon eine unsichere und verzögerte Wirkung erkennen lassen; Milzbrand B ist für Kaninchen vollkommen unwirksam geworden, Milzbrand C besitzt nur noch für Mäuse sichere Infektiosität und Milzbrand D hat seine pathogenen Eigenschaften selbst für Mäuse gänzlich eingebüßt. Dabei kann man ferner die Beobachtung machen, daß ausgedehnte Infiltrate an der Injektionsstelle bei manchen Tieren wieder zurückgehen. Namentlich zeigen Kaninchen, die mit einem Stamme etwa von der Virulenz der Kultur A infiziert werden, gelegentlich diese Erscheinung und kommen trotz starker ödematöser Infiltration der Bauch- und Brusthaut mit dem Leben davon. Bei virulenten Kulturen dürfte dies kaum jemals eintreten.

Neben der veränderten Empfänglichkeit der verschiedenen Tierarten, wie sie von Anfang an durch R. Koch und seine Mitarbeiter als bezeichnend für die Wirkung abgeschwächter Milzbrandstämme erkannt worden ist, macht sich aber innerhalb der einzelnen Tierarten eine Unsicherheit des Erfolges und eine gewisse Unabhängigkeit von der Dosierung bemerkbar. Wie die hier angeführten Beispiele lehren, können Tiere, die mit einer geringeren Bakteriendosis infiziert worden sind, unter Umständen rascher sterben als solche mit einer höheren Dosis, oder gelegentlich selbst Tiere nach der Infektion mit einer Öse am Leben bleiben, während die mit $^1/_{10}$ und $^1/_{100}$ Öse des gleichen Materials geimpften Tiere der Infektion erliegen. Auch pflegen mehrere Tiere, welche mit der gleichen Dosis infiziert werden, meist in ganz verschiedener Weise zu reagieren.

2. Haltbarkeit der abgeschwächten Milzbrandstämme.

Es ist das Zeichen echter Abschwächung, daß die Kulturen den ihnen künstlich verliehenen verminderten Virulenzgrad nun unter den verschiedensten Bedingungen als konstante Eigenschaft bewahren. Wie schon Pasteur, Chamberland und Roux feststellten, kehren die durch Züchtung bei 42—43° erhaltenen abgeschwächten Milzbrandstämme bei weiterer Übertragung in Bouillon und Fortzüchtung bei Brutwärme nicht wieder zu ihrer ursprünglichen Virulenz zurück. Man kann die Beobachtung machen, daß eine abgeschwächte Kultur, deren Virulenzgrad bekannt war, nach mehrjähriger Fortzüchtung unter gewöhnlichen Verhältnissen bei einer erneuten Prüfung fast genau die gleichen Ergebnisse liefert wie früher. Weder macht sich eine weitere Abschwächung, noch auch umgekehrt eine Verstärkung der Virulenz bemerkbar. Immerhin gibt es sicherlich auch Ausnahmen von dieser Regel, sowohl nach der einen wie nach der anderen Richtung, und es empfiehlt sich, wenn man sicher gehen und den Virulenzgrad eines abgeschwächten Stammes unverändert erhalten will, einige Vorsichtsmaßregeln anzuwenden. Es ist zweckmäßig, die Kulturen bei möglichst gleichmäßiger Zimmertemperatur aufzubewahren und bei Überimpfung auf neue Nährböden ein Substrat von konstanter Zusammensetzung zu benutzen. Die Aufbewahrung von

Kulturaufschwemmungen in zugeschmolzenen Glasröhrchen ist gleichfalls empfehlenswert, ebenso die Konservierung in Sporenform.

Will man einem abgeschwächten Stamm wieder eine etwas höhere Virulenz verleihen, so gelingt dies unter Umständen durch längere Kultivierung bei niedrigeren Temperaturen. Auf dem Wege der Tierpassage ist das Gleiche, wie schon R. Koch, Gaffky und Löffler hervorheben, nur ganz ausnahmsweise und sehr schwer zu erreichen. Die Anwendung dieser Methode macht aber auch deshalb eine gewisse Vorsicht erforderlich, weil es scheint, als ob die bei abgeschwächten Stämmen gelegentlich zu erzielende Virulenzsteigerung eine spezifische ist und nur die zum Versuch gewählte Tierart betrifft. Nach einigen Beobachtungen möchte Verf. annehmen, daß es möglich sei, abgeschwächte Milzbrandstämme durch wiederholte Verimpfung auf Kaninchen für diese letzteren wieder virulenter zu machen, ohne daß dabei gleichzeitig die Virulenz für Meerschweinchen zunimmt.

Eine gewisse Empfindlichkeit der abgeschwächten Stämme tritt insofern zutage, als Dauer und Temperatur der Züchtung die pathogene Wirksamkeit der einzelnen Kultur stärker zu beeinflussen pflegen, als dies bei virulenten Milzbrandkulturen der Fall ist. Im allgemeinen zeigen virulente Milzbrandkulturen nach dieser Richtung keine allzu erheblichen Differenzen, gleichgültig, ob man etwa ein- oder zweitägige Kulturen benutzt und ob die Röhrchen bei 35, 36 oder selbst 38° gehalten worden sind. Demgegenüber läßt sich die Beobachtung machen, daß bei abgeschwächten Stämmen die Infektiosität der Bakterien sehr wesentlich durch die eben erwähnten Umstände beeinflußt wird. Die höchste, ihrem Abschwächungsgrad entsprechende Virulenz pflegen derartige Kulturen zu zeigen, wenn man sie kurze Zeit, etwa 16—18 Stunden bei 35—36° kultiviert, wogegen eine längerdauernde Züchtung bei 38—39° ihre Pathogenität schon sehr deutlich beeinträchtigt. So kann es z. B. kommen, daß ein Milzbrandstamm, wie der oben als Milzbrand A bezeichnete, dessen Virulenz nur wenig hinter derjenigen des vollvirulenten Milzbrandes zurücksteht, bei Verwendung einer zweitägigen bei 39° gewachsenen Kultur Kaninchen gar nicht mehr tötet und selbst bei Meerschweinchen nur noch unsichere Wirkung äußert.

Diese Virulenzschwankungen, die durch Dauer und Temperatur der Züchtung bei abgeschwächten Stämmen veranlaßt werden können, sind indessen ganz labiler Natur, betreffen lediglich die einzelne Kultur, rufen aber keine dauernde oder konstante Virulenzänderung des betreffenden Milzbrandstammes hervor. Man muß sie nur kennen und bei der Virulenzprüfung berücksichtigen.

3. Morphologische und kulturelle Eigenschaften der abgeschwächten Kulturen.

Unter dem Einfluß der Abschwächung lassen sich an den Milzbrandbakterien im allgemeinen keine sehr wesentlichen morphologischen und kulturellen Veränderungen wahrnehmen. Derartige Stämme zeigen im großen und ganzen sowohl bei der mikroskopischen Untersuchung wie bei der Kultivierung in den gebräuchlichen Nährmedien die bekannten charakteristischen Eigenschaften des Milzbrandbazillus. Die Neigung, zu besonders langen Fäden und fadenförmigen Verbänden auszuwachsen oder auch umgekehrt kürzere, mehr stäbchenförmige Elemente zu bilden, ist eine Erscheinung, die wesentlich von der Milzbrandrasse

abhängig ist, nicht aber mit der Abschwächung im Zusammenhang steht. Man kann sowohl bei virulenten wie bei abgeschwächten Milzbrandkulturen bald die eine, bald die andere Art des Wachstums beobachten. Auch die Sporenbildung tritt gewöhnlich bei abgeschwächten Stämmen unter denselben Bedingungen und in derselben Form auf, wie bei virulenten Kulturen, und lediglich bei einem stärkeren Grade der Abschwächung, wie bei dem sogenannten „Mäusemilzbrand", d. h. einer nur noch für Mäuse virulenten Varietät, sowie bei dem völlig avirulenten Milzbrand kann die Sporenbildung eine unvollkommene sein und selbst vollständig fehlen. (Vgl. auch Pfersdorff.) Es sei übrigens in diesem Zusammenhange darauf hingewiesen, daß es dem Verf. bisher nicht geglückt ist, in den Besitz eines virulenten asporogenen Milzbrandes zu gelangen. Trotz Befolgung der von den verschiedenen Autoren (Behring, Roux u. a.) gegebenen Vorschriften wurde Asporogenität der Kulturen bei erhaltener Virulenz niemals erzielt; auch trotz wiederholter Anfragen bei verschiedenen Instituten waren asporogene Stämme nicht erhältlich.

Dementsprechend bietet das Aussehen der Milzbrandkolonien auf Gelatine- oder Agarplatten ebensowenig wie das Wachstum in flüssigen Substraten bei abgeschwächten Stämmen etwas Besonderes dar. Bei denjenigen Rassen, welche in der Regel nur kürzere Fäden bilden, kann die Form der Kolonien auf festen Nährböden mitunter ein etwas festeres Gefüge aufweisen und die bekannte Form des „Medusenhauptes" nicht in voller Schärfe hervortreten lassen. Auch wachsen derartige Stämme in Bouillonkulturen gewöhnlich nicht zu längeren, verhältnismäßig fest zusammenhängenden Fäden aus, unter Klarlassung der Flüssigkeit, sondern vermehren sich in Form kleinerer Flöckchen bei mehr oder minder diffuser Trübung der Bouillon. Dies kommt jedoch, wie erwähnt, ebenso bei manchen vollvirulenten Kulturen vor, während umgekehrt auch abgeschwächte Stämme vielfach bei ihrem Wachstum ein völlig typisches Verhalten erkennen lassen.

Die von Pasteur, Koch, Chauveau u. a. betonte Tatsache, daß abgeschwächte Milzbrandkulturen öfters ein verzögertes und weniger üppiges Wachstum zeigen, als virulente Kulturen, trifft für den Fall zu, daß es sich um Stämme von stark verminderter Virulenz handelt. So ist die langsamere Entwickelung der Kolonien, eine unvollkommenere Verflüssigung der Nährgelatine, sowie ferner die Neigung zu rascherem Absterben bei einem avirulenten Milzbrandstamm sehr ausgesprochen, aber auch bei dem „Mäusemilzbrand" unverkennbar und selbst bei den für Meerschweinchen noch pathogenen abgeschwächten Kulturen mitunter angedeutet. Bei Stämmen von verhältnismäßig geringem Abschwächungsgrade tritt dagegen diese Differenz im Vergleich mit virulenten Kulturen nicht hervor.

Gegenüber Schädigungen der verschiedensten Art läßt sich bei stark abgeschwächten Bakterien eine erhöhte Empfindlichkeit nachweisen, wogegen gewisse Alterationen des Stoffwechsels bisher nicht so genau studiert zu sein scheinen, um daraus konstante Unterschiede zwischen abgeschwächten und virulenten Milzbrandkulturen abzuleiten. Nach v. Behring soll der abgeschwächte Milzbrand weniger Säure produzieren als vollvirulente Kulturen, während die Reduktionsfähigkeit, geprüft an Stichkulturen in Lackmusagar, sowie die Bildung von Schwefelwasserstoff der Virulenz umgekehrt proportional verlaufen. Ferner gibt Andrejew an, daß virulente Kulturen energischer Stärke in Zucker umzusetzen und Eiweiß zu peptonisieren vermögen als abgeschwächte, Glyzerin und Fette (Olivenöl) dagegen unvollkommener spalten.

Innerhalb des Tierkörpers kann man bei abgeschwächten Kulturen unter Umständen ein Verhalten beobachten, das von dem virulenter Milzbrandbakterien etwas abweicht. Es kommt vor, daß die Bazillen in dem Gewebe zu mehr oder minder langen Fäden auswachsen, wie in Schnittpräparaten sehr schön zu erkennen ist, und z. B. die Glomerulischlingen der Nieren mit ungewöhnlich langen Zöpfen und Knäueln anfüllen. Ferner findet man nicht selten bei Anfertigung frischer Ausstrichpräparate aus Blut oder Milzsaft der nach der Infektion mit abgeschwächten Kulturen zugrunde gegangenen Tiere die Milzbrandstäbchen oder Milzbrandfäden in ihrer äußeren Form deutlich verändert. Schon bei gewöhnlicher Färbung, besser noch bei Anwendung der Kapselfärbung, z. B. nach Räbiger, sieht man, daß die einzelnen Stäbchen an den Enden stark kugelig aufgetrieben sind, sich infolge Zerfalls des protoplasmatischen Inhalts ungleichmäßig mit dem Farbstoff imprägnieren und eine besonders stark entwickelte Kapsel besitzen. Alle diese Erscheinungen pflegt man namentlich wahrzunehmen, wenn die Tiere erst nach längerem Krankheitsverlauf der Infektion zum Opfer fallen. Sie sind offenbar der Ausdruck einer durch längerdauernde Berührung mit den tierischen Gewebssäften an den Milzbrandbazillen hervorgerufenen Veränderung. Wenn wir ihnen daher vorwiegend bei Tieren begegnen, die mit abgeschwächten Kulturen infiziert worden waren, so liegt dies anscheinend an dem hierdurch von vornherein bedingten verzögerten Infektionsverlauf, nicht aber ausschließlich an besonderen Eigenschaften des betreffenden Milzbrandstammes. Die gleichen morphologischen Eigentümlichkeiten lassen sich nämlich unter gewissen Verhältnissen auch bei virulenten Kulturen nachweisen, sobald man durch Verimpfung sehr kleiner Bakterienmengen, wie etwa $^{1}/_{100000}$ bis $^{1}/_{1000000}$ Öse, den Tod der Tiere hinausschiebt. Namentlich in dem Ödemsaft der Infektionsstelle sind alsdann Formen wie die eben beschriebenen nicht selten zu beobachten. Auch im Reagenzglase, bei längerem Aufenthalt in flüssigem Serum, können Milzbrandbazillen, und zwar virulente so gut wie abgeschwächte, ein ganz analoges Aussehen gewinnen. Endlich wachsen auch bei Verimpfung virulenter Kulturen auf wenig empfängliche Tiere, wie z. B. Frösche, wie zuerst Petruschky feststellte, die Bakterien mitunter zu längeren Fadengeflechten aus.

C. Verwendung abgeschwächter Kulturen (Vaccins) zu Immunisierungszwecken.

Pasteursche Methode.

Das Verfahren der Milzbrandimmunisierung, das wir Pasteur verdanken, beruht bekanntlich auf der Verwendung von zwei in verschiedenem Grade abgeschwächten Milzbrandstämmen, dem „Premier Vaccin“ und dem „Deuxième Vaccin“. Das letztere ist das eigentlich immunisierende Vaccin und stellt eine Milzbrandkultur dar, welche nur wenig abgeschwächt ist, Mäuse und Meerschweinchen noch sicher, Kaninchen aber unsicher tötet. Die Kultur ist für diejenigen Tiere, bei denen sie zur Anwendung in der Praxis bestimmt ist, namentlich Rinder, Schafe und Pferde, nicht ungefährlich, sodaß erst eine Vorbehandlung der Tiere mit dem schwachen Vaccin I vorausgeschickt werden muß. Das Vaccin I tötet nur noch weiße Mäuse mit Sicherheit, Meerschweinchen dagegen nicht mehr regelmäßig und ist für Kaninchen vollkommen unwirksam. Nach der Pasteurschen Vorschrift werden die

Tiere zunächst mit diesem Vaccin und 12 Tage später mit dem Vaccin II geimpft.

Die abgeschwächten Kulturen des PASTEURschen Vaccin I und II werden durch Züchtung bei 42—43° gewonnen und dienen nun als Stammkulturen zur Herstellung der im Bedarfsfall erforderlichen Impfstoffe. Diese letzteren, d. h. also die in der Praxis zur Impfung benutzten Milzbrandvaccins, werden von den mit der Herstellung der PASTEURschen Impfstoffe betrauten Laboratorien jedesmal frisch bereitet. Die Stammkulturen selbst werden diesen Laboratorien in der Regel vom PASTEURschen Institut in Paris zur Verfügung gestellt. Die Abimpfung erfolgt, soweit bekannt, in der Weise, daß von den Stammkulturen neue Kulturen in Bouillon angelegt und etwa 2 Tage bei ca. 38° gehalten werden. Die alsdann zur Abgabe fertigen Vaccins stellen somit Bouillonkulturen abgeschwächter Milzbrandstämme dar. Die Institute übersenden dem Besteller das Vaccin II erst 12 Tage nach dem Vaccin I, damit der Impfstoff so frisch als möglich zur Verwendung gelangen kann. Die Vaccins werden in kleine, mit Gummistopfen verschlossene Glasröhren eingefüllt, aus denen die Flüssigkeit direkt in die Spritze aufgesaugt werden kann. Rinder erhalten je 0,25 ccm, Schafe die Hälfte eingespritzt. Als Injektionsstelle soll bei Schafen die Innenfläche der Oberschenkel, bei Rindern die Haut hinter den Schultern benutzt werden. Die Impfung kann auch bei Pferden, Schweinen und Ziegen Anwendung finden.

Das PASTEURsche Verfahren hat bei der experimentellen Prüfung günstige Resultate ergeben. Bekannt ist der große Versuch von Pouilly-le-Fort, durch den PASTEUR zum ersten Male einer größeren Zahl von Sachverständigen seine Schutzimpfungsmethode vorführte. 24 Hammel, 6 Rinder und eine Ziege wurden mit Vaccin I und II präventiv geimpft und am vierten Tage nach der letzten Injektion gleichzeitig mit einer großen Reihe von Kontrolltieren mit sporenhaltiger virulenter Milzbrandkultur subkutan infiziert. Der Bericht gibt an, daß zwei Tage später sämtliche vorbehandelten Tiere völlig munter und gesund waren, während die nicht immunisierten Rinder (vier) an Impfmilzbrand schwer erkrankt, die übrigen Kontrolltiere bereits gestorben waren. Über den weiteren Verlauf des Experimentes finden sich freilich keine näheren Angaben, und es verdient hervorgehoben zu werden, daß ein Experiment von gleichem Umfang und mit gleichem Erfolg seit jener Zeit nicht wieder angestellt sein dürfte. So oft wenigstens die PASTEURsche Methode in ähnlicher Weise einer experimentellen Prüfung unterworfen worden ist, ist der Verlauf nie wieder ein so vollkommen glatter und frappierender gewesen; sei es, daß schon bei der Vorbehandlung einzelne Impflinge erkrankten oder selbst starben, sei es, daß von den geimpften Tieren bei der späteren Infektion mit virulentem Material das eine oder andere trotzdem an Milzbrand zugrunde ging. Immerhin aber ist durch das Experiment an Schafen, Rindern, Pferden usw. oft genug der Beweis geliefert worden, daß die PASTEURsche Impfung in der Tat Schutz gegen eine Milzbrandinfektion zu gewähren vermag. Die Immunität entwickelt sich erst im Anschluß an die zweite Impfung (Vaccin II) und läßt sich 10—12 Tage nach dieser letzteren nachweisen. Die Probeinfektion geschieht daher am besten zu diesem Zeitpunkt.

Man kann sich leicht überzeugen, daß die immunisierten Tiere nicht nur gegen eine subkutane Infektion, sondern auch gegen den natürlichen Infektionsmodus, nämlich die Aufnahme von Milzbrandsporen mit der

Nahrung, geschützt sind. Diese Tatsache ist bereits durch Koch, Gaffky und Löffler bei ihren ersten Untersuchungen festgestellt worden, und, wenn auch die Immunität nach dieser Richtung eine weniger vollkommene zu sein scheint, so ist sie doch zweifellos in ausgesprochenem Maße vorhanden. Schafe, die mit Hilfe des Pasteurschen Verfahrens immunisiert worden sind, oder gar durch weitere Infektionen mit virulenten Milzbrandbakterien einen hohen Grad aktiver Immunität erlangt haben, können gewöhnlich mit virulenten Milzbrandsporen gefüttert werden, ohne an Darmmilzbrand zu erkranken. Die Einverleibung der Sporen kann entweder in der Weise geschehen, daß man das Sporenmaterial, an Seidenfäden angetrocknet oder auf Kartoffeln, Rüben u. dgl. gestrichen, dem Futter der Tiere beimischt, oder aber, daß man eine Aufschwemmung von Milzbrandsporen in Kochsalzlösung bzw. Wasser den Tieren mittels Schlundsonde direkt in den Magen einbringt. Die Immunität der einfach schutzgeimpften Individuen läßt sich hierbei in der Regel schon deutlich erkennen; sie ist bei Tieren, die durch wiederholte virulente Infektionen gegen subkutane Impfungen hochimmun gemacht worden sind, eine sehr ausgesprochene, insofern, als man derartigen Tieren ziemlich erhebliche Sporenmengen von mehreren Ösen oder selbst mehreren Agarkulturen ohne Gefahr zuführen kann, während die Kontrolltiere bei dem gleichen Infektionsmodus nach wenigen Tagen an typischem Darmmilzbrand eingehen. Nimmt man die Infektion hingegen so vor, wie es Koch und seine Mitarbeiter ursprünglich versuchten, daß man die vorbehandelten Tiere nicht einmal, sondern wiederholt, etwa täglich, mit größeren Mengen virulenter Milzbrandsporen füttert, so ist begreiflicherweise der Erfolg viel unsicherer, und es kann vorkommen, daß manche Tiere trotz hochgradiger aktiver Immunität dieser forzierten Art der stomachalen Infektion erliegen.

In der Praxis hat das Pasteursche Verfahren der Milzbrandschutzimpfung im großen und ganzen befriedigende Resultate ergeben. Gewisse Unsicherheiten des Erfolges sind wesentlich bedingt durch Virulenzschwankungen des zweiten Impfstoffes, des Vaccin II. Bei zu geringer Virulenz dieser Kultur, wie sie namentlich durch längere Aufbewahrung, weiten Transport, Einwirkung hoher Temperaturen in heißen Ländern, Wirkung des Sonnenlichts usw. hervorgerufen werden kann, ist naturgemäß die Schutzwirkung keine ausreichende, während andererseits bei zu hoher Virulenz, also nicht genügender Abschwächung der Kultur, Impfgefahren entstehen. Starke lokale Reaktion in Form ausgedehnter Schwellungen, Störung des Allgemeinbefindens, Ausbleiben der Milch, Abmagerung und selbst Tod der Tiere kann in diesem Falle die Folge sein. Als Durchschnitt kann man annehmen, daß das Pasteursche Verfahren heute bei Rindern etwa 1 ‰ Impfverluste bedingt, bei Schafen einen etwas höheren Prozentsatz. Die Dauer des Impfschutzes soll im allgemeinen ein Jahr betragen, wird aber sicherlich durch eine Reihe der allerverschiedensten Umstände sehr wesentlich und oft nachteilig beeinflußt.

Alle sonstigen Methoden und Impfstoffe, welche zur aktiven Immunisierung von Rindern, Schafen, Pferden usw. mittels lebender Bakterien angegeben worden sind, bedienen sich ausnahmslos des von Pasteur entdeckten Prinzips der Verwendung abgeschwächter Milzbrandstämme und können daher nur als mehr oder minder unbedeutende Modifikationen des Pasteurschen Verfahrens betrachtet werden. So sucht Cienkowski die Virulenz der Vaccins I und II dadurch möglichst kon-

stant zu erhalten, daß er sie wiederholt durch den Körper von Murmeltieren schickt, und bevorzugt außerdem die Sporenvaccins. Diese letzteren stellen sporenbildende Kulturen des Vaccin I und II dar, welchen durch Zusatz von zwei Teilen Glyzerin zu einem Teil Kultur eine hohe Haltbarkeit verliehen wird, und sollen namentlich für die Versendung über weitere Entfernungen hin empfehlenswert sein. Auch LANGE stellt im Veterinärinstitute zu Kasan Milzbrandvaccins her, die im Prinzip wohl den PASTEURschen gleichen dürften und sowohl als Bazillen- wie als Sporenvaccins zur Anwendung gelangen. In ähnlicher Weise bereitet DEUTSCH in Ungarn Milzbrandimpfstoffe. MENDEZ empfiehlt neben den PASTEURschen Vaccins, die er nach besonderem Verfahren herstellt. vor allen Dingen einen von ihm bereits mehrfach versuchten Impfstoff, die „vacuna argentina unica“. Die Zusammensetzung dieses Impfstoffes ist nicht bekannt. Die Methode bedingt nur eine einmalige Impfung. Den Vorzug der einmaligen Impfung besitzt auch das Verfahren von CHAUVEAU, bei dem ein durch hohen Druck zur Abschwächung gebrachter Milzbrandstamm als Vaccin dient. Die CHAUVEAUschen Vaccins, die heute nur noch in Chile weitere Anwendung zu finden scheinen, werden derart hergestellt, daß man abgeschwächte Sporen 30 Tage bei 36—37° in Hühnerbouillon kultiviert. Diese Impfstoffe sollen mehrere Monate ihre Wirksamkeit bewahren.

Die aktive Immunisierung kleinerer Laboratoriumstiere, soweit sie empfänglichen Tierarten angehören, bereitet außerordentlich große Schwierigkeiten. Schon KOCH, GAFFKY und LÖFFLER haben an der Hand umfassender, an einem zahlreichen Tiermaterial ausgeführter Prüfungen den Nachweis geliefert, daß Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse mit Hilfe der PASTEURschen Impfstoffe gegen virulenten Milzbrand nicht immunisiert werden können. Wenn es auch in etwas anderer Weise gelingt, wenigstens bei Kaninchen und selbst bei Meerschweinchen erfolgreiche Immunisierungen vorzunehmen, so verfügen wir doch über keine zuverlässige Methode. Es ist selbst im günstigsten Falle immer nur ein verhältnismäßig kleiner Bruchteil einer in gleicher Weise vorbehandelten Zahl von Tieren, der schließlich die Infektion mit virulentem Milzbrand übersteht und Immunität erwirbt.

ROUX und CHAMBERLAND hatten angegeben, daß Kaninchen dadurch immunisiert werden könnten, daß man ihnen große Mengen des I. Vaccins (40 ccm) in die Ohrvene einspritzt, die Injektion nach zwei bis drei Tagen wiederholt und nun eine subkutane Impfung mit 0,25 ccm des II. Vaccins folgen läßt. Eine Immunisierung von Kaninchen ist auf diese Weise in der Tat möglich, doch sind die Ergebnisse so schwankende, daß z. B. MELNIKOW-RASWEDENKOW bei sorgfältiger Nachprüfung der Methode nur zu Mißerfolgen gelangte. Am zweckmäßigsten erscheint es, Kaninchen in Zwischenräumen von 8–10 Tagen mit je zwei bis drei subkutanen Injektionen des Vaccin I und II in stets gesteigerten Dosen zu behandeln. Auch erleichtert unter Umständen die Einfügung von Milzbrandstämmen, welche in ihrer Virulenz etwa in der Mitte zwischen den beiden Vaccins stehen, die Erreichung des Zieles. In jedem Falle bleibt es ein höchst langwieriges und mühseliges Unternehmen. Haben die Tiere aber einmal sichere Immunität gegen virulenten Milzbrand erworben, so vertragen sie sehr bald auch die Impfung mit beträchtlichen Bakterienmengen. Man kann derartige Kaninchen mit mehreren Ösen, selbst einer halben oder ganzen Agarkultur ohne Schaden infizieren. Auch die Verfütterung von Milzbrandsporen bleibt bei ihnen wirkungslos.

Noch schwieriger gestaltet sich die Immunisierung von Meerschweinchen. Trotz vorsichtiger langdauernder Vorbehandlung mit abgeschwächten Milzbrandstämmen gelingt es in der Regel nicht, den Tieren einen sicheren Impfschutz gegen die Infektion mit virulentem Material zu verleihen. Die meisten Tiere pflegen schon im Laufe der Immunisierung einzugehen, und zwar gewöhnlich dann, wenn man von einem schwächeren Vaccin zu dem stärkeren übergeht. Auch bei Verwendung möglichst geringer Kulturmengen läßt sich der Erfolg im allgemeinen nicht viel sicherer gestalten. Wenn Meerschweinchen soweit gebracht werden können, daß sie die Impfung mit Kulturen von der Virulenz des Pasteurschen Vaccin II überstehen, so ist dies schon ein seltenes und außerordentlich günstiges Ergebnis. Zwar hat De Nittis angegeben, daß er Meerschweinchen durch langsame, über zwei bis drei Monate sich erstreckende systematische Vorbehandlung mit Pasteurs Vaccin I und II gegen virulenten Milzbrand immunisieren konnte, und auch anderweitig hat man in ganz vereinzelten Fällen ähnliches beobachtet, doch dürfte es sich hierbei um recht seltene Ausnahmen und einen besonders glücklichen Zufall handeln. Nach den Erfahrungen des Verfs. verfügen wir zurzeit über keine Methode, welche es gestattet, Meerschweinchen unter Benutzung abgeschwächter Milzbrandkulturen mit einiger Sicherheit gegen Milzbrand aktiv zu immunisieren. Wenn das einmal gelingt, so sind hierfür mehr gewisse Zufälligkeiten als ein bestimmtes systematisches Vorgehen entscheidend.

Für die Immunisierung von Mäusen gegen virulenten Milzbrand gibt es noch weniger ein brauchbares Verfahren. Die Behandlung mit abgeschwächten Kulturen führt kaum jemals zum Ziele.

D. Verwendung intrazellulärer und extrazellulärer Stoffe aus Milzbrandkulturen und Milzbrandorganen zu Immunisierungszwecken.

An Stelle lebender abgeschwächter Kulturen die sterilisierten Bakterienprodukte aus Milzbrandkulturen und Milzbrandorganen für die Zwecke der Immunisierung zu benutzen, ist schon seit langer Zeit versucht worden. Die Ergebnisse sind indessen im allgemeinen sehr wenig befriedigend gewesen.

Roux und Chamberland erhitzten das Blut, das sie aus Milz und Herz eines an Milzbrand gestorbenen Hammels gewannen, in zugeschmolzenen Röhrchen an fünf aufeinander folgenden Tagen je eine Stunde auf 58° und fanden, daß das so sterilisierte Blut zur Immunisierung von Schafen brauchbar war. Durch wiederholte Vorbehandlung mit steigenden Dosen konnten mehrere Tiere soweit gebracht werden, daß sie der Probeimpfung widerstanden, doch war der Impfschutz nur schwach und von kurzer Dauer. Wooldridge berichtete über erfolgreiche Immunisierung von Kaninchen, die er mit sterilisierten Milzbrandkulturen vorbehandelt hatte. Die Kulturen wurden in Eiweißlösungen, die aus Thymus- und Hodensubstanz vom Kalbe mittelst Alkali gewonnen waren, gezüchtet und später durch Kochen bzw. Filtration sterilisiert. Die intravenöse Injektion von 25—30 ccm dieser Flüssigkeit erwies sich als ausreichend. Brieger, Kitasato und Wassermann gelangten bei ähnlicher Versuchsanordnung wie Wooldridge zu durchaus negativen Resultaten, erzielten aber bei Verwendung eines anderen Impfmaterials, nämlich der von Meerschweinchen gewonnenen Milzbrandmilz, die mit Thymusextrakt verrieben und hierauf 15 Minuten bei 70° erhitzt wurde.

gewisse Schutzwirkungen. De Christmas konnte Kaninchen mit Blut und Organen von Milzbrandtieren, nach Abtötung der darin enthaltenen Keime durch Eukalyptusöl, gegen Milzbrand immunisieren. Auch durch Wyssokowitsch, Hankin, Arloing, Emmerich und Thönnessen u. v. a. sind Beobachtungen mitgeteilt, wonach Milzbrandkulturen oder Extrakte und Präparate aus Milzbrandorganen, Milzbrandblut usw. nach geeigneter Sterilisierung gelegentlich immunisierende Eigenschaften besitzen sollen. Die Angaben Tibertis, daß mit einem aus Milzbrandkulturen dargestellten Nukleoproteid Kaninchen und Schafe immunisiert werden können, sind von Galeotti und Rossi zwar bestätigt, von anderer Seite aber (Vigorita, Casagrandi) entschieden bekämpft worden.

Alle diese Methoden ergeben meist nur unzuverlässige Resultate. Der Impfschutz, den man nach Vorbehandlung mit Stoffen der eben erwähnten Art bei Tieren gelegentlich eintreten sieht, läßt sich auch als Ausdruck einer gesteigerten Resistenz deuten und muß nicht ohne weiteres als echte Immunität angesprochen werden. Zudem sind andere Untersucher bei Anwendung der gleichen oder ähnlicher Methoden zu völlig negativen Ergebnissen (Petermann, Klemperer, Maltzew, Hahn u. a.) gekommen. Die Frage, ob es möglich sei, durch keimfreies Material eine Milzbrandimmunität zu schaffen, ist daher bis vor kurzem wohl allgemein in verneinendem Sinne beantwortet worden.

Erst neuerdings sind Beobachtnngen bekannt gegeben worden, wonach man doch wohl mit der Möglichkeit einer aktiven Immunisierung unter Ausschluß lebender Bakterien zu rechnen haben dürfte. So hat namentlich Bail in mehreren Mitteilungen berichtet, daß man mit Hilfe der „Aggressine" auch beim Milzbrand imstande sei, sichere Immunität zu erzielen. Das von ihm geübte Verfahren besteht darin, daß Schafe oder Kaninchen, unter Umständen auch Meerschweinchen, mit virulenter Milzbrandkultur subkutan infiziert werden, und daß nun nach dem Tode der Tiere das mehr oder minder ausgedehnte lokale ödematöse Infiltrat zur Aggressingewinnung verwendet wird. Die Ödemflüssigkeit soll zu diesem Zwecke in besonderer Weise sterilisiert werden und alsdann einen höchst wirksamen Impfstoff darstellen. Das keimfreie Milzbrandödem, das Milzbrand-Aggressin, ist nach den Angaben Bails ohne irgendwie nennenswerte Giftwirkung und ruft auch in größeren Dosen bei Schafen, Kaninchen und Meerschweinchen keine Krankheitserscheinungen hervor. Die immunisierende Wirkung soll eine sehr ausgesprochene sein und klar zutage treten, wenn man die mit dem keimfreien Ödem vorbehandelten Tiere etwa 10 Tage später mit virulenten Kulturen subkutan infiziert. Bei Schafen genügt die Vorbehandlung mit 2,5—15 ccm Aggressin; bei Kaninchen empfiehlt sich 2—5 ccm Aggressin zu injizieren. Auch eine Immunisierung von Meerschweinchen ist auf diese Weise möglich. Bemerkenswert ist, daß die Aggressinwirkung für die verschiedenen Tierarten insofern eine spezifische zu sein scheint, als das von einem bestimmten Tier gewonnene Aggressin bei der gleichen Tierart die sichersten Resultate ergibt. So bewährt sich z. B. bei Meerschweinchen das Kaninchen-Aggressin weniger gut als ein Meerschweinchen-Aggressin. Außer dem keimfreien Ödem können auch Peritonealexsudat oder Blut von Milzbrandtieren in sterilisiertem Zustande Aggressinwirkung äußern. Die Immunität, welche sich durch Aggressininjektion schaffen läßt, wird von Bail deshalb als eine aktive angesprochen, weil nach seinen Versuchen die Tiere erst nach 8—10 Tagen ihren Impfschutz erwerben. Infiziert man sie vorher mit virulenten Kulturen, so zeigen sie noch

keine Spur von Immunität, sondern gehen eben so rasch, unter Umständen selbst rascher zugrunde, als die Kontrolltiere. Es tritt also hier gewissermaßen noch die infektionsbefördernde Kraft der Aggressine zutage. Außerdem entstehen nach BAIL im Körper aggressinbehandelter Tiere spezifische Antikörper, Antiaggressine, so daß es möglich ist, durch Aggressinimmunisierung ein Milzbrandserum besonderer Art zu gewinnen. Hierüber vgl. Abschnitt Milzbrandserum.

Die Angaben BAILS haben bei dem Milzbrand eine genaue Nachprüfung noch nicht erfahren, wohl aber dürften ältere Mitteilungen, wie namentlich diejenigen von WERNICKE, MUZIO, CASAGRANDI u. a., wonach aus den Organen der an Milzbrand gestorbenen Tieren vaccinierende Stoffe gewonnen werden können, vielleicht in ähnlichem Sinne aufzufassen sein. Es scheint jedenfalls von Wichtigkeit zu sein, daß das zur Sterilisierung des Milzbrandmateriales angewandte Verfahren einen möglichst schonenden Eingriff darstellt. Stärkeres Erhitzen soll die Aggresinwirkung zerstören, Filtration sie schon beträchtlich herabsetzen.

II. Kombinierte aktive und passive Immunisierung (Serovaccination).

Nachdem auf dem Wege der Serovaccination, d. h. der kombinierten aktiven und passiven Immunisierung, besonders in der Form der Simultanimpfung bei dem Schweinerotlauf und der Rinderpest außerordentlich günstige Resultate erzielt worden waren, lag es nahe, auch für den Milzbrand etwas Ähnliches zu versuchen. Es bestand die Hoffnung, den einen großen Mangel, den das PASTEURsche Verfahren besitzt, nämlich die zweimalige Impfung zu beseitigen und damit den umständlichen und langwierigen Gang der Immunisierung durch einen einmaligen Eingriff zu ersetzen.

Die ersten Versuche, welche Verf. mit Hilfe des kombinierten aktiven und passiven Verfahrens anstellte, waren ermutigend, so daß er das Verfahren weiter auszugestalten sich bemühte. Auf Grund der nunmehr seit einer Reihe von Jahren gesammelten Erfahrungen haben sich bezüglich der Serovaccination bei Milzbrand die folgenden Gesichtspunkte ergeben:

Die kombinierte Immunisierung wird am besten in der Weise vorgenommen, daß man den Tieren gleichzeitig, aber an getrennten Hautstellen, ein hochwirksames Milzbrandserum und eine abgeschwächte Milzbrandkultur injiziert (Simultanimpfung). Über Herstellung, Prüfung und Dosierung des Serums wird an späterer Stelle des näheren berichtet werden. Was die Kultur anlangt, so ist aus naheliegenden Gründen die Verwendung virulenter Milzbrandbakterien praktisch bedenklich und nicht anwendbar, obwohl durch das gleichzeitig einverleibte hochwertige Serum die tödliche Wirkung virulenter Bakterien leicht ausgeglichen und damit wohl sicherlich ein noch wirksamerer Impfschutz geschaffen werden könnte als bei Verwendung abgeschwächter Kulturen. Nur aus rein praktischen Gesichtspunkten und allgemeinen hygienischen Bedenken mußte daher von der Verimpfung virulenter Kulturen Abstand genommen werden.

Die bei der Serovaccination zu benutzenden Kulturen besitzen am besten einen Abschwächungsgrad, der demjenigen des PASTEURschen Vaccin II entspricht. Die Stammkulturen werden genau wie die PASTEURschen Vaccins durch Züchtung bei höherer Temperatur gewonnen und

können unter den früher erwähnten Vorsichtsmaßregeln lange Zeit aufbewahrt werden, ohne daß wesentliche Virulenzänderungen nachträglich auftreten. Der einmal erreichte Virulenzgrad kann monate-, ja selbst jahrelang konstant erhalten bleiben. Bei weiterer Abnahme der Virulenz kann man durch mehrtägige Züchtung bei niedrigeren Temperaturen (33—34°) oder durch Tierpassage, am besten bei Schafen, in der Regel wieder eine Erhöhung der Pathogenität erreichen.

Für die Herstellung des im einzelnen Falle erforderlichen Impfstoffes empfielt Verf. nicht Bouillonkulturen, sondern Aufschwemmungen in steriler Kochsalzlösung. Das Verfahren, das sich ihm seit Jahren bewährt hat, besteht darin, daß von der Stammkultur zunächst neue Kulturen angelegt, 24 Stunden bei 37° und alsdann noch ein bis zwei Tage bei Zimmertemperatur gehalten werden. Von diesen Kulturen wird eine Aufschwemmung in der Weise bereitet, daß eine Öse der Bakterien auf 50 bzw. 100 ccm Kochsalzlösung verteilt und möglichst gleichmäßig und sorgfältig mit der Flüssigkeit vermischt wird. Die stärkere Konzentration dient für Rinder- und Pferde-, die schwächere für Schafimpfungen. Die Verwendung derartiger Aufschwemmungen besitzt vor den Bouillonkulturen den Vorzug, daß, wie eine größere Zahl von Prüfungen gelehrt hat, die Lebensfähigkeit und Virulenz der Bakterien viel längere Zeit gleichmäßig erhalten bleibt als bei Bouillonkulturen. Wiederholt konnte festgestellt werden, daß die Bakterienaufschwemmungen, die in kühlem Raum und vor Licht geschützt wochenlang aufbewahrt worden waren, fast genau noch die gleiche pathogene Wirkung äußerten, wie unmittelbar nach der Bereitung.

Die ersten Versuche an Schafen zeigten, daß es möglich ist, durch die Injektion fertiger Mischungen von Serum und abgeschwächter Kultur Tiere gegen Milzbrand zu immunisieren, doch wurde späterhin aus verschiedenen Gründen die getrennte Einspritzung der beiden Impfstoffe bevorzugt. Einmal wiesen nämlich anderweitige Erfahrungen darauf hin (Rinderpest, Rotlauf), daß die Reaktion und damit der Impfschutz sich wirksamer gestalten lassen, wenn Serum und Virus für sich allein injiziert werden, vor allen Dingen aber war es im Hinblick auf praktische Verhältnisse sehr schwierig, fertige Mischungen eines mit Karbolsäure versetzten Serums und lebender Bakterien so herzustellen, zu versenden und aufzubewahren, daß Lebensfähigkeit und Virulenz der Bakterien unverändert blieben. Die in großem Maßstabe späterhin an Schafen ausgeführten Impfungen in Form getrennter Serum- und Kultureinspritzung lieferten ein recht günstiges Ergebnis. Auch bei Rindern ließ sich die Wirksamkeit einer derartigen kombinierten aktiven und passiven Immunisierung experimentell erweisen. Ferner zeigte sich, daß die immunisierten Tiere (Schafe) gegen die Verfütterung von Milzbrandsporen geschützt waren.

Die Dosis der Impfstoffe ist so zu wählen, daß Rinder 5 ccm Serum und 0,5 ccm der stärker konzentrierten Bakterienaufschwemmung erhalten. Für Kälber ist die Kulturmenge von 0,3—0,5 ccm, je nach Größe und Alter der Tiere, ausreichend. Bei Pferden sind 5 ccm Serum und 0,5 ccm Kultur (stärkere Konzentration) zu injizieren, bei Schafen 4 ccm und 0,25 ccm der schwächeren Aufschwemmung. Als Injektionsstellen sind bei Rindern und Pferden am zweckmäßigsten die beiden Halsseiten, bei Schafen die Innenflächen der beiden Hinterschenkel zu wählen. Die Impfung an anderen Hautstellen vorzunehmen, ist zulässig und beeinträchtigt erfahrungsgemäß die Wirkung in keiner Weise, wenn

nur darauf Bedacht genommen wird, daß die Impfstelle nicht späterhin äußeren Läsionen durch den Druck des Geschirres usw. ausgesetzt wird und daß der Ort der Kulturinjektion von dem der Seruminjektion genügend entfernt ist. Die Impfungen sollen als Simultanimpfungen ausgeführt werden, d. h. in der Weise, daß Serum und Kultur zu gleicher Zeit zur Injektion gelangen, jedenfalls ein längerer Zeitraum zwischen der Einverleibung der beiden Impfstoffe nach Möglichkeit vermieden wird. Am besten impft man zunächst eine gewisse Anzahl von Tieren, etwa 10—12, mit dem Serum und alsdann die nämlichen Tiere in der gleichen Reihenfolge auf der anderen Seite mit der Kultur. Hierbei liegt zwischen den beiden Injektionen nur eine Zeit von wenigen Minuten. Man kann aber auch die Kulturinjektion der Serumeinspritzung unmittelbar anschließen, was namentlich bei der Impfung größerer Bestände auf freiem Felde, wobei die Tiere zusammengetrieben bzw. einzeln eingefangen werden müssen, empfehlenswert ist. Nur ist darauf zu achten, daß niemals etwa zuerst die Kulturinjektion vorgenommen wird.

Bei vorschriftsmäßiger Ausübung des Verfahrens ist die Impfung von keiner irgendwie nennenswerten Reaktion gefolgt. Bei Schafen kann man in der Regel in den nächsten Tagen eine mehr oder minder starke Temperatursteigerung verzeichnen, ohne daß indessen sonst Störungen des Allgemeinbefindens oder auch örtliche Veränderungen nachweisbar wären. Bei Rindern pflegt selbst eine Temperatursteigerung meist auszubleiben, so daß die Impfung überhaupt keine wahrnehmbare Wirkung hinterläßt. Nur ganz ausnahmsweise kann es zu etwas stärkeren Impfreaktionen kommen, die durch Ansteigen der Körpertemperatur und Infiltration an der Injektionsstelle charakterisiert sind. Vereinzelte Impfverluste sind lediglich dann beobachtet worden, wenn es sich um unvorsichtige Ausführung der Impfungen handelte, z. B. an Zugochsen, die während angestrengter Feldarbeit geimpft und sogleich nach der Impfung wieder zur Arbeit herangezogen wurden. Gewisse Nebenwirkungen, welche durch das Serum gelegentlich einmal veranlaßt sein können, werden in dem Kapitel „Milzbrandserum" besprochen werden. Vereinzelte Beobachtungen über das Auftreten lähmungsartiger Schwäche der hinteren Extremitäten sind vielleicht im Sinne einer Toxonwirkung aufzufassen. Wie zuerst Sclavo feststellte, kann man bisweilen bei Kaninchen, die mit Serum und Kultur infiziert worden sind und die Infektion überstanden haben, nach einiger Zeit Lähmungserscheinungen beobachten, die Sclavo wohl mit Recht als eine durch ungenügende Neutralisierung der Kultur hervorgerufene Toxonwirkung deutet. Daß ähnliche Symptome in selteneren Fällen auch bei Rindern auftreten können, ist später durch Detre-Deutsch, Verf. u. a. festgestellt worden.

Der Nutzen der Simultanimpfung gegen Milzbrand ist im Laufe der Jahre in der Praxis durch zahlreiche Impfungen erwiesen worden. (Vgl. Sobernheim, Jäger, Riegler, Räbiger.)

Literatur.

1) Andrejew, St. Petersburger Archiv für Veterinärwissensch. 1898.
2) Arloing, Compt. rend. de l'Acad. 1886, Tome C und CI.
3) Ders., Compt. rend. de l'Acad. 1892.
4) Bail, Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVI und XXXVII.
5) Behring, Centralbl. für klin. Med. 1888.
6) Ders., Zeitschr. für Hygiene 1889, Bd. VI und VII.

7) Brieger, Kitasato und Wassermann, Zeitschr. für Hygiene 1892, Bd. XII.
8) Casagrandi, Ann. d'igiene speriment. 1902.
9) Chauveau, Compt. rend. de l'Acad. 1884, Bd. XCVIII.
10) de Christmas, Ann. de l'Inst. Pasteur 1891.
11) Cienkowski, Zit. nach Wyssokowitsch.
12) Detre-Deutsch, VIII. Intern. Tierärztl. Kongreß. Budapest 1905.
13) Deutsch und Feistmantel, Die Impfstoffe und Sera. Leipzig 1903.
14) Emmerich, Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII.
15) Frank, Centralbl. für Bakt. 1890, Bd. VIII.
16) Galeotti, Il Morgagni 1903, Vol. XLV.
17) Hahn, Münchener med. Wochenschr. 1897.
18) Hankin, Brit. med. Journ. 1889. — Centralbl. für Bakt. 1891, Bd. IX und X.
19) Jäger, Monatshefte für prakt. Tierheilk. 1904, Bd. XV.
20) Koch, Gaffky und Löffler, Mitteil. aus dem Kaiserl. Gesundh.-Amt 1881, Bd. I und 1884, Bd. II.
21) Klemperer, Zeitschr. für klin. Med. 1891, Bd. XX.
22) Lange, Ref. Baumgartens Jahresber. 1894, Bd. X.
23) Lubarsch, Fortschr. der Med. 1888, Bd. VI.
24) Maltzew, Russkaja med. 1891.
25) Melnikow-Raswedenkow, Zeitschr. für Hygiene 1897, Bd. XXV.
26) Mendez, Centralbl. für Bakt. 1898, Bd. XXIV und 1899, Bd. XXVI. — Annal. del circul. med. Argent. 1901.
27) Muzio, Rif. med. 1898.
28) de Nittis, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901.
29) Ogata und Jasuhara, Ref. Centralbl. für Bakt. 1891.
30) Pasteur, Bull. de l'Acad. de méd. 1880.
31) Pasteur, Chamberland und Roux, Compt. rend. de l'Acad. 1881, Vol. XCVII.
32) Petermann, Ann. de l'Inst. Pasteur 1891 und 1892.
33) Petruschky, Beiträge zur pathol. Anat. usw. 1888, Bd. III.
34) Pfersdorff, Zeitschr. für Tiermedizin 1904, Bd. VIII.
35) Phisalix, Compt. rend. soc. biol. 1900.
36) Räbiger, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1907.
37) Riegler, Arch. vétérin. 1905, Vol. II, Nr. 7.
38) Rossi, Gazz. intern. di med. 1904.
39) Roux, Ann. de l'Inst. Pasteur 1890.
40) Roux und Chamberland, Ann. de l'Inst. Pasteur 1887 und 1888.
41) Sanarelli, Centralbl. für Bakt. 1891, Bd. IX.
42) Sclavo, Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII.
43) Sobernheim, Kolle-Wassermann 1902, Bd. II und 1904, Bd. IV. — Zeitschr. für Hygiene usw. der Haustiere 1906, Bd. I.
44) Thönnessen, Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII.
45) Tiberti, Centralbl. für Bakt 1904, Bd. XXXVI und 1906, Bd. XL.
46) Toussaint, Compt. rend. de l'Acad. 1880, Tome XCI.
47) Vigorita, Zit. nach Tiberti, 1904.
48) Wernicke, Vgl. Kolle-Wassermann, Bd. IV, pag. 797.
49) Wooldridge, Proc. of the Royal Soc. 1887, Vol. XLII. — Archiv für Anat. u. Physiol. 1888.
50) Wossnessensky, Compt. rend. de l'Acad. 1884, Bd XCVIII.
51) Wyssokowitsch, Fortschr. der Med. 1889.

XXV.

Die Rauschbrandschutzimpfung.

Von

R. Grassberger und **A. Schattenfroh**

in Wien.

Die Versuche, durch eine spezifische Schutzimpfung dem Ausbrechen des endemischen Rauschbrandes der Rinder — der natürliche Rauschbrand der Schafe ist bisher kaum jemals einwandfrei erhoben worden — vorzubeugen, nehmen in besonderem Maße unser Interesse in Anspruch. Denn abgesehen von dem Umstande, daß einige dieser Verfahren zu den ältesten Methoden der spezifischen Immunisierung gehören und im Anschlusse an die grundlegenden Entdeckungen Pasteurs und im Sinne dieser bereits seit mehr als zwei Dezennien geübt werden, verdient im vorliegenden Falle vor allem folgende Tatsache Beachtung. Wie wir später auseinandersetzen werden, konnten aus einer ganzen Reihe von Immunisierungsmethoden, die wir im Laufe der Vertiefung der Studien über den Rauschbranderreger allmählich in Vorschlag brachten, zwar wichtige Anhaltspunkte für die Pathogenese des Prozesses abgeleitet werden, der Erfolg der neueren Verfahren in der Praxis, der Schutzwert, entsprach aber nicht dem Gewinn an theoretischem Tatsachenmaterial. Die fortschreitende Erkenntnis der Pathogenese von Infektionsprozessen, von solchen Mißerfolgen der Schutzimpfung lebhaft gefördert, läßt sich ihrerseits leider nicht in jedem Falle in günstige praktische Erfahrungen umsetzen, und so wird man sich — wenigstens gilt dies für die Rauschbrandimpfung — dazu verstehen müssen, empirischen, beträchtlich vor der Aufklärung der biologischen Eigentümlichkeiten des Erregers angewendeten Verfahren, die aber eine angemessene Schutzwirkung ausüben, den Vorzug einzuräumen. Das beste unserer humanen Schutzimpfungsverfahren, die Pockenvaccination, ist ein wichtiges Beispiel für die nicht selten zu beobachtende Überlegenheit von Verfahren, die einer glücklich beobachtenden Empirie entstammen, über die Errungenschaften einer raffinierten Laboratoriumsmethodik, wie sie die moderne Wissenschaft an die Hand gibt. Den Autoren sitzt hier der Pfeil im eigenen Fleische. Doch sei der Bericht über die Leidensgeschichte der zahlreichen Bestrebungen auf diesem Gebiete vorläufig zurückgestellt und zunächst eine übersichtliche Darstellung der gegenwärtig üblichen älteren und neueren Schutzimpfungsverfahren der Praxis und der Literatur gegeben. Erst im Anschlusse daran sei unserer eigenen Erfahrungen gedacht.

I. Bisherige Verfahren der Rauschbrandschutzimpfung.

Überblickt man die bisher eingeführten oder wenigstens in größeren Versuchsreihen erprobten Verfahren der Rauschbrandschutzimpfung, so erkennt man unschwer ihre Beziehungen zu dem jeweiligen Stande der Immunitätsforschung im allgemeinen, deren einzelne Stadien — aufgebaut auf gelungene Züchtung und Serumgewinnung — sich deutlich wiederspiegeln. Wir begegnen vor allem Methoden, die eine aktive Immunisierung der Impflinge anstreben, entsprechend den besonderen Indikationen der nicht kontagiösen Rauschbranderkrankung, Verfahren, die auch der Notwendigkeit Rechnung zu tragen haben, daß ein genügend langer, zum mindesten über die vier- bis fünfmonatliche Sömmerungsperiode sich erstreckender Impfschutz zustande kommt.

Aus diesem Grunde ist auch bisher in der Praxis von einem spezifischen Serum nur bei der sogenannten kombinierten Impfung Anwendung gemacht worden, wobei die Applikation des Serums vor der Einverleibung des eigentlichen Vaccins nur die Aufgabe hat, überstarke Impfreaktionen (s. w. u.) nach Möglichkeit hintanzuhalten. Zur aktiven Immunisierung der Rinder findet nun teils der Fleischsaft bzw. das Fleisch von an natürlichem oder experimentellem Rauschbrand verendeten Tieren Verwendung, teils werden zu dem gleichen Zwecke auf verschiedene Weise gewonnene Kulturen des Rauschbrandbazillus benützt. Wir haben demnach zu erörtern a) die Schutzimpfungsverfahren mittels rauschbrandigen Materials, b) die Kulturimpfverfahren, c) die kombinierte Schutzimpfung. In letzterem Abschnitt werden sich einige wenige Bemerkungen über die Anwendung von Serum allein einfügen lassen.

A. Die Schutzimpfungsverfahren mittels rauschbrandigen Materials.

Nachdem zuerst (1880) aus Versuchen von Arloing, Cornevin und Thomas sich ergeben hatte, daß sich bei Jungrindern durch intravenöse und intratracheale Injektionen von Fleischsaft rauschbrandiger Rinder eine Schutzwirkung gegenüber der nachmaligen subkutanen Infektion mit virulentem Materiale erzielen läßt — ohne daß aber diese Verfahren in die Praxis Eingang gefunden hätten — begründeten die gleichen Autoren einige Jahre später (1883) die seither vielfach in Anwendung gekommene Methode der Schutzimpfung mit „abgeschwächtem" Rauschbrandfleischsafte, ein Verfahren, das heute allgemein unter dem Namen „Lyoner Methode" bekannt ist.

Entsprechend der ursprünglichen Vorschrift der Autoren wird die Impfung in folgender Weise ausgeführt. Es gelangen zwei Vaccins zur Anwendung, die sich voneinander dadurch unterscheiden, daß sie verschieden hohen Temperaturen (zur Abschwächung des Krankheitsvirus) ausgesetzt werden.

Der bei mäßiger Temperatur auf flachen Tellern angetrocknete Saft aus rauschbrandigen Gewebsstücken wird abgekratzt und nach Anfeuchtung mit Wasser, durch Einstellen der Proben in ein Ölbad sechs Stunden auf 100—104° C (Vaccin I), bzw. 85—90° C (Vaccin II) erhitzt. Hierdurch soll eine derartige Abschwächung der im Muskelsafte stets vorhandenen Sporen des Rauschbrandbazillus zustande kommen, daß bei Einverleibung des Impfstoffes nur mehr eine geringfügige, ungefährliche,

wohl aber zu einer ausreichenden Immunisierung führende Reaktion im Körper der Impflinge eintritt (s. sp. bei: Erfolge der Schutzimpfung). Das wieder trocken gewordene Material kann nun in Pfeffermühlen zerkleinert werden, das Pulver wird hierauf in Papierkapseln gefüllt und gelangt in diesen zur Versendung (Vaccin I und II). Die Impfung wird nach der Originalvorschrift derart bewerkstelligt, daß zunächst Vaccin I (pro Rind etwa in einer Menge von 0,01 – 0,02 g) durch Reiben in einem Mörser mit Wasser in Emulsion gebracht wird — eine Prozedur, die in der Regel gleich in einem für 10—20 Dosen ausgeführt wird —; die Flüssigkeit wird dann in besonderen graduierten Spritzen und zwar am Schweife drei Handbreiten oberhalb des Endes injiziert, nachdem die Haare an der Impfstelle mittels einer Schere gekürzt wurden. Um das Zurückfließen der Injektionsflüssigkeit zu verhindern, wird ein primitiver Verband durch Umwickeln der Impfstelle mittels eines starken Bindfadens angelegt, der nach einigen Stunden zu entfernen ist. 10—14 Tage später wird Vaccin II, genau in der gleichen Weise wie Vaccin I, injiziert.

Das hier skizzierte Verfahren hat wohl im Laufe der Zeit manche Abänderung erfahren, sowohl hinsichtlich des Ausgangsmateriales für die Bereitung der Vaccins, als auch in bezug auf die Einzelheiten der Impfung. Es muß aber fraglich erscheinen, ob hierdurch nennenswerte, wirklich ins Gewicht fallende Verbesserungen erzielt wurden.

An erster Stelle wäre zu erwähnen, daß in einer Reihe von Fällen an Stelle der zweimaligen Schweifimpfung mit Vaccin I und II die einmalige Schweifimpfung mit einem nach Art des Vaccins II bereiteten Impfstoffe in Anwendung gekommen ist — so auch kürzlich im Kantone Bern, nach freundlichen Mitteilungen des Herrn Prof. Guillebeau, mit bestem Erfolge. Wird schon hierdurch die Ausführung der Impfung erleichtert, so bedeutet die z. B. in Nordamerika in ganz großem Maßstabe durchgeführte, übrigens auch in Europa im vorigen Jahrzehnt vielfach empfohlene einmalige Schulterimpfung eine weitere wesentliche Vereinfachung der technischen Seite des Verfahrens, da die Vorbereitungen bei dieser Art der Applikation weniger umständlich sind und weniger Zeit erfordern, die Prozedur selbst auch zweifellos für die Impflinge weniger schmerzhaft ist als der Einstich in die nervenreiche Schweifhaut. Auch eine zweimalige Schulterimpfung wurde gelegentlich versucht. Als originelle Abart des Lyoner Verfahrens sei noch der Thomasschen Schweif-Fadenimpfung gedacht. Hierbei wird ein mit abgeschwächtem rauschbrandigen Materiale getränkter, nachher getrockneter Faden mittels einer kleinen Harpune unter die Schweifhaut gezogen, woselbst er liegen bleibt. Es entwickelt sich nun ein lokalisierter rauschbrandiger Prozeß, der zur Immunisierung führen soll; der Faden wird nach einiger Zeit ausgestoßen. Das Verfahren ist nach Angabe des Autors an einer großen Anzahl von Rindern in Amerika zur Ausführung gelangt.

Was die Art des Impfstoffes betrifft, so sei vor allem die Verwendung von getrocknetem Rauschbrandfleisch an Stelle des von Arloing ursprünglich verwendeten Rauschbrandsaftes erwähnt. Der Vorschlag stammt von Kitt (1890). Getrocknetes Rauschbrandfleisch wird in einer Kaffeemühle zu Pulver gemahlen und hierauf 5 – 6 Stunden strömendem Wasserdampfe ausgesetzt. Hierdurch wird eine ähnliche Abschwächung wie im Arloingschen Verfahren angestrebt. Es scheint, daß diese Variante sich allmälig einbürgert. Wenigstens sind nach den Berichten des Bureau of animal Industry in Washington (Annual Report 1897—1902) mit der einmaligen Impfung unter Anwendung von Fleisch-

impfstoff (6 Stunden bei 93—94° C erhitzt) sehr günstige Erfahrungen gemacht worden und ebenso wird im Kanton Bern nach freundlichen Mitteilungen von Professor Guillebeau seit 1905 (auch im heurigen Jahre durchgeführt) nur mehr Fleischimpfstoff verwendet. Die Dosis beträgt gleichfalls 0,01—0,02 g. Daß dieses Verfahren durch prinzipielle Vorteile ausgezeichnet sein sollte, kann wohl kaum angenommen werden; der wesentlichste Unterschied dürfte in der ökonomischeren Verwertung des Rauschbrandmateriales und in einer Vereinfachung der Herstellung des Vaccins gelegen sein.

All den genannten Verfahren, die rauschbrandiges Material verarbeiten, kommt in technischer Hinsicht der Nachteil zu, daß die Verreibung des Impfstoffes eine sehr mühsame Aufgabe für den Impftierarzt bedeutet und auch sehr sorgfältig vorgenommen werden muß, damit eine halbwegs gleichmäßige Verteilung des Impfstoffes stattfindet. Dieser Mangel wird allseits trotz sonstiger Würdigung des Lyoner Verfahrens besonders dann lebhaft empfunden, wenn eine größere Anzahl von Rindern auf voneinander entfernt gelegenen Sammelplätzen zur Impfung gelangt. In solchen Fällen soll trotzdem immer nur der Impfstoff für je 10 Rinder in einem bereitet werden (die Bereitung dauert eben so lange wie die Impfung selbst), und es wird diese Vorschrift nach unseren Erfahrungen im allgemeinen auch peinlich eingehalten. Der Vorteil eines flüssigen Impfstoffes liegt auf der Hand. Doch sind unseres Wissens bisher, abgesehen von dem seinem Wesen nach hierhergehörigen flüssigen Vaccin des Jenner-Pasteur-Institutes in Budapest (s. d.), keine flüssigen Vaccins, d. i. bereits im Laboratorium fertiggestellte Emulsionen von Rauschbrandtrockensaft oder Rauschbrandfleisch, zur Schutzimpfung verwendet worden.

B. Die Kulturimpfverfahren.

Bei Verwendung von Rauschbrandmaterial zur Bereitung des Vaccins wird entweder so vorgegangen, daß das Fleisch bzw. der Fleischsaft von an natürlichem Rauschbrand gefallenen Rindern zu Impfstoff verarbeitet wird, oder es werden zu dem gleichen Zwecke Rinder mit einem passenden Ausgangsmateriale künstlich infiziert. In beiden Fällen liegt die Möglichkeit vor, daß accidentelle Keime (Bakterien von Wundkrankheiten, Eiterkokken u. a.), die im Tiere neben dem spezifischen Erreger zur Entwicklung kommen, in den Impfstoff gelangen. Die meisten Autoren sind der Meinung, daß die Impfunfälle oder wenigstens ein Teil derselben der Wirkung derartiger Begleitbakterien zuzuschreiben sind. Jedenfalls hat der Wunsch, solchen Zufällen aus dem Wege zu gehen, dazu beigetragen, daß nach gelungener Züchtung des Rauschbrandbazillus von verschiedenen Seiten Kulturen als Impfmaterialien empfohlen und auch angewendet wurden. In der Praxis haben die Kulturimpfungen aber bei weitem nicht jene Bedeutung erlangt, wie das „Lyoner Verfahren“ u. a. damit zusammenhängende Methoden. Es sei die Kritik dieser Bemühungen an anderer Stelle erledigt und hier nur darauf hingewiesen, daß mit wechselndem Erfolge vor allem Bouillonkulturen des Rauschbrandbazillus, die in der Regel reichlich Sporen enthielten, zur Anwendung kamen. Nur in vereinzelten Fällen wurden die Kulturen ohne weitere Präparation verwendet, in der Regel wurde auch hier eine mehr oder weniger weitgehende Erhitzung (kurze Zeit auf 90—100° C, 2 Stunden auf 70° C) vorangeschickt.

Die Dosis beträgt 2—3 ccm, die Impfung erfolgt einmal, und zwar an der Schulter. Solche Versuche wurden von Kitt und Leclainche-

Vallée ausgeführt. Kittscher Kulturimpfstoff gelangte vielfach auch in den österreichischen Alpenländern, so in Steiermark, zur Anwendung. Es sei noch darauf hingewiesen, daß auch Kulturen des Rauschbrandbazillus in Blut zur Schutzimpfung empfohlen wurden. In neuerer Zeit verwendet das Jenner-Pasteur-Institut in Budapest nach Angaben von Dr. Ladislaus Detre einen Fleischkulturimpfstoff, der auf folgende Weise hergestellt wird.

Fein gehacktes Kalbfleisch wird mit mäßigen Mengen Bouillon in einem 2 Liter fassenden Kolben übergossen und mit Olivenöl überschichtet. Hierauf wird an drei aufeinanderfolgenden Tagen durch je drei Stunden auf 60 ° C erwärmt und hierdurch der Inhalt fraktioniert sterilisiert. In diesen Nährboden erfolgt nun die Einimpfung des „Saatgutes", im wesentlichen einer auf 65 ° C erwärmten Emulsion eines aus Fleischkultur gewonnenen sporenhaltigen Pulvers. (Rauschbrandiger Meerschweinchenmuskel wird zwei Tage im Thermostaten gehalten, bei 50 ° C getrocknet, dann gepulvert. Virulenzprüfung. Hierauf wird eine dichte Emulsion bereitet und diese auf 65 ° C erhitzt.) Das beimpfte Fleisch wird im Thermostaten bei 37 ° C bis zur Beendigung der Zersetzung gehalten, dann wird das von Öl befreite Material bei 50 ° C durch 3 - 4 Tage getrocknet. Die gründlich eingetrocknete Masse wird nun erst durch 48 Stunden mit Petroläther entfettet und in einer Kaffeemühle pulverisiert. Aus 1 kg Fleisch werden etwa 300 g solchen „Urstoffes" gewonnen, der dann weiter — hier weicht die Technik in wesentlichen Punkten von der sonst üblichen nicht ab — zur Bereitung der Vaccins I und II dient, die sowohl als Pulver, wie auch als Glyzerinemulsion, zur Impfung verwendet werden. Das beschriebene Verfahren hält demnach die Mitte zwischen der Herstellung des originären Lyoner Impfstoffes und den Kulturmethoden der übrigen Autoren; jedenfalls liegen hier ganz ähnliche Verhältnisse vor, wie wir sie seinerzeit für die „originären" Kulturen des Rauschbrandbazillus beschrieben haben (s. d. und w. u.). Mit diesem Impfstoffe wurde in Ungarn in den letzten Jahren eine größere Anzahl von Rindern geimpft.

C. Die kombinierte Rauschbrandschutzimpfung mit Vaccin und Serum.

Die nicht selten beobachteten Unfälle im Anschlusse an die Impfung mit rauschbrandigem Materiale und mit Kulturen legten den Gedanken nahe, die Impfung dadurch zu einer ungefährlichen zu machen, daß vor der Applikation des Impfstoffes eine präventive Injektion eines „Rauschbrandserums" vorgenommen wird. Hiebei wurde diese Simultanimpfung in der mannigfachsten Weise variiert, derart, daß die Seruminjektionen mit Kulturimpfungen oder mit ein- oder zweimaliger Impfung mit Rauschbrandsaft, im Gemische oder das Serum knapp vorher injiziert, kombiniert wurden. Im wesentlichen handelt es sich aber bisher bei all diesen Versuchen nur um mehr oder weniger weit ausgedehnte Laboratoriums experimente (Arloing, Leclainche-Vallée), wenigstens ist uns von einer Einbürgerung dieser Verfahren in die Impfpraxis nichts bekannt geworden.

Das Serum, das zur Impfung Anwendung fand, wird durch intravenöse, später subkutane Injektionen von Fleischsaft von Rindern, Pferden, Schafen und Ziegen gewonnen. Auch Meerschweinchen lieferten, vorsichtig immunisiert, ein derartiges Immunserum, ebenso Kaninchen.

Für sich allein im Experimente erprobt, zeigte das auf verschiedene Weise hergestellte Serum gegenüber einer nachmaligen Infektion der Versuchstiere mit virulentem Materiale eine mäßige Schutzkraft, so daß für Meerschweinchen 1—5 ccm (Leclainche-Vallée), für Rinder 15—50 ccm imstande waren, die Tiere vor der tödlichen Infektion zu bewahren. Nach Kitt wird für die Gewinnung eines solchen Serums so vorgegangen, daß man in Intervallen von 3—8 Tagen Pferden oder Rindern kleine Portionen Rauschbrandsaftes (5—20 ccm) intravenös injiziert. Nach 5—10 Injektionen (wobei im ganzen 50—100 ccm Fleischsaft einverleibt würden) ist der Schutzwert des Serums derart hoch gestiegen, daß das Serum in Dosen von 50, 20, 10 bez. 5 ccm Schafe vor einer sonst tödlichen Infektion mit Fleischsaftvirus zu schützen vermag. Die Behandlung der Serumlieferanten hat vorsichtig zu erfolgen, da die Tiere sonst leicht trotz scheinbar bereits erworbener Grundimmunität anläßlich einer neuerlich vorgenommenen Injektion an Impfrauschbrand eingehen können. (Derartige Zufälle können übrigens bei jeglicher Art von Immunisierung sich ereignen, ohne daß hier etwa eine echte Überempfindlichkeit — im Sinne der bei der Vorbehandlung von Tetanuspferden gewonnenen Erfahrungen — vorliegen würde.) Kitt hat auch, von dem Gedanken ausgehend, daß die einzelnen Rauschbrandstämme Unterschiede aufweisen und daher eine durch die Präparation mit einem Stamme erworbene Immunität nicht auch gegenüber anderen Stämmen sich wirksam erweisen müsse (Polyvalenz des Rauschbrandbazillus), durch Vorbehandlung von Rindern mit verschiedenen Rauschbrandstämmen (auch mit Stämmen von Gasphlegmonebazillen und Bazillen des malignen Ödems) ein „polyvalentes" Serum gewonnen und weiter empfohlen, im Anschlusse an die Seruminjektion ein Gemisch von Rauschbrandpulver verschiedener Provenienz zur Nachbehandlung der zu impfenden Rinder zu verwenden. Erfahrungen über diese Modifikation der Impfung liegen anscheinend noch nicht vor.

Nach allen Angaben der Literatur ist die Nachimpfung des Vaccins oder der Kulturen spätestens 8 Tage nach der Serumvorimpfung vorzunehmen. Länger hält die Schutzkraft des Serums nicht an.

Erfolge und Kritik der bisher geübten Schutzimpfungsverfahren.

Die Brauchbarkeit einer Schutzimpfungsmethode hängt in erster Linie von dem Schutzwerte des Verfahrens, gemessen an dem Verlustprozent und verglichen mit der Statistik der Seuche im allgemeinen ab. Daneben aber hat ein Verfahren, wenn es Anspruch auf allgemeine Anwendbarkeit erhebt, auch unschädlich zu sein, d. h. die nach der Impfung eintretende Reaktion soll möglichst wenig auffällig sein und ernstere Störungen im Anschluß an die Impfung sollen sich nicht ereignen. Mit dieser Frage im engsten Zusammenhange steht die im Rahmen einer Viehversicherung zu leistende Entschädigung für Impfunfälle, die vor allem dann grundsätzlich zu fordern ist, wenn ein Verfahren trotz Fehlens völliger Unschädlichkeit in Ermangelung einer besseren Methode geübt und von maßgebender Stelle empfohlen wird. Kompromisse mögen in solchen Fällen unvermeidlich sein, doch darf der Viehbesitzer nicht den Preis bezahlen. Die Rauschbrandschutzimpfungen mit ihren mannigfachen Gefahren sind ein lehrreiches Kapitel in der Geschichte des Viehver-

sicherungswesens, doch kann es nicht Aufgabe der vorliegenden Abhandlung sein, die Vorteile und Nachteile der einzelnen Einrichtungen auseinanderzusetzen. Uns beschäftigen hier nur die sachlichen Fragen der Schutzimpfung.

Alle bisher angewendeten Verfahren der Rauschbrandschutzimpfung leiden an dem Übelstande, daß stärkere Reaktionen, ja selbst Todesfälle im Anschlusse an die Impfung nicht zu den Seltenheiten gehören. Ja unter besonderen, im einzelnen Falle keineswegs stets erklärlichen Verhältnissen häuften sich gelegentlich die Impfunfälle derart, daß die Impfung eingestellt werden mußte. Wir haben solche Fälle bei Verwendung von Lyoner (Berner) Impfstoff und von Kulturimpfstoff gesehen. In der Regel handelte es sich hierbei um die Einimpfung des Vaccins an der Schulter, doch auch bei der Schweifimpfung sind mitunter 8 und 9 % aller Impflinge an Impfrauschbrand verendet!

Man ist geneigt, als die Ursache solcher Katastrophen die nicht ausreichende Abschwächung des Impfstoffes (trotz peinlich eingehaltener Vorschrift bei der Herstellung der Vaccins!) anzusehen und trifft damit im allgemeinen gewiß das Richtige. Doch wird das Rätselhafte solcher Befunde hierdurch nicht ausreichend aufgeklärt, indem man sieht, daß der gleiche Impfstoff, der bei einer größeren Anzahl von Rindern schadlos angewendet wird, in anderen Fällen die Herden dezimiert. Hier gilt die wechselnde Empfänglichkeit der Rinder, je nach ihrer Rasse, ihrem Ernährungszustand (abgetriebenes Vieh — bei großer Entfernung des Impfsammelplatzes — soll leichter an Impfrauschbrand erkranken) als Ursache des verschiedenen Verhaltens. Doch reicht diese Erklärung zwar für die sporadischen, regelmäßig in jedem Impfjahre wiederkehrenden, vereinzelten Impfunfälle, nicht aber für die öfters im Anschlusse an die Impfung gesehenen gehäuften Unfälle aus. Es wurde schon erwähnt, daß die Bereitung der Impfemulsion eine heikle Aufgabe für den Impftierarzt ist. Für die Fälle der Verwendung eines pulverförmigen Vaccins scheint es nun nicht ausgeschlossen, daß ungenügend zerkleinerte Partikelchen gelegentlich zum Ausgangpunkt für die fortschreitende Entwicklung des rauschbrandigen Prozesses werden; so würde in diesen Fällen das schlechte Verreiben des Impfstoffes die Schuld an dem Mißerfolg tragen — allerdings für den Impftierarzt eine wenig beneidenswerte Situation, wenn sich andererseits die Annahme Kitts bewahrheitet, daß ein zu feines Verreiben des Impfstoffes den Schutzwert des Verfahrens herabmindert!

Nicht nur tödliche Unfälle wurden im Gefolge der Rauschbrandschutzimpfungen gesehen. Auch örtliche Schwellungen, Abscedierungen, Nekrosen, die in der Regel auf Komplikationen zurückgeführt wurden, hat man an der Impfstelle beobachtet, bei der Schweifimpfung nicht allzu selten ein Brandigwerden und Abfallen des Schweifes. Aus einer zufälligen Häufung solcher Fälle erklärt sich die in manchen Gegenden anzutreffende Abneigung der Bevölkerung gegen die im ganzen gewiß unbedenklichere Schweifimpfung, und die Bevorzugung der Schulterimpfungsmethode. Nicht immer müssen jedoch nach unserer Auffassung solche weiter um sich greifende örtliche Prozesse auf Mischinfektion beruhen. Sie sind mitunter lokalisierte, rauschbrandige Prozesse und erst sekundär kommt es dann in den Tumoren zur Eiterung und Nekrose, wie wir selbst an vier oder fünf Fällen bei der experimentellen Infektion von Rindern erfahren konnten. Auch bei der experimentellen Meer-

schweincheninfektion im Laboratorium nimmt man nicht selten, namentlich bei irgendwie, z. B. durch Injektion von Normalserum gefestigten Tieren, eine Lokalisierung des rauschbrandigen Prozesses wahr. (Schneidet man in solche Tumoren ein, so sieht man die charakteristische Verfärbung der Subcutis und des Muskelgewebes, und mikrokopisch erkennt man bei passender Auswahl des Infektionsstoffes Rauschbrandbazillen in Reinkultur.) Für die richtige Beurteilung der Beziehungen zwischen tödlichen Impfunfällen und lokalen Impfschäden sind derartige Beobachtungen von Wichtigkeit. Sie lehren jedenfalls, daß bei der Bereitung des Vaccins die Auswahl von Reinmaterial allein noch nicht alle Kautelen erschöpft.

Die widersprechenden Erfahrungen, in dem einen Falle völlige Unschädlichkeit, in einem zweiten Falle zahlreiche Unfälle bei anscheinend gleicher Herstellung des Materials, gleich sorgfältigem Verreiben des Impfstoffes usw. geben eigentlich schon eine Antwort auf die Frage, ob die leichteren und schwereren Impfschäden vermeidbar sind. Wenn so unberechenbare Zufälligkeiten für den Ausgang der Impfung in Betracht zu ziehen sind, wird im einzelnen Fall bei keinem der üblichen Verfahren ein günstiger Erfolg vorhergesagt werden können. Aus diesem Grunde wird auch die z. B. in den österreichischen Alpenländern festgehaltene Gepflogenheit, immer erst eine Vorimpfung an 10—20 Stück vor den Hauptimpfterminen einzuschieben, noch weniger der günstige Ausfall eines Laboratoriumsversuchs an 3 oder 5 Rindern eine Gewähr dafür bieten, daß nachträglich keine Impfunfälle sich ereignen.

Die Möglichkeit, daß der Schutzimpfung unter bestimmten, unberechenbaren Einflüssen der Impfrauschbrand auf dem Fuße folgt, ist um so eher jederzeit zu gewärtigen, als solche Zufälle, wie aus dem näheren Studium der Immunisierungsvorgänge sich ergibt, eigentlich im Wesen der vorliegenden Impfung begründet sind. Es scheint nämlich aus der Betrachtung der Prozesse, wie sie sich im Körper der Impflinge nach Einverleibung des Impfstoffes abspielen, hervorzugehen, daß es nicht so sehr darauf ankommt, etwa im Impfstoff präformierte Substanzen (ähnlich wie bei anderen Immunisierungsverfahren) in den Körper einzuführen, sondern daß es zu einer — allerdings in der Regel örtlich beschränkten — Entwicklung der Keime im Impfling kommen muß, damit der Immunisierungseffekt zustande kommt. Die lebenden Erreger im Impfstoff sind offenbar nicht eine unerwünschte Beimengung, sondern das Wesentliche an der Sache.

Auch die meisten Autoren (so Leclainche und Vallée mit ihrer Phagocytentheorie u. a.) sprechen von der Notwendigkeit einer Entwicklung der Sporen im Körper und halten in diesem Sinne die Schweifimpfung wegen des größeren Widerstandes, den das straffe Unterhautbindegewebe des Schweifes dem Fortschreiten des Prozesses setzt, für ungefährlicher als die Schulterimpfung. Bei der Thomasschen Schweiffadenimpfung läßt sich die Entwicklung der Erreger anscheinend regelmäßig verfolgen. Ist nun die Proliferation der Rauschbrandbazillen im Gewebe zum Zustandekommen der Immunität notwendig, so läßt es sich wohl niemals bemessen (oder durch irgendwelche Mittel beeinflussen), unter welchen Bedingungen die Entwicklung sich eben innerhalb der richtigen Grenzen hält — nicht überwuchert, und so zum Impfrauschbrand führt, andererseits nicht allzu sehr beschränkt bleibt; auch nicht etwa durch eine richtig ausgeführte „Abschwächung“ des Impfstoffes. Eine

Abschwächung lebender Infektionserreger durch Erhitzen des fertigen Impfstoffes dürfte in dem Sinne, daß hierdurch eine weniger offensive Generation von Bakterien geschaffen würde, kaum bewirkt werden können. Jedenfalls liegt unserem Verständnisse die Erklärung näher, daß bei der sogenannten Abschwächung durch Erhitzen, die in der Tat die Virulenz des Impfmateriales herabsetzt, zunächst eine quantitative Auslese geschaffen wird, in dem Sinne, daß neben den vegetativen Formen auch eine Anzahl weniger widerstandsfähiger Sporen abgetötet wird; vielleicht kann außerdem — und hierfür sprechen Erfahrungen in Laboratoriums-Desinfektionsversuchen — eine solche Veränderung im Sporenplasma (in bezug auf Imbibitionsfähigkeit u. a.) angenommen werden, daß die Sporen dann im Gewebe verlangsamt auskeimen, wodurch die Abwehrvorrichtungen des Körpers leichter mobilisiert werden und wirksamer zur Geltung kommen können.

Hält man an den eben geäußerten Anschauungen fest, so wird man auch von der sogenannten kombinierten Rauschbrandschutzimpfung nicht allzuviel erwarten und auch die Kittschen Versuche der Erzeugung einer „plurivalenten" Immunität nicht allzuhoch einschätzen. Die kombinierte Impfung wird, ein spezifisch wirksames Serum vorausgesetzt, die Gefahr der Impfunfälle herabmindern; daß aber etwa die auch in diesem Falle notwendige*) Entwicklung der Rauschbrandbazillen vom nachträglich injizierten Vaccin aus gerade im erwünschten Umfange sich halte und in diesem Sinne vom Serum beeinflußt werde, erscheint nicht eben wahrscheinlich. Wird die Proliferation der Bakterien durch das Rauschbrandserum allzusehr gehemmt oder etwa ganz aufgehoben, so wird die Schutzwirkung eine minderwertige sein. Ähnlich liegen die Verhältnisse für die Verwendung der polyvalenten Impfstoffe. Hier muß es durchaus fraglich bleiben, ob die gleichzeitig oder in angemessenen Zwischenräumen einverleibten verschiedenen Rauschbrandstämme alle zur Entwicklung kommen und so zur Produktion von polyvalenten Antikörpern Veranlassung geben werden. Dies gilt sowohl für die Behandlung der Serumlieferanten wie für jene der Impflinge. Polyvalente Impfungen hätten nur dann Aussicht auf Erfolg, wenn die Sera bei verschiedenen Tieren erzeugt würden, oder wenn im Gemisch der Vaccins die präformierten Stoffe das wirksame wären, was aber im vorliegenden Falle anscheinend nicht zutrifft.

Die Schwierigkeit der einwandfreien Feststellung, ob ein Schutzimpfungsverfahren in der Praxis einen angemessenen Schutzwert aufweist, kommt für den Rauschbrand ganz besonders in Betracht, da hier die amtstierärztlichen Erhebungen mit Rücksicht auf die bevorzugte

---

*) Eine stärkere Erhitzung, als den üblichen Abschwächungstemperaturen entspricht, macht den Impfstoff unwirksam. Man könnte nun der Meinung sein, daß die Schädigung der Wirkung dadurch zustande kommt, daß nicht nur die Sporen des Rauschbrandbazillus vernichtet, sondern auch die Antigene des Impfstoffes zersetzt werden. Auch die übliche Art der Abschwächung des Impfstoffes könnte zu einer Schädigung der antigenen Stoffe führen. Versuche, dies direkt zu entscheiden, lassen sich nicht ausführen, da bei Temperaturen von 60—65° C, wie man sie sonst bei Immunisierungsversuchen zur Präparation des Vaccins anwendet, die Sporen im Vaccin in keiner Weise beeinträchtigt werden und somit eine Infektion des Tieres die unvermeidliche Folge wäre. Es wäre demnach möglich, daß auch die Einführung unversehrter Antigene ohne die lebenden Erreger zum Ziele führt, doch liegen hierüber keine Erfahrungen vor. Für die praktische Schutzimpfung ist die Entscheidung dieser Frage ziemlich irrelevant, da man bisher stets sporenhaltige Impfstoffe anwendete, die, um nicht allzu gefährlich zu sein, auf Temperaturen von 90—100° C erhitzt werden müssen.

Lokalisation des Rauschbrands auf schwer zugänglichen Hochalpen unter besonders ungünstigen Verhältnissen gepflogen werden müssen und bei der Notwendigkeit der Anzeige der Hirten und Viehbesitzer Glauben zu schenken, auf Verläßlichkeit und Vollständigkeit kaum einen Anspruch machen können. Nur für den Fall der Gewährung einer Entschädigung für das auf der Alpe gefallene Stück wird eine genauere Handhabung der „Anzeigepflicht" zu erwarten sein. Noch schwieriger wird die Aufgabe, wenn nicht nur der Prozentsatz der an natürlichem Rauschbrand verendeten Impflinge festgestellt werden soll, sondern auch die Todesfälle unter den nicht geimpften Weidegenossen zum Vergleiche herangezogen werden. Letzteres ist wohl, um ein klares Bild des Seuchenganges und des Schutzwertes eines Impfverfahrens zu schaffen, sehr erwünscht, wenn nicht unerläßlich, da die Rauschbrandfälle nach Örtlichkeit und zeitlichen Perioden in ihrer Häufigkeit ganz außerordentlich schwanken. Auch auf berüchtigten Rauschbrandalpen zählt man gelegentlich „schwache Jahre" und andererseits taucht gelegentlich, wenn auch seltener, auf Territorien, die bisher verschont geblieben waren, der Rauschbrand auf. Gerade der Vergleich mit den ungeimpften Weidegenossen macht nun in der Statistik im Großen Schwierigkeiten, und findet unseres Erachtens und nach unseren Erfahrungen auch kaum irgendwo die richtige Würdigung und Anwendung. Zulässig ist wohl einzig und allein der Vergleich gleichaltriger Tiere der gleichen Rasse, die gleichzeitig und gleich lang auf den gleichen Alpen sommern. Die Schwierigkeiten der Auswahl eines vollkommen einwandfreien Kontrollmateriales erkennt man schon, wenn man unter möglichst peinlichen Kautelen einen Versuch in der Praxis anstellt. Bei der Durchführung der Schutzimpfung im großen kann aus begreiflichen Gründen — da ja den Wünschen der Viehbesitzer entsprochen werden muß — eine Auswahl überhaupt nicht getroffen werden. Damit entfällt aber dann auch jede Möglichkeit, gleiches mit gleichem zu vergleichen. Nach unseren Erfahrungen können auch noch andere in der Impfstatistik gleichfalls nicht zum Ausdrucke kommende Momente einen günstigeren Effekt der Schutzimpfung vortäuschen, als er eigentlich bei gut vergleichbaren Verhältnissen anzunehmen wäre. So sahen wir nicht selten, daß Anhänger der Lyoner Impfung auch nicht gefährdetes Vieh zur Impfung bringen, besonders, wenn es sich um wertvolle Rinder handelt, andererseits wird öfters kostbares, auf gefährlichen Alpen sommerndes Vieh, nach relativ kurzer Weidezeit trotz vorgenommener Impfung zu Tal, oder auf andere Alpen getrieben! In beiden Fällen wird die Chance, daß die Impfung hält, eine erhöhte sein müssen.

Prüft man nun die Ergebnisse der Rauschbrandschutzimpfungen, so erkennt man zunächst eines mit aller Sicherheit, daß ein absoluter Schutz gegen die natürliche Rauschbrandinfektion durch keines der Verfahren bewirkt wird. Als einer der Ursachen, die im einzelnen Falle den Impfschutz nicht ausreichend gestalten, wurde in der jüngsten Zeit von vielen Forschern der bereits kurz erwähnten Polyvalenz der Rauschbrandbazillenstämme eine größere Beachtung geschenkt. Wir konnten uns durch eigene Versuche von einer solchen ziemlich weitgehenden Verschiedenheit der einzelnen Stämme überzeugen, wenngleich so große Differenzen, wie etwa bei der Gruppe der Streptokokken hier, gewiß nicht vorliegen*).

---

*) Die Bedeutung der Polyvalenz für einen ungünstigen Erfolg der Schutzimpfung ließe sich leicht feststellen, wenn man im Laboratorium Tiere mit den zur

Die Verlustprozente bei den Impfungen zeigen nach den verschiedenen Statistiken recht beträchtliche Schwankungen. Sie betragen im Durchschnitt etwa 0,4—0,5 %, erreichen gelegentlich die Höhe von 1 %, weisen allerdings andererseits auch öfters Werte unter 0,1 % auf. Die Fälle von natürlichem Rauschbrand unter den ungeimpften Weidegenossen werden in der Regel mit 5—10 % angegeben, in den einzelnen statistischen Zusammenstellungen sind aber häufig viel niedrigere Verlustziffern bei den ungeimpften Tieren verzeichnet (1—2 % und darunter!), auch wenn diese auf notorischen Rauschbrandalpen weiden, daher nicht etwa durchwegs weniger gefährdet sind.

Wir bringen im Nachstehenden einige statistische Daten über die Erfolge der Impfungen mit rauschbrandigem Materiale (nach dem Typus des Lyoner Verfahrens).

I. Resultate der Schutzimpfung im Kanton Bern im Jahre 1905. Berner Impfstoff (ähnlich wie der Lyoner Stoff präpariert). Nach freundlichen Mitteilungen von Professor Guillebeau in Bern.

a) Zweimalige Schutzimpfung (Vaccin I und II).

Geimpft	18 340 Rinder	
Impf-Todesfälle	6 Rinder	= 0,3 ‰
Weide-Rauschbrandfälle	63 „	= 3,4 ‰

b) Schutzimpfung mit Vaccin II allein.

Geimpft	11 014 Rinder	
Impf-Todesfälle	9 Rinder	= 0,8 ‰
Weide-Rauschbrandfälle	41 „	= 3,7 ‰

Zu dieser Statistik sei bemerkt, daß die Viehbesitzer im Kanton Bern für die Rauschbrandfälle unter den geimpften Tieren entschädigt werden.

II. Österreichische Statistik (s. Tabelle pag. 905). In dieser Zusammenstellung fällt auf, daß in allen Kronländern, mit Ausnahme von Oberösterreich, der Vergleich zwischen geimpften und ungeimpften Rindern zugunsten der Impfwirkung spricht. In Oberösterreich hingegen sind die Verlustprozente (1,3 %) in beiden Fällen gleich hoch.

III. Nordamerikanische Statistik nach den von V. A. Nörgaard verfaßten Berichten. Fleischpulver 6 Stunden bei 93—94° erhitzt.

1901	1 517 560 Rinder geimpft	1 % Verlust.
1898	127 369 „ „	0,54 % „

IV. Strebelsche Statistik über die in verschiedenen Ländern von 1884—1894 mit Lyoner Impfstoff ausgeführten 2maligen Schweifimpfungen. (Zitiert nach Kitt.) 1884—1894 325 892 Rinder geimpft, 185 Fälle von Impfrauschbrand = 0,56 ‰; 1245 Fälle von Weiderauschbrand = 0,38 %. 129 705 geimpfte Tiere sommerten zusammen mit 234 560 ungeimpften Rindern. Von ersteren gingen 550 Stück an Rauschbrand zugrunde, von den ungeimpften 4136 Stück (0,42 : 1,76 % Verluste). Das Verlustprozent war demnach 4½ mal kleiner bei den Geimpften.

Noch weniger Anhaltspunkte für die Beurteilung des Schutzwertes liefert die Statistik der Kulturimpfungen, die überdies bisher bei weitem nicht in dem Umfange des Lyoner Verfahrens geübt wurden.

Schutzimpfung verwendeten Vaccins vorbehandelt und hierauf mit dem aus dem gefallenen Impfling gezüchteten Stamm infiziert.

II. Österreichische Statistik. Nachweisung über das Ergebnis der im Jahre 1905 in den im Reichsrate vertretenen Königreichen und Ländern durchgeführten Rauschbrandschutzimpfungen.

Land	Anzahl der politischen Bezirke	Anzahl der Gemeinden	Anzahl der Impfstationen	Impfmethode	Anzahl d. geimpften Rinder	Hiervon sind an Rauschbrand erkrankt bezw. eingegangen: an Impfrauschbrand		an natürlichem Rauschbrand während der Weidezeit		Zusammen		Anzahl der mit den geimpften Rindern gemeinsam untergebrachten nicht geimpften Rinder	Von den nicht geimpften Rindern sind an Rauschbrand eingegangen		Anmerkung
						Stück	%	Stück	%	Stück	%		Stück	%	
Nieder-Österreich	1	—	—	Lyoner	285	—	—	—	—	—	—	425	26	6,11	
Ober-Österreich	2	17	?	Lyoner	1076	—	—	14	1,3	14	1,3	1255	16	1,3	
Salzburg	3	22	35	Lyoner	888	—	—	—	—	—	—	2764	15*	0,54	* nicht amtl. konstatiert.
Steiermark	6	—	—	Lyoner	5063	—	—	7 †	0,14	7	0,14	8262	75	0,9	† nur in zwei Fällen amtl. konstatiert.
Kärnten	7	83	234	Lyoner	4695	—	—	5	0,10	5	0,10	6819	30	0,44	
Tirol-Vorarlberg	12	106	?	Lyoner	10 480	—	—	20	0,19	20	0,19	21 389	301	1,4	

Wir folgen hier im wesentlichen den Angaben Kitts, der die Schutzwirkung der Kulturimpfungen ziemlich hoch einschätzt. Nachdem zuerst Kitasato in Laboratoriumsversuchen Meerschweinchen gegen Rauschbrand immunisierte und auch Roux ähnliche Resultate an Meerschweinchen durch Vorbehandlung mit sterilisierten Kulturen (100—120 ccm) zu erzielen vermochte, wurde von Kitt 1894 zum ersten Male die Möglichkeit einer Schutzimpfung von Rindern und Schafen dargetan. Zunächst handelte es sich auch hier um Laboratoriumsexperimente, deren Resultate durch Kontrollversuche gestützt wurden. Es sei darauf aufmerksam gemacht, daß nach den Erfahrungen aller Autoren, auch nach unsern eigenen, die Prüfung eines Schutzimpfungsverfahrens gegen Rauschbrand in kleinen Reihen von Laboratoriumsversuchen sich recht schwierig gestaltet, da die natürliche Empfänglichkeit der Jungrinder für die Rauschbrandinfektion innerhalb weiter Grenzen schwankt. So kann es sich ereignen, wie wir selbst zu wiederholten Malen erfuhren, daß auch bei relativ hoher Infektionsdosis eines notorisch virulenten Impfmateriales die Kontrolltiere am Leben bleiben und anderseits kann der scheinbar durch spezifische Vorbehandlung erlangte Schutz in Wirklichkeit einer hohen natürlichen Resistenz zuzuschreiben sein. Laboratoriumsexperimente an Rindern mit gelungener Immunisierung gegen Rauschbrand sind, wenn nicht sehr große Reihen vorliegen, immer nur mit Vorsicht zu deuten. Mit Kittschen Kulturen wurden in Bayern 4501 Rinder geimpft, wobei der Schutzwert ein günstiger gewesen sein soll. Auch Suchanka berichtet über solche Impfungen im Salzburgischen, die ein gutes Ergebnis aufwiesen. Minder günstig waren die Erfolge in Steiermark, ohne daß aber ein abschließendes Urteil über die Schutzkraft dieses Verfahrens gewonnen werden konnte, indem die Methode wegen Häufung von Impfunfällen im Anschlusse an solche Kulturimpfungen nicht weiter geübt wurde.

Leclainche und Vallée berichten gleichfalls über günstige Erfahrungen mit ihrem zwei Stunden auf 70° C erwärmten Kulturimpfstoff.

Wir haben schon weiter oben, anläßlich der Besprechung der Gefährlichkeit der einzelnen Rauschbrandschutzimpfungsverfahren, hervorgehoben, daß der Immunisierungseffekt anscheinend dadurch zustande kommt, daß im Körper des Impflings eine örtlich begrenzte Entwicklung der Rauschbrandbazillen eintritt. Durch das Überstehen solcher leichten Formen von Impfrauschbrand (die in der Regel ganz symptomlos verlaufen) wird unter Umständen eine Immunität gegen eine schwere natürliche Attacke von Weiderauschbrand geschaffen.

Wir betonten auch bereits, daß, falls die örtliche Entwicklung der Rauschbrandbazillen ausbleibt, eine Immunisierung um so weniger zu gewärtigen sei, als vermutlich die präformierten Stoffe der einzelne Vaccins nicht die wirksamen Antigene vorstellen. Bei den Impfungen mit K u l t u r e n tauchen nun noch weitere Schwierigkeiten auf, die wir auch schon an anderer Stelle gewürdigt haben. Daß sich die einzelnen Kulturimpfstoffe in bezug auf den Schutzwert nicht gleichmäßig verhalten, wird bereits von Kitt angegeben, von diesem Autor jedoch auf den Einfluß der Zahl der Umzüchtungen und auf das Alter der Kultur bezogen. Es handelt sich aber hierbei offenbar um ganz andere Dinge, auf die wir zuerst in unserer Abhandlung über „antitoxische und antiinfektiöse Immunität“ aufmerksam gemacht haben. Die einzelnen, von einem und demselben Ausgangsmateriale gewonnenen Kulturen sind biologisch außerordentlich different, wie aus ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen

Antikörpern (Antitoxine, Agglutinine) hervorgeht. Wir sprechen daher von originären, von toxischen und von denaturierten Kulturen (s. d. oben cit. Abhandlung und einige Bemerkungen w. u.). Nur die originären Kulturen kommen der im Tierkörper gewachsenen Generation in den wesentlichsten Eigenschaften (Antigenen) so nahe, daß eine Vorbehandlung mit ihnen Aussicht auf die Erlangung einer Immunität gegen die natürliche Infektion (und experimentelle Infektion mit Rauschbrandmateriale) bietet. Im einzelnen Falle ist nun die Richtung, in der sich der Züchtungseinfluß bewegt, nur schwer abzusehen und nur dann einigermaßen sicher zu fixieren, wenn man ganz bestimmte Kulturbedingungen wählt. In dieser Beziehung bietet der Impfstoff des Pasteur-Jenner-Instituts in Budapest (Detre), dessen Darstellung wir schon besprochen haben, entschieden die meisten Garantien, da der Zusatz von Muskelsubstanz zum Nährboden, wie sich aus unseren systematischen Versuchen ergibt, noch am sichersten zu „originären" Kulturen führt. Die Tragweite dieser feststehenden Tatsache, daß die einzelnen Kulturverfahren zu so ganz verschiedenwertigen Kulturzuständen führen, reicht offenbar über den vorliegenden speziellen Fall hinaus; doch sei hier nur die eine Nutzanwendung gezogen, daß es ganz besonderer Vorkehrungen und auch einer genauen Prüfung bedarf, um einen wirksamen Rauschbrandkulturimpfstoff herstellen zu können.

Eigene Schutzimpfungsversuche.

Unsere über eine längere Reihe von Jahren ausgedehnten Studien über die kulturellen und biologisch-chemischen Eigentümlichkeiten des Rauschbrandbazillus — Untersuchungen, die teils im Archiv für Hygiene (Bd. XLVIII) niedergelegt, teils in Monographien und Berichten an die Kais. Akademie der Wissenschaften in Wien zusammengefaßt sind — ließen begreiflicherweise den Wunsch rege werden, an Stelle der bisher gewiß dem Wesen wie der Technik nach unvollkommenen Schutzimpfungsverfahren ein neues zu setzen. Leider sind unsere Bemühungen trotz der für die Theorie wichtigen Errungenschaften auf diesem Gebiete bisher erfolglos geblieben, wenigstens in dem Sinne, daß ein Verfahren, das den praktischen Anforderungen in bezug auf leichte Herstellbarkeit und Haltbarkeit des Impfstoffes vollkommen entsprach, dabei auch absolut ungefährlich war und einen entsprechenden Schutzwert besaß, nicht aufgefunden werden konnte. Im Rahmen der vorliegenden Abhandlung kann nur ein kurzer Auszug aus unseren einschlägigen Versuchen wiedergegeben werden. Die eine der beiden in einem anderen Abschnitte dieses Handbuches publizierten Abhandlungen bringt die Mitteilung unserer Versuche über die gelungene Herstellung hochwirksamer Rauschbrandgiftlösungen (Dosis minima letal. für Meerschweinchen bis zu 0,0005 ccm Lösung), die bei der Behandlung verschiedener Versuchstiere sowohl zur aktiven Giftfestigung — derart, daß 1000 fach tötliche Giftmengen schadlos ertragen wurden — als auch zur Produktion von Antitoxin führten. Anfangs war uns die Immunisierung der Meerschweinchen gegen das Gift nicht gelungen. Hingegen konnte bei Jungrindern in großem Maßstabe gezeigt werden, daß schon wenige Injektionen von wirksamen Giftlösungen zu einem absoluten, verläßlichen Giftschutz führen, ohne daß hierbei die Tiere jemals eine Überempfindlichkeit gegenüber dem Gift erwerben. Auch der Schutzwert des Serums von derart vorbehandelten Jungrindern gegenüber gleichzeitig oder nachträglich injiziertem Gift

war ein hoher, und mühelos zu erreichen, wobei Titerwerte von 200-, 400- und 420fachen Seren gesehen wurden. Die Vorbehandlung der Rinder mit Giftlösungen war nur mit dem einen Nachteile verbunden, daß gelegentlich bei den Tieren anläßlich der ersten, öfters auch nach der zweiten Injektion starke örtliche Schwellungen auftraten, die — bei entsprechend gewählter Dosis — zwar nur selten von schweren Allgemeinerscheinungen begleitet waren, die Tiere aber doch stark in ihrem Wohlbefinden beeinträchtigten. Es war daher ein großer Fortschritt darin gelegen, daß es uns gelang, Jungrinder auch mit Gift-Serumgemischen (vollständig oder unvollständig neutralisiert oder überkompensiert) giftfest zu machen. Hierbei fehlten die örtlichen Reaktionen vollkommen, während die aktive Giftfestigung gleich hohe Werte erreichte wie früher. Insbesondere die Anwendung von Gift-Serumgemischen in Kombination mit Injektionen von Giftlösungen allein führte rasch und völlig ungefährlich zum Ziele.

Da die Veränderungen, welche die Giftlösung im Körper der Tiere bewirkte, ganz ähnliche waren wie jene, die bei der Rauschbrandinfektion zur Beobachtung kommen, lag insbesondere auch im Hinblick auf die bei anderen Infektionskrankheiten angewendeten Immunisierungsverfahren die Annahme nahe, daß die giftfest gemachten Tiere — die Vorbehandlung mit antitoxischem Serum führt gleichfalls zu einer mehr oder weniger lang anhaltenden Giftimmunität — auch der Rauschbrandinfektion gegenüber widerstandsfähig geworden sind. Wir trachteten zunächst diese Frage im Laboratoriumsversuche aufzuklären, kamen aber hier infolge der variablen natürlichen Empfänglichkeit der Jungrinder für Rauschbrand zu keinem eindeutigen Resultate.

In der Regel schien ein Schutz gegenüber der Infektion vorzuliegen, ein oder das andere Mal erlagen aber auch weitgehend giftgefestigte Tiere, die in ihrem Blute Antitoxin aufwiesen, der Infektion. Wir schritten daher zum Versuch in der Praxis, der auch für den Fall eines klareren Ausfalles unserer Laboratoriumsversuche nicht hätte entbehrt werden können. Nachdem in einem in kleinerem Maßstabe angestellten Versuche, in welchem Giftlösungen allein angewendet wurden, infolge unvorsichtiger Dosierung des Impfstoffes bei einer größeren Anzahl von Impfungen schwere Impfunfälle sich ereignet hatten (s. d. Monographie), ohne daß über den Schutzwert des Verfahrens gegen den natürlichen Rauschbrand eine genügende Aufklärung gewonnen werden konnte, unterzogen wir im Jahre 1904 über 4500 Rinder in den österreichischen Alpenländern und im Fürstentum Liechtenstein einer einmaligen Schulterimpfung mit neutralisierten Gift-Serumgemischen. Die Bereitung des Impfstoffes erfolgte in der Weise, daß hochwirksame gut filtrierte Giftlösungen auf Grund einer sorgfältigen Eichung mit antitoxischem Serum fast vollständig neutralisiert (als „Toxongemische“) und in Flaschen wohlverschlossen aufbewahrt wurden. Zur Zeit der Impftermine waren die Gemische durchgehends durch Lagern „glatt“ geworden, wie aus der Erprobung des Impfstoffes an Meerschweinchen sich ergab. Auch bei sämtlichen Impflingen verlief die Impfung — 5 bis 10 ccm pro Jungrind — ohne die geringste örtliche oder allgemeine Reaktion. Leider war der Erfolg auf der Weide nicht ähnlich günstig, indem unter den Geimpften 78 Stück an natürlichem Rauschbrand zugrunde gingen. Damit war der Beweis erbracht, daß ein erworbener, aller Voraussicht nach nicht unbeträchtlicher Giftschutz gegen den natürlichen Rauschbrand keine ausreichende Immunität gewährt. Alle frü-

heren im Laboratorium an Rindern gesehenen „Erfolge“ der präventiven Behandlung mit Giftlösungen waren hiermit auf das richtige Maß zurückgeführt und als zufällige Befunde gekennzeichnet worden, wollte man nicht zwischen der natürlichen und der experimentellen Rauschbrandinfektion prinzipielle Unterschiede supponieren. Der Plan, an Stelle der neutralisierten Gemische noch einmal reine Giftlösungen an einer größeren Zahl von Jungrindern im Schutzimpfungsversuche zu erproben, dem nach den vorliegenden Erfahrungen die Berechtigung nicht völlig abgesprochen werden konnte, wurde des weiteren nun gänzlich fallen gelassen, da inzwischen durch die gelungene Giftfestigung von Meerschweinchen (Verwendung von „Toxongemischen“) es ermöglicht wurde, im Laboratorium an einem großen, einwandfreien Materiale die Frage der Rauschbrandimmunität von neuem einem Studium zu unterziehen. Das Resultat war nun ein vollkommen eindeutiges und lag ganz im Sinne des großen Rauschbrand-Schutzimpfungsversuches. Auch die giftgefestigten Meerschweinchen waren nicht im geringsten gegenüber einer nachmaligen Rauschbrandinfektion gefeit. So waren etwaige Versuche, die Ergebnisse unserer Studien über die Giftlösungen und das antitoxische Serum für die Zwecke einer Rauschbrandschutzimpfung zu verwenden, trotz der sonstigen großen Vorzüge des Verfahrens, da solche Bestrebungen nun auch der theoretischen Grundlage entbehrten, als aussichtslos aufzugeben. In der Erkenntnis der Immunitätsvorgänge war allerdings neues wichtiges Tatsachenmaterial durch diese Mißerfolge gewonnen worden, indem zum ersten Male nachgewiesen wurde, daß das Wesentliche in der Pathogenese eines Prozesses, dessen Erreger ein toxinbildendes Bakterium ist, nicht in der Giftwirkung gelegen sein kann und demnach die Gewinnung und Verwendung eines antitoxischen Serums nicht in jedem Falle das Ziel der spezifischen Schutzimpfung vorstellt.

Es ist eine Grundregel der biologischen Forschung, daß aus einem einzelnen Befunde keine verallgemeinernden Schlüsse gezogen werden sollen. Andererseits muß aber jede Erfahrung dazu dienen, unsern Vorstellungskreis durch passende Analogien zu erweitern und zu ergänzen. Inwieweit der vorliegende Fall geeignet ist, die weit verbreitete — ja allgemeine Vorstellung von der Nützlichkeit antitoxischer Prophylaxe und Therapie — wir denken hier an den reinen Giftschutz, bzw. an den Schutz durch Antitoxin, nicht durch antitoxisches Serum — einzuschränken, vielleicht zu erschüttern, wird die Zukunft lehren. Doch kann kein Befund als so gesichert gelten, daß eine neuerliche kritische Prüfung seiner Grundlagen anläßlich neuer Tatsachen auf verwandten Gebieten versäumt werden dürfte. Es sei hier an die in der jüngsten Zeit von verschiedenen Seiten empfohlene Anwendung des bakteriziden bzw. des bivalenten Diphtherieserums zur Bekämpfung der Diphtherie erinnert und andererseits hervorgehoben, daß es nach unserer Auffassung ganz ungerechtfertigt erscheint, ein Serum, das Schutzwirkungen ausübt und bei Heilungsversuchen gewisse akute Krankheitssymptome in relativ kurzer Zeit beseitigt, kurzweg als antitoxisches zu bezeichnen, sei es nun, daß „toxinneutralisierende“ Wirkungen experimentell nachgewiesen sind, sei es daß solche direkte Einwirkungen im Experimente nicht erkannt werden können und man nur aus der klinischen Beobachtung die Schlüsse ableitet. Antitoxisches Serum und Antitoxin sind voneinander scharf zu trennen. Vielleicht enthält das antitoxische Rauschbrandserum wirklich nur Antitoxin und

sonst keinen wirksamen Antikörper, so daß es in diesem Falle leichter als sonst irgendwo möglich war, die Rolle des Antitoxins zu klären.

Wir haben nach der Verwerfung der antitoxischen Prophylaxe unsere Bemühungen, ein einfaches, ungefährliches Rauschbrand-Schutzimpfungsverfahren ausfindig zu machen, keineswegs eingestellt, wenngleich unsere Erwartungen nicht mehr sehr hoch gespannt waren. Die Aussichten hierfür waren um so weniger als günstige anzusehen, als an dem Grundsatze, nur sporenfreie Impfstoffe zu verwenden, auch fernerhin unbedingt festgehalten werden sollte. Durch den Umstand, daß der Rauschbrandbazillus Sporen bildet, die gegenüber höheren Temperaturen ziemlich widerstandsfähig sind, war die Verwertung von Methoden, wie sie bei anderen Infektionskrankheiten bereits in Anwendung gekommen waren, sehr erschwert (s. a. o.), um so mehr, als die Gewinnung asporogener Generationen, wie unsere eingehenden Versuche klargelegt haben, zwar nicht ausgeschlossen ist, aber in der Regel zur Denaturierung der Kultur und damit zum Verluste wichtiger Antigene führt. Wir versuchten daher zunächst die Wirkung eines in bestimmter Weise hergestellten Serums, das in Laboratoriumsversuchen beträchtliche antiinfektiöse Eigenschaften aufwies. Die Annahme, daß eine solche passive Immunisierung unter Umständen doch in der Lage sein könnte, für die Dauer der Weidezeit einen ausreichenden Impfschutz zu gewähren, ging vor allem von der bereits früher gekannten, für den Rauschbrand von uns besonders erhobenen Tatsache aus, daß arteigene Antikörper — unser Serum war von Jungrindern gewonnen — im Körper der damit behandelten Tiere durch längere Zeit zurückgehalten werden kann, und hierdurch, wenigstens in bezug auf den praktischen Effekt, Verhältnisse geschaffen werden, die der aktiven Immunität an die Seite zu stellen wären.

Das Serum stammte von einem zunächst künstlich absolut giftfest gemachten Jungrinde, das dann in Intervallen von mehreren Tagen oder Wochen erst Injektionen von Toxingenerationen, später solche von originären Kulturen und schließlich von Rauschbrandsaft (bis zu 50 ccm von einem Schafe gewonnener rauschbrandiger Ödemflüssigkeit) erhalten hatte. Durch 0,05—0,1 ccm dieses Serums wurden Meerschweinchen, wie an großen Reihen festgestellt wurde, verläßlich vor einer 3—8 Tage später vorgenommenen künstlichen Infektion geschützt. Wir impften nun im Frühjahr 1905 etwa 800 Stück Jungrinder in Tirol und Niederösterreich, die auf gefährlichen Rauschbrandalpen sommerten. Der Erfolg war wieder ein ungünstiger, indem 8 Stück = 1 ‰ der Impflinge auf der Weide an natürlichem Rauschbrand verendeten. Worauf der ungenügende Schutz zurückzuführen war, ließ sich nicht feststellen. Es wäre möglich, daß auch in diesem Falle die Polyvalenz des Rauschbrandbazillus eine Rolle spielte (s. o.). Unser Serum, das monovalent war, schützte Meerschweinchen zwar vor fünf anderen Rauschbrandstämmen, nicht aber, wie des weiteren festgestellt wurde, vor einem sechsten Stamme, der aus bayrischem Rauschbrandmateriale (von Prof. Kitt seinerzeit übersandt) von uns gezüchtet wurde. Vielleicht war überdies der Impfschutz kein genügend lang anhaltender. Erwähnt sei noch, daß das im Eisschranke in wohlverschlossenen Gefäßen aufbewahrte Serum nach Ablauf weniger Monate seine spezifische Wirkung vollkommen eingebüßt hatte. Auch in dieser geringen Haltbarkeit läge ein Nachteil für die Anwendung eines derartigen Serums in der Praxis.

Literatur.

1) ARLOING, CORNEVIN et THOMAS, Le charbon symptomatique du boeuf, deuxième édition, Paris 1887. Asselin & Houzeau.
2) DUENSCHMANN, Ann. de l'Inst. Pasteur 1894.
3) EHLERS, Untersuchungen über den Rauschbrandpilz. Inaug.-Diss. Rostock 1884.
4) GRASSBERGER und SCHATTENFROH, Über das Rauschbrandgift, Wien 1904. — Über die Beziehungen von Toxin und Antitoxin, Wien 1904. — Antitoxische und antiinfektiöse Immunität. Sitzungsberichte der Kaiserl. Akademie der Wissenschaften, Wien, Juli 1905.
5) KITT, Neues über den Rauschbrand. Sammelreferat, Monatshefte für Tierheilkunde, Bd. XIII. — Immunität und Schutzimpfungen bei Rauschbrand des Rindes. Wassermann-Kolle, Handbuch für pathogene Mikroorganismen. — Zahlreiche Beiträge dieses Forschers zit. in letzterer Abhandlung.
6) KITASATO, Zeitschr. für Hygiene u. Infektionskrankheiten 1889.
7) LECLAINCHE-VALLÉE, Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, 1902.
8) NÖRGAARD, VICTOR A., Blackleg in the United States and the distribution of vaccine by the Bureau of Animal Industry, Washington 1898, 1900, 1901.
9) SUCHANKA, Österreich. Revue und Monatsschrift für Tierheilkunde 1886—1892.
10) STREBEL, Schweizer Archiv für Tierheilkunde 1896, 1899.

XXVI.

Schweinerotlaufvaccin.

Von

Dr. E. Joest,

o. Prof. an der Kgl. Tierärztl. Hochschule in Dresden.

Das PASTEURsche Verfahren.

Geschichte des Verfahrens und Herstellung der Vaccins. Die Grundlage der PASTEURschen Schutzimpfungsmethoden bildet die Abschwächung der Krankheitserreger auf experimentellem Wege. Eine derartige Abschwächung des Infektionsstoffes hatte PASTEUR zuerst bei der Geflügelcholera und beim Milzbrand vorgenommen; kurze Zeit darauf gelang sie ihm auch beim Schweinerotlauf.

Durch ein Schreiben vom 2. Dezember 1882 teilte PASTEUR[1]) der Akademie der Wissenschaften zu Paris mit, daß er in Gemeinschaft mit THUILLIER bei Untersuchungen über den Schweinerotlauf einen sehr kleinen Mikroben entdeckt habe, der große Ähnlichkeit mit dem Erreger der Geflügelcholera habe und der die Form einer 8 besitze. Der Mikrobe ließe sich leicht züchten. Es wird weiter mitgeteilt, daß es gelungen sei, die Krankheit in einer gutartigen Form auf Schweine überzuimpfen, und daß derart geimpfte Tiere sich gegenüber einer Neuansteckung refraktär erwiesen hätten. — In welcher Weise eine Abschwächung des Virus erzielt wurde, wird nicht gesagt. Es ist dies auch belanglos, da PASTEUR und THUILLIER, wie aus der Beschreibung des gefundenen Mikroben zu entnehmen ist, bei ihren ersten Beobachtungen wahrscheinlich nicht den Erreger des Schweinerotlaufes, sondern den der Schweineseuche vor sich hatten. Die weiteren Untersuchungen der genannten Forscher betreffen jedoch den Rotlaufbazillus.

In ihrer zweiten Mitteilung, die PASTEUR und THUILLIER[2]) der Akademie am 26. November 1883 machten, geben die Forscher an, auf welche Weise die Abschwächung des Rotlaufmikroben und die Darstellung eines Vaccin erreicht wurde.

PASTEUR hatte schon früher die Erfahrung gemacht, daß ein aus dem Mundspeichel eines an Hydrophobie leidenden Menschen gewonnener Mikrobe*), der junge Meerschweinchen und Kaninchen tötete, sich durch fortgesetzte Impfungen von einem jungen Meerschweinchen auf das andere

---

*) Nach PREISZ handelte es sich um den FRÄNKEL-WEICHSELBAUMschen Pneumokokkus.

für Kaninchen derart abschwächen ließ, daß er nunmehr für letztere weniger virulent war. Die mit dem auf diese Weise abgeschwächten Mikroben geimpften Kaninchen erwiesen sich immun. Hiermit war eine neue Methode der Mitigation gefunden, die PASTEUR und THUILLIER des weiteren auch beim Schweinerotlauf anwandten.

PASTEUR und THUILLIER[2]) beobachteten, daß Kaninchen und Tauben an Rotlauf sterben. Sie untersuchten nun, wie sich das Rotlaufvirus bei wiederholten Kaninchen- und Taubenpassagen verhält und stellten fest, daß es dabei für die betreffende Tierart an Virulenz zunimmt, daß es aber bei diesen Passagen für das Schwein verändert wird, und zwar derart, daß die durch eine Reihe von Kaninchen hindurchgeschickten Krankheitserreger für das Schwein sich abgeschwächt, die durch eine Serie von Tauben hindurchgeschickten Mikroben sich dagegen für das Schwein verstärkt erwiesen. „Bientôt le sang des lapins inoculé aux porcs n'amène plus la mort, quoiqu'il les rende malades. Après leur guérison, ils sont vaccinés contre le rouget mortel.“ —

Das ist alles, was PASTEUR und THUILLIER über die Mitigation des Ansteckungsstoffes und seine Verwendung zur Schutzimpfung mitteilen. Wie viele Kaninchen er passiert haben muß, bis er genügend abgeschwächt ist, wird nicht angegeben.

Ob die Forscher bei diesen ersten Versuchen immer mit reinem Material arbeiteten, muß zweifelhaft erscheinen. Es spricht hiergegen, daß sie beobachtet haben wollen, wie der Rotlaufmikrobe bei den Kaninchenpassagen größer wurde und die Form einer 8 annahm. Spätere exakte Versuche haben überdies gezeigt, daß bei fortlaufenden Kaninchenimpfungen die Tiere schon bei der zweiten oder dritten Passage des Rotlaufbazillus oft nicht mehr sterben (KITT[4]), sowie daß eine Rotlaufkultur, die Schweine sicher tötet, durch Taubenpassagen für Schweine gänzlich unwirksam wird (VOGES und SCHÜTZ[5]). Durch die letztangeführten Versuche wird zugleich die Behauptung PASTEURS, daß man das Rotlaufvirus durch Taubenpassage für Schweine verstärken könne, widerlegt. — Daß man durch einseitige Tierpassagen einen Krankheitserreger einer Tierspezies derart anpassen kann, daß er für diese Spezies hochvirulent wird, für andere Tierarten aber an Virulenz abnimmt, ist vielfach festgestellt. Für den Rotlaufbazillus bedarf es dazu nicht der Passage speziell durch Kaninchen, sondern die Abschwächung läßt sich, wie VOGES und SCHÜTZ[5]) gezeigt haben, auch in anderen Tieren, z. B. der Maus und der Taube, erreichen. Wenn sonach die Möglichkeit der Abschwächung der Rotlaufbazillen durch einseitige Tierpassagen im allgemeinen zugegeben werden muß, so ist damit noch nicht erwiesen, daß die Abschwächung der Krankheitserreger bei den PASTEURschen Versuchen lediglich durch Kaninchenpassagen bewirkt wurde. Der Rotlaufbazillus ist in seiner Virulenz für das Schwein großen Schwankungen unterworfen, und selbst hochvirulente Kulturen verlieren bei der künstlichen Fortzüchtung ihre Pathogenität für das Schwein oft schnell. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß diese Umstände auch PASTEUR und THUILLIER bei der Abschwächung des Rotlaufvirus zu Hilfe gekommen sind. Vielleicht hatten sie das Glück, daß ihnen ein besonders geeigneter Stamm in die Hände fiel. — Jedenfalls steht fest, daß PASTEUR und THUILLIER mit einer für Schweine wenig virulenten Kultur arbeiteten.

Wie weiter unten noch zu erwähnen sein wird, werden bei der Anwendung des PASTEURschen Verfahrens in der Praxis zwei Impfstoffe

(I. und II. Vaccin) angewandt. Das, was Pasteur und Thuillier[2]) über die Abschwächung angeben, bezieht sich auf das I. Vaccin, das somit aus den Bazillen des Kaninchenrotlaufes bestehen würde. Über die Gewinnung des II. Vaccins habe ich in den ersten Arbeiten von Pasteur nichts gefunden. In späteren Arbeiten anderer Autoren wird angegeben, daß das II. Vaccin aus den Bazillen des Taubenrotlaufes bestehe.

Zurzeit werden Pasteursche Vaccins gegen Schweinerotlauf in verschiedenen „Laboratorien Pasteur“ dargestellt. Uber die Art der Darstellung der Impfstoffe ist nichts näheres bekannt. Insbesondere ist auch nicht bekannt, in welcher Weise heutzutage die Abschwächung der Kulturen vorgenommen wird. Ich glaube kaum, daß sich die genannten Laboratorien hierzu noch der ursprünglich von Pasteur und Thuillier[2]) angegebenen Methode bedienen. Wahrscheinlich züchtet man zum Zwecke der Impfstoffdarstellung alte erprobte Kulturen, die bei genügender Abschwächung gut immunisierend wirken, fortdauernd weiter. Dabei würde man allerdings mit der Gefahr zu rechnen haben, daß die Kulturen sich im Laufe der Zeit derart abschwächen, daß sie immunisatorisch unwirksam werden. Diese Gefahr ist aber tatsächlich kaum vorhanden; denn wir wissen durch die Untersuchungen von Voges und Schütz[5]) (und aufgrund eigener Beobachtungen kann ich dies bestätigen), daß die Abschwächung der Rotlaufbazillen in Kulturen nicht dauernd zunimmt, sondern daß die Kulturen, sobald die Abschwächung einen gewissen Grad, das „Abschwächungsoptimum“ (Voges und Schütz), erreicht hat, sich lange Zeit konstant erhalten.

Nach Preisz[6]) sind die verschiedenen „Laboratoires Pasteur“ in den einzelnen Ländern als Filialen des Pariser „Institut Pasteur“ zu betrachten. Die verschiedenen Laboratorien bereiten nach Preisz den Impfstoff nicht selbst, sondern züchten nur den aus Paris erhaltenen Urstoff, die „Semence“, weiter.

Der Pasteursche Rotlaufimpfstoff besteht aus zwei getrennten Impfflüssigkeiten, dem I. und II. Vaccin. Die Vaccins werden in kurzen, mit einem etwas gebogenen Halse versehenen, mit Gummipfropfen verschlossenen Glastuben abgegeben.

Beide Impfflüssigkeiten bestehen aus einer hellgelblichen, bouillonartigen, leicht getrübten, geruchlosen Flüssigkeit von neutraler Reaktion, in der mikroskopisch und kulturell zahlreiche Rotlaufbazillen nachweisbar sind. Bisweilen werden auch andere Bakterien in den Flüssigkeiten gefunden (Lydtin und Schottelius[7]), Schütz[8]), Kitt[9]) eigene Untersuchungen). Versuche an kleinen, für Schweinerotlauf empfänglichen Tieren bestätigen das Vorhandensein lebender Rotlaufkeime in den Vaccins. „Die Impfversuche, welche einzeln, sowie auch gleichzeitig mit beiden Vaccins an einer größeren Anzahl gleichartiger Mäuse vorgenommen wurden, ergaben an diesen Tieren keine Befunde, aus denen auf eine verschiedene Virulenz der beiden Gifte geschlossen werden könnte“ (Lydtin und Schottelius[7]). Voges und Schütz[5]) beobachteten, daß Vaccin I eine heftige, Vaccin II dagegen so gut wie gar keine Reaktion bei Schweinen erzeugte. Diese Forscher vermuteten deshalb, daß eine Verwechslung der Impfflüssigkeiten vorgekommen sein könnte.

Die Pasteurschen Vaccins gegen Schweinerotlauf bestehen somit aus lebenden Bouillonkulturen des Rotlaufbazillus. Die gelegentlich in den Impfflüssigkeiten gefundenen Keime anderer Art sind als zufällige Verunreinigung anzusehen, zu deren Zustandekommen der

vom bakteriologischen Standpunkte aus unzweckmäßige Verschluß der Glastuben mit Gummipfropf nicht selten beitragen dürfte. Besondere Virulenzunterschiede zwischen Vaccin I und II haben sich nach den vorliegenden Literaturangaben durch die üblichen Tierversuche im Laboratorium nicht feststellen lassen. Jedenfalls sind die Rotlaufkeime in beiden Vaccins als abgeschwächt anzusehen (SCHÜTZ[8]).

Ob eine regelmäßige **Prüfung** der PASTEURschen Impfstoffe vor ihrer Abgabe zur Schutzimpfung von Schweinen stattfindet, und in welcher Weise etwa die Prüfung ausgeführt wird, darüber ist nichts bekannt.

Die **praktische Ausführung der PASTEURschen Rotlaufschutzimpfung** gestaltet sich folgendermaßen.

Die zu impfenden Schweine erhalten zuerst subkutan eine Einspritzung von Vaccin I und 12 Tage (höchstens 15 Tage) danach ebenfalls subkutan eine solche von Vaccin II. Die Dosis beträgt 1 ccm für acht Schweine = 0,125 ccm für ein Schwein (DEUTSCH und FEISTMANTEL[10]). Jedes Schwein, gleichviel welchen Alters oder Gewichts, erhält die gleiche Impfstoffmenge. Die Impfung geschieht nach der PASTEURschen Vorschrift an der Innenfläche der Hinterschenkel, und zwar wird Vaccin I am rechten, Vaccin II am linken Schenkel injiziert, nachdem selbstverständlich die Impfstelle gereinigt und desinfiziert worden ist. — Es ist nicht einzusehen, warum die Impfung nicht allgemein an bequemer gelegenen Körperstellen, z. B. am Grunde der Ohrmuschel, erfolgen soll. Die letztgenannte Impfstelle wird in der Gebrauchsanweisung des Stuttgarter Instituts indessen nur für ältere Tiere empfohlen.

Immunität entsteht in etwa 14—20 Tagen nach der zweiten Impfung. Sie dauert etwa 1 Jahr. Tiere, die länger gehalten werden, müssen vor Ablauf des Jahres von neuem geimpft werden.

Bereits bei den ersten größeren Versuchen mit der PASTEURschen Schutzimpfung machte man die Erfahrung, daß die Impflinge einige Tage nach der Impfung eine mehr oder weniger ausgeprägte Reaktion zeigen, und daß diese Reaktion um so stärker ist, je älter die Tiere sind. Für gewöhnlich besteht die Reaktion darin, daß die Schweine in der Zeit zwischen dem 2. und 6. Tage nach der Impfung eine meist mehrere Tage anhaltende Temperaturerhöhung mit mehr oder weniger deutlich gestörtem Allgemeinbefinden und entzündliche Erscheinungen an der Impfstelle zeigen. Diese Erscheinungen verschwinden bei jüngeren Tieren in der Regel bald; ältere und fette Tiere dagegen reagieren häufig in der Weise, daß sie Impfrotlauf bekommen. Dieser zeigt in leichteren Fällen das Bild der Rotlaufurticaria; derart erkrankte Tiere erholen sich meist wieder, bisweilen aber akquirieren sie eine Rotlaufendokarditis. In schwereren Fällen tritt der Impfrotlauf ganz wie die natürliche Rotlaufseptikämie auf und führt dann wie diese meist zum Tode. In selteneren Fällen hat die Impfung keinen äußerlich erkennbaren Rotlauf, sondern lediglich chronische Rotlaufendokarditis im Gefolge. Auch Nachkrankheiten unbestimmter Art, die ein Verkümmern und mangelhafte Gewichtszunahme bedingen, scheinen bei älteren Impflingen häufiger zu sein als bei jüngeren. Um die Gefahr, die älteren Impflingen derart droht, zu umgehen, schreibt die Gebrauchsanweisung für die PASTEURschen Rotlaufimpfstoffe vor, daß nur junge Schweine zu impfen sind, und ältere Tiere nur dann, wenn sie bereits als Ferkel geimpft wurden. Freilich dürfen die Tiere bei der ersten Impfung auch nicht zu jung sein. So ist mehrfach die Erfahrung gemacht worden, daß Saugferkel die Impfung

schlecht vertragen; man wartet deshalb zweckmäßig mit der Impfung so lange, bis die Ferkel abgesetzt sind. Als beste Impfzeit wird ein Alter der Tiere von 2—3 (oder höchstens 4) Monaten angegeben. (Eine Gefahr für die beiden ersten Lebensmonate hinsichtlich einer Erkrankung an natürlichem Rotlauf besteht ja kaum, da junge Ferkel eine ziemlich hohe natürliche Resistenz gegen Rotlauf besitzen.) — Als gefährlich bezeichnete bereits Pasteur die Impfung trächtiger Säue. Die Gebrauchsanweisung des Stuttgarter Laboratoriums macht ebenfalls darauf aufmerksam, daß nur im Anfang der Trächtigkeit geimpft werden dürfe, und daß die Impfung säugender Tiere zu unterlassen sei.

Ein Nachteil der Pasteurschen Rotlaufschutzimpfung besteht, abgesehen von dem vorstehend bereits erwähnten, nicht seltenen Auftreten von Impfrotlauf und abgesehen von chronischen Nachkrankheiten bei den Impflingen, darin, daß geimpfte Tiere Rotlaufkeime durch den Darm ausscheiden und daher andere, ungeimpfte Schweine mit Rotlauf zu infizieren vermögen. Weiter ist mißlich, daß die Pasteursche Impfung, die selbstverständlich nur als Schutzimpfung, niemals aber als Heilimpfung angewandt werden kann, in Fällen, in denen spontaner Rotlauf ausgebrochen oder in der Entwicklung begriffen ist, nicht anwendbar ist; denn in solchen Fällen wirkt die Impfreaktion ungünstig auf die bereits bestehende Krankheit ein oder beschleunigt deren Ausbruch. Darauf hat bereits früher Chamberland[11]) hingewiesen. Er teilt mit, daß in Frankreich in einigen derartigen Fällen Verluste von 5—10 % der Impflinge nach der ersten Impfung entstanden seien. Es ist selbstverständlich, daß auch andere bei den Impflingen bestehende Infektionskrankheiten durch die Impfreaktion begünstigt werden könnnen. So wird die chronische Schweineseuche, die häufig in gutartiger, gewissermaßen latenter Form in den Beständen herrscht, zum akuten Ausbruch gebracht werden können.

Auf die **praktischen Ergebnisse** der Pasteurschen Rotlaufschutzimpfung kann hier nicht näher eingegangen werden. Nur das möchte ich bemerken, daß die Resultate in den einzelnen Ländern verschieden sind. So hat man in Ungarn die Pasteursche Vaccination seit Jahren in großem Umfange mit sehr gutem Erfolge angewandt, während in Deutschland und anderen Ländern die Ergebnisse ungleich und im allgemeinen minder gut ausfielen wie in Ungarn. Mit Preisz[6]) bin ich der Ansicht, daß in der verschiedenen Empfänglichkeit der einzelnen Schweinerassen ein Hauptgrund für die Verschiedenartigkeit der Ergebnisse der Schutzimpfung zu suchen ist. In Ungarn wird in der Hauptsache ein gröberes Landschwein gezüchtet, während in Deutschland und anderen Ländern feinere Rassen bevorzugt werden. Pasteur und Thuillier[2]) wiesen übrigens bereits im Jahre 1883 auf das verschiedene Verhalten der einzelnen Rassen gegenüber ihren Vaccins hin. Auf Grund der Erfahrungen, die derart bei der Impfung verschiedener Schweinerassen gemacht worden sind, haben Voges und Schütz[5]) sich dahin ausgesprochen, daß die Pasteursche Methode hauptsächlich für gröbere Schweinerassen geeignet sei, während bei feineren Rassen der Lorenzschen Methode der Vorzug zu geben sei. — Die Tiere, die die Pasteursche Impfung gut überstehen, erlangen, wie Voges und Schütz[5]) experimentell gezeigt haben, und wie die praktischen Erfahrungen gelehrt haben, eine hohe Immunität, die, wie bereits bemerkt, etwa ein Jahr andauert.

Der Preis der Impfstoffe (I. und II. Vaccin) für ein Schwein beträgt nach dem Preisverzeichnis des Laboratoriums Pasteur in Stuttgart 20 Pfg.

Die VOGES-SCHÜTZsche Modifikation des PASTEURschen Verfahrens.

Da das Blut der mit Vaccin I (und mit Rotlaufkultur überhaupt) geimpften Schweine, wie VOGES und SCHÜTZ[5]) fanden, eine Reihe von Tagen nach der Impfung mit Rotlaufbazillen überschwemmt ist, und auch zur Zeit der von PASTEUR vorgeschriebenen zweiten Impfung noch Rotlaufbazillen enthält, so halten es VOGES und SCHÜTZ für richtiger, die Impfung mit Vaccin II nicht 12 Tage, sondern 3—4 Wochen nach der Impfung mit Vaccin I vorzunehmen. Diese Modifikation des PASTEURschen Verfahrens hat meines Wissens jedoch eine praktische Anwendung nicht erfahren.

Die KITTsche Modifikation des PASTEURschen Verfahrens.

KITT[4]) ermittelte bei Nachprüfungen des PASTEURschen Verfahrens und bei seinen Studien über das Verhalten der Virulenz der durch den Kaninchenkörper hindurchgeschickten Rotlaufbazillen,

„daß eine Abschwächung des Rotlaufgiftes sich leicht erzielen läßt, wenn das von natürlichen Vorkommnissen stammende Gift des Schweinerotlaufes auf Kaninchen verimpft wird, daß schon in dem Körper des ersten Kaninchens die Abschwächung innerhalb 5—6 Tagen sich derart vollzieht, daß man das Körperblut und das im geimpften Ohr als Impfreaktion aufgetretene Exsudat der verendeten oder am 6. Tage getöteten Kaninchen direkt zur Schutzimpfung bei Schweinen verwenden kann . . . . Die Versuche legen weiter dar, daß ein Rotlaufmaterial aus Kaninchen I. Generation jenen Grad von Virulenz besitzt, welcher den Schweinen schon nach einmaliger Impfung Immunität verleiht, mithin die bisher in zwei Tempis vorgenommene Impfung in einen Akt zusammengezogen werden kann."

Das von KITT angegebene Verfahren stellt somit ebenfalls eine Modifikation des PASTEURschen Verfahrens dar.

Im Hinblick auf die Aggressintheorie BAILS ist bei diesen Versuchen von Interesse, daß die Immunisierung auch mit dem Exsudat der Impfstelle gelang.

Auch das KITTsche Verfahren ist meines Wissens in der Praxis nicht versucht worden.

Das „Porcosan".

Das „Porcosan" ist ein Geheimmittel, das von einer chemischen Fabrik in Mannheim in den Handel gebracht wurde. Ob „Porcosan" zurzeit noch hergestellt wird, ist mir nicht bekannt*).

Über die Darstellung des Präparates ist nichts veröffentlicht. Aus einer Reihe von Untersuchungen über seine Zusammensetzung läßt sich jedoch die Art der Darstellung unschwer erraten. Als Gesamtergebnis der Untersuchungen von JOHNE[12]), VOGES[13]), SCHLEGEL[14]), DEUPSER[15]), VAN LEEUWEN[16]), MUSEHOLD[17]) und einem ungenannten Autor[18]) ist zu erwähnen, daß das „Porcosan" in seiner Zusammensetzung inkonstant ist. Es stellte eine dickflüssige, Glyzerin enthaltende Masse dar, in der sich neben bakteriellen Verunreinigungen verschiedener Art in der Regel Rot-

*) Eine diesbezügliche Anfrage im August 1906 erhielt ich mit der Bemerkung der Post zurück, daß die betreffende Firma erloschen ist.

laufbazillen nachweisen ließen. Die letzteren zeigten sich teils abgeschwächt, teils virulent. Musehold konstatierte, daß eine Probe „Porcosan“, in der er lebende Rotlaufkeime nachgewiesen hatte, sich bei einer 3 Wochen später erfolgenden Untersuchung frei von solchen erwies, d. h. die Bakterien mußten inzwischen abgestorben sein. Die meisten der vorstehend genannten Untersucher vermißten bei kleinen Versuchstieren eine immunisierende Wirkung des Präparates.

Demnach besteht also das „Porcosan“ aus Rotlaufkultur, der zum Zwecke der Abschwächung Glyzerin zugesetzt wurde. Je nach dem Alter des Präparates, also je nach der Dauer der Glyzerineinwirkung, sind die Rotlaufkeime virulent, abgeschwächt oder abgetötet.

Aus diesen Tatsachen wird es ohne weiteres erklärlich, daß das „Porcosan“ bei seiner Anwendung in der Praxis verschieden wirken mußte. Ein Impfstoff, der vollvirulente Rotlaufbazillen enthält, wird nicht selten Impfrotlauf erzeugen, ein Impfstoff, der abgeschwächte Rotlaufbazillen enthält, wird, wie die Pasteurschen Vaccins, ohne in der Regel Impfrotlauf zu erzeugen, immunisierend wirken, während abgetötete Rotlaufkeime keinerlei schädliche Wirkung entfalten, aber auch keine Immunität erzeugen.

Diesen Voraussetzungen entsprachen auch ganz die Erfahrungen in der Praxis. Das „Porcosan“ sollte, wie die Fabrik angab, bei einmaliger Impfung einen nach 10—14 Tagen eintretenden, sechs bis sieben Monate dauernden Impfschutz erzeugen, ohne örtliche und allgemeine Reaktionen bei den Impflingen hervorzurufen. Es wurden jedoch in zahlreichen Fällen mehr oder weniger starke Reaktionen und Impfrotlauf (besonders in Form der Rotlaufurticaria) beobachtet, während in anderen Fällen die Impfung ohne Begleiterscheinungen verlief. Über die erzeugte Immunität gehen die Ansichten der einzelnen Beobachter auseinander. In manchen Fällen wurden gute Erfahrungen mit dem Mittel gemacht. — Im übrigen mußten dem Präparat natürlich dieselben Nachteile in der Praxis anhaften, wie den Pasteurschen Vaccins, wie ich dies weiter oben des Näheren geschildert habe.

Auf Grund des Ergebnisses der Prüfung des „Porcosan“ im Laboratorium und in der Praxis hat sich die preußische Technische Deputation für das Veterinärwesen im Jahre 1896 dahin ausgesprochen, daß es notwendig erscheine, die Landwirte vor diesem Mittel zu warnen.

Das Verfahren von Lorenz.

Außer seinem bekannten, im II. Bande dieses Handbuches näher beschriebenen Verfahren der Serovaccination hat Lorenz [19]) im Jahre 1897 eine Methode der unmittelbaren aktiven Immunisierung gegen Schweinerotlauf angegeben, die darin besteht, daß dem Impfling mehrere Dosen abgetöteter Rotlaufkultur eingespritzt werden.

Je nach ihrer Größe sollten die zu impfenden Schweine 3—7 ccm toter Bakterien subkutan erhalten. Nach seinen Versuchen sah es Lorenz als „wahrscheinlich“ an, daß Schweine auf diese Weise gegen Rotlauf geschützt werden können. Freilich sei erst noch festzustellen, wie lange der Impfschutz dauere, und ob nicht eine öftere Wiederholung der Injektion notwendig sei. Über die verwendeten Rotlaufkulturen und über die Art der Abtötung macht Lorenz keine Angaben. (Nach Voges und Schütz [5]) scheint Lorenz die Abtötung dadurch vorgenommen zu haben, daß er die lebenden Kulturen in kochendes Wasser eintauchte.)

Die in der Praxis angestellten Versuche (TOEPPER[20]), HOEHNE[21]) ergaben ein derart unbefriedigendes Resultat, daß LORENZ[22]) bereits einige Monate nach der ersten Publikation des neuen Verfahrens erklärte, er betrachte dieses als abgetan. Es erzeuge nicht nur einen zu schwachen und zu kurz dauernden Impfschutz, sondern sei auch nicht gefahrlos, insofern als die Injektion größerer Mengen abgetöteter Rotlaufkultur bei bereits mit Rotlauf infizierten Schweinen eine recht heftige Erkrankung auszulösen vermöge. VOGES und SCHÜTZ[5]) haben dann auch durch exakte Versuche gezeigt, daß nach LORENZ mit abgetöteten Rotlaufkulturen geimpfte Schweine keine Immunität erwerben.

Eine weitere Anwendung in der Praxis hat dieses LORENZsche Verfahren nicht gefunden. Die vorstehend erwähnten Ergebnisse der Schutzimpfung haben gezeigt, daß eine Schutzimpfung gegen Schweinerotlauf mit abgetöteten Kulturen unmöglich ist.

(Über die bei der Serovaccination gegen den Rotlauf benutzten Vaccins vgl. Bd. II.)

Literatur.

1) PASTEUR und THUILLIER, Comptes rendus de l'Acad. des Sciences 1882, Tome VC.
2) Dies., Comptes rendus de l'Acad. de Méd., 2. Sér., 1883, Tome XII.
3) PREISZ, H., Kolle-Wassermanns Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd. III, Jena 1903.
4) KITT, TH., Revue für Tierheilk. u. Tierzucht 1886, Bd. IX.
5) VOGES, O. u. SCHÜTZ, W., Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk. 1898, Bd. XXIV.
6) PREISZ, H., Kolle-Wassermanns Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd. IV, Jena 1904.
7) LYDTIN, A. u. SCHOTTELIUS, M., Der Rotlauf der Schweine, seine Entstehung und Verhütung, Wiesbaden 1885.
8) SCHÜTZ, W., Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk. 1885, Bd. XI.
9) KITT, TH., Wert und Unwert der Schutzimpfungen gegen Tierseuchen, Berlin 1886.
10) DEUTSCH, L. und FEISTMANTEL, C., Die Impfstoffe und Sera, Leipzig 1903.
11) CHAMBERLAND, Ann. de l'Inst. Pasteur 1894.
12) JOHNE, Deutsche Zeitschr. f. Tiermed. 1896, Bd. XXII.
13) VOGES, O., Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1896, Bd. XXII.
14) SCHLEGEL, M., Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1897.
15) DEUPSER, Zentralbl. f. Bakt. 1896, Bd. XX.
16) LEEUWEN, A. VAN, Holländ. Zeitschr. f. Tierheilk., 1899, Bd. XXVI.
17) MUSEHOLD, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, 1898, Bd. XIV.
18) Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1896.
19) LORENZ, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1897 und Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1897.
20) TOEPPER, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1897.
21) HOEHNE, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1897.
22) LORENZ, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1897 (Verhandl. des Deutschen Veterinärrates zu Kassel).

XXVII.

Schutzimpfung gegen Geflügelcholera.

Von

Prof. Dr. M. Casper

in Breslau.

Im Jahre 1880 veröffentlichte Pasteur bezüglich der Cholera der Hühner eine Reihe von Beobachtungen, welche insofern bedeutungsvoll geworden sind, als sie den Ausgangspunkt bildeten für die großen Arbeiten Pasteurs auf dem Gebiete der Schutzimpfungen. Diese Beobachtungen lehrten, daß durch Einimpfung der abgeschwächten Bouillonkulturen des Krankheitserregers Hühner gegen die für gewöhnlich tödliche Geflügelcholera geschützt werden können. Diese Entdeckung Pasteurs eröffnete einen ganz neuen Einblick in das Wesen der Immunisierung, indem sie zeigte, daß virulente Mikroorganismen ihre Pathogenität verlieren können, daß eine milde Durchseuchung ihren Grund in der schwächeren Wirkung solch mitigierter Krankheitserreger haben kann und daß es verschiedene Grade der Immunität gibt.

Am 10. Februar 1880 machte Pasteur[31]) der Académie de médecine seine erste Mitteilung über die Cholera der Hühner, deren Bakterien er in alkalisierter Hühnerbouillon züchten konnte. Durch bestimmte Modifikationen dieser in Kolben angesetzter Kulturen hatte Pasteur die Mikroben so abzuschwächen vermocht, daß eine Impfung mit denselben wohl eine lokale Erkrankung des Huhnes, nicht aber den Tod im Gefolge hatte. Die geimpften Tiere erwiesen sich für spätere Impfungen mit virulentem Material unempfänglich. Es war ihm somit gelungen, die giftige Bakterie in „ihre eigene Vaccine" umzuwandeln.

Dem Drängen, sein Verfahren zu veröffentlichen, gab Pasteur nicht nach, erst am 26. Oktober 1880 ließ er sich zur Bekanntmachung herbei. Das Verfahren ist äußerst einfach: Pasteur ließ die Bouillonkulturen der Hühnercholera möglichst lange, 3, 4, 5, ja 6—10 Monate lang, unter Wattepfropf bei Luftzutritt im Dunkeln stehen. Im Laufe der Zeit nimmt die Virulenz der Mikroben ab, wie durch Impfversuche mit von Zeit zu Zeit entnommenen Proben festgestellt werden kann und erlischt endlich gänzlich. Eine Impfung mit einer Kultur, die so wenig giftig ist, daß sie nicht mehr tötet, wohl aber noch krank macht, schützt, nachdem die lokale Läsion abgelaufen ist, gegen Impfungen mit den

allergiftigsten Erregern. Da Kulturen, welche luftdicht in zugeschmolzenen Gefäßen aufbewahrt wurden, noch nach 10 Monaten ihre Virulenz unverändert beibehalten hatten, folgerte PASTEUR, daß der Sauerstoff der Luft der abschwächende Faktor sei. Die Abschwächung der Virulenz ließ sich aber nicht mit gleichmäßiger Sicherheit bei allen Kulturgläsern erzielen, sondern trat in dem einen Kolben nach längerer, in dem anderen nach kürzerer Zeit ein; einzelne Kulturen blieben auch bei Luftzutritt lange Zeit unverändert virulent. PASTEUR erklärte sich diese Differenz so, daß in dem Falle, in welchem die Virulenz sich lange Zeit unverändert erhielt, sich dichte Anhäufungen von Mikroben in den oberen Schichten der Kulturflüssigkeit bilden, welche die Einwirkung des Sauerstoffes auf die Mikroben der tieferen Schichten verhindern.

PASTEUR stellte auch fest, daß die einmalige Schutzimpfung nicht immer genügt, um volle Immunität zu erzielen, daß manche Hühner einer 2—3 maligen Impfung mit mitigiertem Impfstoff bedürfen, um Immunität zu erlangen. Er führte daher eine zweimalige Impfung in der Weise ein, daß den Tieren zuerst ein sehr abgeschwächter Impfstoff (premier vaccin) und einige Zeit darauf (nach 12—14 Tagen) ein weniger abgeschwächter, stärker wirkender Impfstoff (deuxième vaccin) eingespritzt wurde*). Die Impfung erfolgte anfangs nach PASTEURS Vorschrift in die Unterhaut der äußersten Flügelspitze, später pflegte man unter die Brusthaut oder direkt in die Brustmuskulatur zu impfen. Die Einspritzung der abgeschwächten Kultur erzeugte an der Impfstelle lokale Erscheinungen, die namentlich von CORNIL[4]) an der Brustmuskulatur der Hühner eingehend beschrieben wurden. Danach begann der Prozeß in Form einer ödematösen Infiltration des Bindegewebes, welches mit Bakterien, Lymphzellen und Fibrin angefüllt war. Die entzündete Partie erschien grau, opak, derb und fest, die Muskelfasern zeigten eine ausgesprochene Neigung zum Zerfall. Die betreffende Partie des Brustmuskels wurde nekrotisch, löste sich gegen Ende der zweiten Woche von dem lebenden Gewebe ab, zog sich zusammen, trocknete ein und wurde von dem umgebenden gesunden Gewebe durch eine Membran geschieden, deren Innenfläche mit einem weißen Detritus bedeckt war. Das Segment stieß sich später durch eine Hautlücke ab, oder wandelte sich schließlich in eine käsige Masse um, die allmählich resorbiert wurde.

Die PASTEURsche Schutzimpfung gegen Hühnercholera wurde in der Praxis nur vereinzelt ausgeführt, die Literatur enthält wenigstens nur zwei Mitteilungen hierüber.

CAGNY[3]) wendete dieselbe im Jahre 1885 bei 63 Stück gesunden Geflügels in einem infizierten Bestande an, indem er 12 Tage nach der ersten Impfung den stärkeren Impfstoff nachfolgen ließ. Nach der ersten Impfung erkrankten alle Tiere mit Ausnahme der Enten, 9 starben. Nach der zweiten Impfung starben 8 Stück; von 63 geimpften Tieren also 17. — Bei einem zweiten Versuche mit 36 Hühnern starben nach der ersten Impfung 8, nach der zweiten 2, von 36 geimpften Tieren also 10. Die Resultate dieser Impfungen müssen als ungünstig bezeichnet werden. CAGNY beschuldigt indes als Ursache derselben eine natürliche Ansteckung der Tiere vor und während des Impftermines, bevor eine volle Immunität erzielt war.

---

*) Das PASTEURsche Laboratorium brachte die Impfstoffe gegen Hühnercholera in wohlverschlossenen Tuben in den Handel. Der Preis des für die Impfung von 100 Hühnern ausreichenden Impfstoffes betrug 5 Franks.

Ein weiterer kleiner Versuch wurde im Jahre 1886 in der Schweiz von Hess[8]) an 16 Hühnern eines verseuchten Geflügelhofes angestellt. Hier wurden zwar nach der ersten Impfung keinerlei krankhafte Erscheinungen beobachtet, dagegen zeigten sich nach der 12 Tage später ausgeführten zweiten Impfung einige Tiere schwer krank.

Am eingehendsten beschäftigte sich mit der Nachprüfung des Impfstoffes Kitt[17]), welcher zwei Versuchsreihen aufstellte, und das aus dem Laboratorium Pasteurs bezogene Präparat genau nach Vorschrift anwendete. In der ersten Versuchsreihe wurden 7 Hennen am Flügel, 2 Hennen an der Brust, 1 Kaninchen am Ohr, 1 Taube am Flügel, 1 Taube an der Brust, außerdem 6 kleinere Vögel teils am Flügel, teils an der Brust geimpft. Hiervon gingen die 6 kleinen Vögel, das Kaninchen und die Tauben innerhalb 12—48 Stunden nach der ersten Impfung an typischer Geflügelcholera zugrunde, die beiden an der Brust geimpften und eine der am Flügel geimpften Hennen erlagen später. Die sechs noch übrigen, am Flügel geimpften Hühner wurden nach der Impfung auffallend krank, erholten sich aber später und vertrugen die zweite Impfung mit dem „deuxième vaccin" sehr gut. Diese Hühner wurden 23 Tage nach der zweiten Impfung zusammen mit 9 Kontrollhühnern einer Infektion mit virulentem Material unterworfen. Dieser Infektion erlagen alle Hühner, auch die schutzgeimpften, wenn auch letztere etwas später als die Kontrolltiere.

In der zweiten Versuchsreihe, in welche auch Enten hineingezogen wurden, waren alle diejenigen Hühner der Kontrollimpfung erlegen, welche nach Pasteurs Vorschrift an den Flügeln die doppelte Schutzimpfung erhalten hatten. Die Probeimpfung mit virulentem Material hatten nur überstanden die am Brustmuskel schutzgeimpfte Henne und Ente und die an den Flügeln schutzgeimpften Enten. Diese Tiere widerstanden auch späteren, in verschiedenen Intervallen wiederholten Impfungen und Fütterungen mit verschiedenen hochvirulenten Stämmen der Hühnercholera.

Die Nachprüfungen Kitts, die hier nur kurz skizziert wurden, bestätigten zunächst, daß die Angaben Pasteurs über die Abschwächung der Geflügelcholerabakterien und über die Wirkung dieser abgeschwächten Kulturen ihre volle Richtigkeit hatten. Die Vaccins brachten bei den geimpften Tieren genau die von Pasteur beschriebenen lokalen Erscheinungen hervor, es konnten Differenzen in der Virulenz des Vaccins durch die Versuche erwiesen werden und endlich wurde konstatiert, daß ein Teil der schutzgeimpften Tiere volle Immunität gegen die Geflügelcholera erlangt hatte.

Wenn somit die Pasteursche Entdeckung der Schutzimpfung gegen Hühnercholera von großer wissenschaftlicher Bedeutung ist, schon deswegen, weil sie den Anstoß gab zu weiteren erfolgreichen Arbeiten auf diesem Gebiete, so kommt doch derselben, wie dies am eingehendsten von Kitt[17]) begründet wurde, ein praktischer Wert nicht zu.

Zunächst ist die zweimalige Impfung im Verhältnis zu dem geringen Wert des Geflügels zu kostspielig und umständlich; dazu kommt, daß es bei dem langen Intervall, das zwischen beiden Impfungen liegt, einer verhältnismäßig langen Zeit bedarf, bis die Immunität perfekt wird. Da die Geflügelcholera einen raschen Verlauf nimmt und oft in wenigen Tagen einen großen Teil des Bestandes ergreift, so würde namentlich die zweite Impfung in den meisten Fällen zu spät einsetzen. Die Impfung in einem schon verseuchten Bestande wäre sonach illusorisch; in einem gesunden, von der Seuche nur bedrohten Bestande die Schutzimpfung

nach Pasteur auszuführen wäre aber deshalb bedenklich und zu widerraten, weil durch die Impfung die Tiere erkranken, einzelne zugrunde gehen und dadurch die Seuche verbreitet wird. Ferner zieht die Schutzimpfung, wie die praktischen Versuche ergeben haben, auf der einen Seite nicht unbedeutende direkte Verluste nach sich, während andererseits die Schutzwirkung bei einem Teil der geimpften Tiere ungenügend ist. Beide Momente — im ersteren Falle zu virulente, im zweiten Falle zu schwache Vaccins — sind darauf zurückzuführen, daß es nicht gelungen ist, den Grad der Abschwächung, die Stärke der Virulenz genau abzuschwächen und einzustellen.

Diese Gründe waren es hauptsächlich, welche der Einführung der Schutzimpfung in die Praxis entgegen standen; jedenfalls gelangte der Impfstoff später im Pasteurschen Institut zu Paris nicht mehr zum Verkauf.

Versuche, Immunität gegen Hühnercholera zu erzeugen durch Einspritzung filtrierter Kulturen, über deren Wirkung schon Pasteur[31]) und Salmon[38]) berichtet haben, wurden von Foa und Bonome[6]) an Kaninchen angestellt. Es gelang ihnen aber nur in einigen Fällen, und auch dann nur nach wiederholter Einspritzung erheblicher Mengen, eine Verzögerung des tödlichen Ausganges zu erzielen. Ebenso resultatlos verliefen die Bemühungen Katzs[16]), Kaninchen durch Impfung bzw. Fütterung mit abgetöteten Kulturen gegen Hühnercholera zu schützen.

Salmon[38]) versuchte das bakterienhaltige Blut durch Erwärmen auf verschiedene Temperaturgrade (bei 124, 130 und 180° F) zu Immunisierungszwecken brauchbar zu machen, hatte aber ebenfalls meist negative Resultate. Salmon stellte bei dieser Gelegenheit fest, daß bei Hühnern zuweilen auch nach Einspritzung verdünnter Kulturen, bzw. Einverleibung weniger Keime, lediglich lokale Veränderungen eintreten und daß überhaupt die Empfänglichkeit der Hühner eine recht ungleiche ist, indem manche bei Impfung von 2—3 Tropfen einer für andere Tiere in dieser Dosis tödlichen Kultur resistent bleiben bzw. nur lokal erkranken und einzelne sogar bis zu 5 ccm Kulturflüssigkeit vertragen.

Auch die Bemühungen Jes's[13]), die Kulturen der Geflügelcholera durch die Einwirkung höherer Temperaturen (50—55° C), durch Zusatz gewisser Chemikalien, wie Kalium hypermanganicum, chromsaure Salze, Formalinlösung, durch Einwirkung von Formalindämpfen für Immunisierungszwecke brauchbar zu machen, müssen als vollkommen ergebnislos bezeichnet werden.

Von verschiedenen Seiten wurde festgestellt, daß die Bakterien aus der Gruppe der Septicämia hämorrhagica auch in immunisatorischer Hinsicht nahe Beziehungen zueinander haben. Es läßt sich durch lebende abgeschwächte Kulturen einer Varietät nicht nur gegen diese, sondern auch gegen andere Varietäten aus derselben Gruppe eine Immunität erzielen. Kitt[11]) war der erste, welcher auf diese Wechselwirkung hingewiesen hat; in einer Reihe von Versuchen, die er auf Anregung Hueppes mit Kulturen der Kaninchenseptikämie unternahm, stellte sich heraus, daß Hühner, welche mit abgeschwächten Pasteurschen Vaccins gegen Geflügelcholera immunisiert waren, sich auch immun gegen Impfungen mit Kaninchenseptikämie erwiesen, während Kontrolltiere gleicher Art nach Impfungen mit dieser Septikämie unter den typischen Erscheinungen der Hühnercholera erlagen.

Zu ähnlichen Resultaten kam Jensen[12]) bei seinen Versuchen mit einer der Rinderseuche sehr ähnlichen Kälberkrankheit, deren Bakterien bei Hühnern ähnlich wie abgeschwächte Geflügelcholerakulturen nur lokale Krankheitsprozesse hervorrufen. Die Hühner, welche die Impfung mit der Kälberkrankheit überstanden hatten, zeigten sich hinterher vollkommen immun gegen wiederholte Impfung mit vollvirulenter Geflügelcholera.

Lignières[26]) versuchte später nachzuweisen, daß diese Gegenseitigkeit in bezug auf die Immunität sämtlichen in diese Gruppe gehörigen Bakterienvarietäten zukommt. Er konnte nämlich experimentell feststellen, daß ein aus der Kultur einer gewissen Varietät hergestellter Impfstoff in erster Reihe gegen diese Varietät schützt, in geringerem Grade aber auch gegen die bipolaren Bakterien der übrigen hierher gehörigen Krankheiten Schutz verleiht. Da aber die schützende Wirkung in dieser Richtung so gering bzw. so unsicher ist, daß sie den praktischen Anforderungen nicht entspricht, andererseits aber das Herstellen eines besonderen Impfstoffes gegen eine jede Krankheit sehr umständlich wäre, stellte Lignières einen gegen sämtliche hierher gehörige Krankheiten wirksamen, sogenannten polyvalenten Impfstoff auf folgende Weise her:

Er wählte mehrjährige, auf Gelatineagar gezüchtete und alle zwei Tage (ca. 500mal) umgezüchtete Kulturen aller sechs Arten (der Septikämie der Schafe, Rinder, Hunde, Pferde, Schweine und Hühner) und züchtete diese in flachen, eine 1—2 ccm hohe Bouillonschicht enthaltenden Kolben (Erlenmeyerscher Kölbchen) bei einer Temperatur von 42—43° C. Je nachdem er die Kulturen fünf Tage oder nur zwei Tage bei dieser Temperatur wachsen ließ, erhielt er einen schwächeren Impfstoff (I. Vaccin) und einen stärkeren Impfstoff (II. Vaccin). Durch einfache Mischung der abgeschwächten Kulturen wird die Polyvalenz des Impfstoffes hervorgerufen; die Dosis des letzteren beträgt für Vögel und Kaninchen $^1/_8$ ccm. Die Impfung kann subkutan oder intraperitoneal ausgeführt werden, die zweite Impfung folgt 12—15 Tage nach der ersten. Die Immunitätsdauer ist individuell und je nach der Tierart verschieden, erstreckt sich aber in keinem Falle auf mehr als ein Jahr.

Mit diesem Impfstoff wurden nach Lignières[26]) Angaben mehr als 70000 Schafe gegen die in Argentinien herrschende septikämische Schafseuche (Lombriz genannt) immunisiert.

Ob und mit welchen Erfolgen diese von Lignières empfohlene Schutzimpfung gegenüber der Hühnercholera in der Praxis ausgeführt worden ist, darüber finden sich bisher in der dem Referenten zugänglichen Literatur keine Mitteilungen. Zwar hat Delfino[5]) im Auftrage Lignières Immunisierungsversuche an sechs Kaninchen angestellt und kommt auf Grund derselben zu dem Schlusse, daß die Schutzimpfung Lignières gegen die Septikämie der Vögel „bei Kaninchen eine kräftige Immunität erzeugt, welche imstande ist, der Wirkung von verhältnismäßig enormen Quantitäten virulenter Kulturen zu widerstehen", indeß sind diese Versuche zu unbedeutend, um einen Schluß auf die praktische Brauchbarkeit der Methode zu gestatten. Somit müssen wir konstatieren, daß diese Art der Schutzimpfung, soweit wenigstens die Geflügelcholera in Betracht kommt, in der Praxis noch nicht erprobt ist.

Die von Roux und Metschnikoff ersonnene Methode, Kollodiumsäckchen, angefüllt mit Bakterienkulturen, in die Bauchhöhle

der Versuchstiere einzupflanzen, brachte BISANTI[1]) auf den Gedanken, auf diesem Wege eine Immunisierung gegen Geflügelcholera anzustreben. Zu den Versuchen wurden Kaninchen verwendet. In der einen Versuchsreihe brachte er die mit Geflügelcholerakulturen beschickten Kollodiumsäckchen in die Unterhaut der Flankengegend, in der anderen in die Bauchhöhle; die Säckchen verblieben bei der ersteren Reihe 12 Tage, bei der letzteren 10 Tage an der Impfstelle. Während dieser Zeit war das Befinden der Tiere nicht gestört. Den Kaninchen, welche der ersten Reihe angehörten, gab man nach 20, den der zweiten nach 15 Tagen die mit Geflügelcholerabazillen infizierte Nahrung, welche auch den Kontrolltieren gereicht wurde. Die Kontrolltiere gingen prompt zugrunde, die vorbehandelten dagegen blieben am Leben, widerstanden auch einer wiederholten schweren Infektion. BISANTI folgert hieraus, daß es möglich ist, auf diese Weise sehr empfängliche Tiere gegen Hühnercholera zu immunisieren, und zwar sei die intraperitoneale Methode zuverlässiger als die subkutane.

Ein praktischer Wert kann diesem Verfahren schon wegen der Umständlichkeit desselben nicht zugesprochen werden.

(Literatur siehe II. Band: Geflügelcholeraserum.)

XXVIII.

Die Methodik der Immunisierung gegen Schweineseuche-Bakterien.

Von

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. A. Wassermann

in Berlin.

Immunisierung mittels Antigen (Vaccin).

Die aktive Immunisierung gegenüber den von Löffler und Schütz entdeckten ovoiden Schweineseuchebakterien, den wichtigsten Vertretern der Klasse der hämorrhagischen Septikämien, war lange Zeit eines der meistumstrittenen Gebiete der Immunisierungstechnik. Während durch de Schweinitz[1]), Smith[2]) und Moore[3]), fernerhin von Silberschmidt[4]) und Lignières[5]) behauptet wurde, daß es möglich sei, Kaninchen und Meerschweinchen durch die Vorbehandlung mit abgetöteten Bakterien zu immunisieren, kamen Voges[6]), sowie Bruck[7]) und Beck und Koske[8]) u. a. m. (die ausführliche frühere Literatur siehe bei Joest, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann, Bd. IV) zu dem Schluß, daß es überhaupt nicht gelinge, Kaninchen und Meerschweinchen gegen Schweineseuchebakterien künstlich zu schützen. Ja, Voges ging soweit, zu erklären, daß es unmöglich sei, bei irgend einer Tierart Immunität gegenüber den ovoiden Schweineseuchebakterien zu erzielen. — Erst die neueren Untersuchungen lehrten uns, daß diese Ansicht zu weit ging, und die negativen Resultate der früheren Autoren ihre Ursache nicht sowohl in einer Eigenschaft der betreffenden Tierarten oder der Schweineseucheerreger als vielmehr in der verwendeten Immunisierungsmethodik hatten. — Wir sind heutzutage imstande, mit großer Sicherheit Kaninchen, Meerschweinchen, Pferde, Ziegen, Schafe, Hunde, Rinder, Esel gegen die Schweineseucheerreger aktiv zu immunisieren. — Bei Mäusen ist dies nach meinen persönlichen Erfahrungen allerdings auch heute noch schwierig, und gelingt nur bei äußerst langsamem und vorsichtigem Vorgehen und auch unter diesen Umständen nur mit starken Verlusten. Was nun die einzelnen oben aufgeführten Tierarten betrifft, so besteht ein großer Unterschied in der Schwierigkeit der aktiven Immunisierung, je nachdem es sich um Kaninchen und Meerschweinchen oder um größere Tiere, angefangen von Ziegen bis zu Pferden handelt. Am schwierigsten gestaltet sich die aktive Immunisierung der kleinen Laboratoriumstiere

Kaninchen und Meerschweinchen, abgesehen von Mäusen, und tatsächlich kenne ich nach meiner mehr als 10 jährigen Erfahrung auf diesem Gebiete nur in zwei in den letzten Jahren ausgearbeitete Immunisierungsmethoden, welche es gestatten, mit Sicherheit aktive Immunität bei diesen Tierarten zu erreichen. Und auch hierbei ist das Kaninchen noch weit empfindlicher als das Meerschweinchen, vorausgesetzt, daß es sich um die Injektion mit wirklich virulenten Schweineseucheerregern handelt, d. h. Kulturen, von denen $^1/_{1\,000\,000}$ bis $^1/_{100\,000}$ Normalöse einer 24 stündigen Agarkultur subkutan injiziert, ausreicht, um die Tiere akut an Septikämie zugrunde gehen zu lassen. Bei diesen beiden Tierarten gelingt es in der Tat nicht mit den gewöhnlichen Methoden, weder durch ganz allmähliche Zufuhr abgeschwächter lebender oder auf irgend welche Weise abgetöteter Schweineseuchebakterien, sei es subkutan, intravenös oder intraperitoneal auch nur einigermaßen zuverlässig einen Schutz gegenüber den Erregern der Schweineseuche zu erzielen. Dagegen ist dies möglich erstlich durch die Vorbehandlung mit den von Bail[8a]) angegebenen sterilisierten Exsudaten von an Schweineseucheinfektion zugrunde gegangenen Tieren (natürliche Aggressine) und zweitens mit den von Wassermann[9]) und Citron[10]) sowie Ostertag[11]) angegebenen Schweineseuchebakterienextrakten (künstliche Aggressine). Die Immunisierung größerer Tiere, besonders von Pferden, zwecks Serumgewinnung gelingt dagegen auch durch Immunisierung mit Vollbakterien, am besten, indem man die Tiere zuerst intravenös mit bei 60° abgetöteten und alsdann ganz langsam ansteigend mit lebenden vollvirulenten Schweineseuchebakterien intravenös vorbehandelt. Wir werden darauf noch weiter unten bei der Technik der Serumgewinnung im Großen zu sprechen kommen und wollen uns an dieser Stelle zunächst mit den beiden soeben genannten wichtigsten Methoden für die aktive Immunisierung gegenüber Schweineseuchebakterien beschäftigen.

Immunisierungsmethode mittels natürlicher Aggressine nach Bail.

Zwar hat weder Bail noch einer seiner Schüler mit Schweineseuche-Bakterien selbst gearbeitet, sondern Weil (Archiv für Hygiene 1905, Bd. LII) hat bei den, den Schweineseucheerregern äußerst nahestehenden Hühnercholerabazillen die Möglichkeit der Immunisierung kleiner Versuchstiere mittels der natürlichen Aggressine erwiesen. Citron (a. a. O.) hat alsdann in meinem Laboratorium die Gültigkeit des von Weil für Hühnercholera Gesagten auch für Schweineseuche bewiesen. Angesichts der erwähnten außerordentlich nahen Verwandtschaft zwischen dem Hühnercholera- und Schweineseucheerreger entspricht es indessen trotzdem nur der Gerechtigkeit, wenn wir diese Immunisierungsmethode mittels Exsudaten von an Schweineseuche verstorbenen Tieren als Methode von Bail und Weil bezeichnen. Die Technik für Laboratoriumsversuche ist dabei folgende:

Ein Kaninchen erhält eine intrapleurale oder intraperitoneale Injektion von 5 ccm Bouillon plus einige Tropfen 24 stündiger Schweineseuche Bouillonkultur. Die Kultur muß möglichst virulent sein, so daß das Tier am nächsten Tage sicher tot ist. Dann wird aus der entsprechenden infizierten serösen Höhle das Exsudat mittels Spritze oder Pipette steril entzogen. — Die Menge desselben kann schwanken. Bisweilen findet man kaum einen Kubikzentimeter in anderen Fällen bis zu

20 ccm und mehr einer, gewöhnlich hämorrhagisch gefärbten Flüssigkeit, in welcher mikroskopisch zahllose Schweineseuchebakterien nachzuweisen sind. Das Exsudat wird nun mit Phenol versetzt, so daß sein Gesamtgehalt an diesem Desinfektionsmittel $^1/_2$ % beträgt. Alsdann wird es scharf bis zur Klarheit zentrifugiert und durch drei Stunden bei 44° im Wasserbade erhitzt. Das Wasserbad muß dabei genau beobachtet werden. Die Temperatur soll nie über die angegebene Grenze steigen. Ist dies geschehen, so wird die Flüssigkeit auf Sterilität geprüft, indem Agar- und Bouillonkulturen davon angelegt werden. Erst wenn diese nach 48 Stunden bei 37° vollkommen steril geblieben sind, ist das Exsudat brauchbar.

Die Wirksamkeit eines solchen Exsudates zur Erzielung von aktiver Immunität läßt sich schon im vornhinein darnach beurteilen, ob das Exsudat imstande ist, bei Meerschweinchen die Infektiosität einer Dosis Schweineseuchenkultur zu steigern. Diese Eigenschaft nennt Bail Aggressivität. Dieser Versuch wird folgendermaßen angestellt: Man benutzt am besten hierzu eine mittelvirulente Schweineseuchekultur und bestimmt in einem Vorversuch diejenige Dose, welche ein Meerschweinchen von ca. 200 g bei subkutaner Injektion entweder überhaupt nicht mehr zu töten vermag oder höchstens chronisch innerhalb 8—14 Tagen an Schweineseucheinfektion zugrunde gehen läßt. Diese Dose schwankt natürlich je nach der verwendeten Kultur. Alsdann nimmt man vier gleich große Meerschweinchen, am besten im Gewicht von ca. 200—300 g zu den Versuchen. Meerschweinchen 1 bekommt alsdann die betreffende überhaupt nicht mehr oder höchstens chronisch tötende Dose der Schweineseuchekultur subkutan. Meerschweinchen 2 bekommt 2,5 ccm des sterilen Exsudates subkutan, Meerschweinchen 3 bekommt 1,5 ccm des sterilen Exsudates subkutan auf die eine Körperhälfte und etwa $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde später die betreffende an sich untertödliche Menge Schweineseuchebakterien subkutan auf die andere Körperhälfte. Meerschweinchen 4 wird ebenso behandelt wie 3, nur bekommt es statt 1,5 2,5 ccm des Exsudates unter die Haut. Wenn das Exsudat wirksam und gut brauchbar für die Immunisierung ist, so muß der Versuch so ausgehen, daß Meerschweinchen 1 und 2 am Leben bleiben bezw. Meerschweinchen 1 subakut stirbt, Meerschweinchen 3 und 4 müssen dagegen am nächsten Tage bereits sichtbar krank sein und in wenigen Tagen der Schweineseucheinfektion erliegen. Exsudate, von welchen größere Mengen, etwa 3 ccm erforderlich sind, um überhaupt eine Infektionsbeförderung zu zeigen, können zwar noch zur Immunisierung verwendet werden, indessen sind dann größere Mengen erforderlich und der Erfolg ist kein so zuverlässiger. Ist man nun im Besitze eines derart wirksamen Exsudates, so ist die Immunisierung damit bei Kaninchen und Meerschweinchen äußerst einfach. Es genügt alsdann schon eine einmalige Injektion des sterilisierten Exsudates, um Kaninchen und Meerschweinchen zu immunisieren. Die Dosen, die hierzu erforderlich sind, sind allerdings ziemlich beträchtlich. Kaninchen erhalten subkutan 4—6 ccm, Meerschweinchen 3—5 ccm, je nach der im Vorversuch ermittelten infektionserhöhenden Kraft. Noch sicherer und einfacher gestaltet sich die Erzielung der Immunität selbst bei den höchst empfindlichen Kaninchen, sowie besonders bei den für Schweineseuchebakterien weniger empfindlichen Meerschweinchen, wenn man nicht mittels einer einmaligen Injektion des Exsudates immunisiert, sondern diese wiederholt. Man gibt dann in ca. 10—12 tägigen Pausen je 1—2 ccm des Exsudates subkutan. Auf diese Art und Weise gelingt es zu sehr hohen Immunitäts-

graden zu gelangen, so daß die Tiere später das Tausend- und Millionenfache der tödlichen Dose lebender Kultur vertragen. Wichtig ist dabei, die Prüfung auf erreichte Immunität nicht zu früh nach der letzten immunisierenden Injektion folgen zu lassen; am bestens läßt man ca. 14 Tage verstreichen. Injiziert man die lebenden Schweineseucheerreger zu früh, etwa schon 4—5 Tage nach der letzten Injektion des Exsudates, so zeigt sich das Tier, worauf schon Bail bei anderen Infektionen aufmerksam machte, in seiner Resistenz sogar herabgesetzt. Das Verhalten ist demnach so, wie wir dies aus dem obigen Vorversuch bereits ersahen, daß sich zuerst an die Injektion des Exsudates eine Periode der herabgesetzten Widerstandsfähigkeit anschließt, und daß diese dann erst nach ungefähr 10—14 Tagen in einen Zustand der gesteigerten Resistenz, d. h. Immunität übergeht.

Methode der Immunisierung mit Schweineseuchebazillenextrakten nach A. Wassermann und Citron.

Die Impfstoffe nach Wassermann und Citron werden in folgender Weise bereitet: Kollesche Schalen oder sehr weite Reagenzgläser werden mit schwach alkalischem Agar gefüllt und mit Schweineseuche geimpft. Nach 24stündigem Wachstum bei 37° wird die Kulturmasse, am besten mit sterilem, normalem Kaninchenserum abgeschwemmt. Statt des Kaninchenserums kann man auch steriles destilliertes Wasser benutzen, indessen sind die mit Serum hergestellten Extrakte weniger giftig und wirksamer für die Erzielung der Immunität. Die Menge der Flüssigkeit, die man zum Abschwemmen braucht, ist von der Wachstumsstärke der Kulturen abhängig. Am besten nimmt man für eine gut gewachsene Kollesche Schale, deren Inhalt etwa 12 gewöhnlichen Agarkulturen in Reagenzgläsern entspricht, 10—12 ccm. Man erhält auf diese Weise eine trübe milchige Aufschwemmung, die man in einen Schüttelapparat bringt, und nun nach dem Vorgang von Brieger, Meyer und Bassenge[12]) gut gegen Licht geschützt bei gewöhnlicher Zimmertemperatur 1—2 Tage schüttelt. Die Bakterien dürfen während des Schüttelns weder durch Wärmeeinwirkung noch durch Zusatz eines Desinfektionsmittels abgetötet werden. Ist ein Schüttelapparat nicht zur Verfügung, so genügt auch einfaches Stehen und Extrahierenlassen unter öfterem Umschütteln am Tage mit der Hand. Nach beendigtem Extraktionsprozeß werden diese Extrakte genau so behandelt, wie es vorstehend für die Exsudate angegeben wurde, d. h. sie werden bis zu einem Gehalt von 0,5 % mit Karbol versetzt, scharf zentrifugiert und durch 3 Stunden bei 44° im Wasserbade erhitzt. Endlich werden sie in analoger Weise, wie dies oben beschrieben wurde, durch Verimpfen auf Agar und Bouillon bezüglich der Sterilität geprüft. Stellt sich dann heraus, daß sie noch nicht völlig steril sind, so kann man sie entweder noch einige Tage unter dem Einfluß des Karbols lassen, oder in das Gefäß einige Tropfen Chloroform geben. Das Gefäß ist alsdann mit einer Gummikappe luftdicht zu verschließen, um das Entweichen der Chloroformdämpfe zu verhindern. Durch die kombinierte Wirkung des Karbols und Chloroforms erzielt man dann in sicherster Weise eine vollkommene Sterilisierung.

Diese serösen oder wäßrigen Schweineseuchebakterienextrakte nach Wassermann und Citron zeigen nun genau die gleichen Eigenschaften, wie es oben von den Exsudaten beschrieben worden ist, d. h. sie wirken infektionserhöhend, wenn sie geichzeitig mit lebenden Schweineseuchebakterien den Tieren injiziert werden und zweitens, sie wirken immuni-

tätsauslösend, wenn sie für sich allein den Tieren einverleibt werden. In letzterem Falle tritt auch hier die Immunität erst 12—14 Tage nach der letzten Injektion ein. Die Mengen, welche zur Erzielung der Immunität bei Kaninchen und Meerschweinchen von diesen Bakterienextrakten verwendet werden müssen, richten sich nach dem Gehalt derselben an wirksamen Substanzen, im wesentlichen also nach der Dichte der ursprünglichen Bakterienaufschwemmung. Wir kamen bei unseren Versuchen bei Kaninchen mit 2—4 ccm bei einmaliger subkutaner Injektion zu einer sicheren Immunität. Es empfiehlt sich indessen in einem Vorversuch stets die Menge des Extraktes, welche von dem betreffenden Versuchstier, Kaninchen oder Meerschweinchen, ohne Gefahr vertragen wird, auszuprobieren, da in den Extrakten immerhin beträchtliche Mengen von Endotoxinen gelöst sind und manche von ihnen deshalb doch so toxisch sind, daß eine Dosis von 3—4 ccm ein Kaninchen oder Meerschweinchen bereits tötet. In dieser Hinsicht sind die mit destilliertem Wasser hergestellten Extrakte fast stets toxischer als die mit normalem Kaninchenserum gemachten. Man muß alsdann zu Immunisierungszwecken natürlich stets eine Dosis wählen, die unterhalb der toxischen sich befindet. Auf diese Art und Weise gelingt es aber mit Sicherheit, jedes Kaninchen und jedes Meerschweinchen gegen Schweineseuche, und wie die im Laboratorium von Wassermann angestellten Versuche von Citron und Pütz[13]) ergaben, auch gegen die so nahestehende Hühnercholera zu immunisieren. Es stellt demnach dieses Verfahren die einfachste und billigste Methode der Immunisierung gegenüber den Erregern der hämorrhagischen Septikämien, besonders der Schweineseuche dar.

Bereits oben haben wir erwähnt, daß die Immunisierung größerer Tiere gegen Schweineseuche weit einfacher gelingt. Wenngleich auch bei ihnen, wenigstens zur Erreichung einer Grundimmunität, die Anwendung der soeben beschriebenen Bakterienextrakte nach Wassermann und Citron das einfachste und sicherste Verfahren darstellt, wobei man die geringsten Verluste haben wird, so gelingt es doch auch unschwer, größere Tiere, wie Rinder und Pferde, von vornherein durch Anwendung von Vollkulturen zu immunisieren, ein Verfahren, das, wie gesagt, bei den kleinen Laboratoriumstieren fast stets im Stiche läßt. So wurden zwecks Serumgewinnung bis zur Ausarbeitung der Wassermann-Citronschen Methode die Pferde gegen Schweineseuche stets so immunisiert, daß man ihnen zuerst, beginnend mit $^1/_{100}$ Öse allmählich aufsteigend bis 1 Öse bei 60° abgetötete Schweineseucheerreger intravenös verabreichte. Wenn auf diese Weise alsdann ein geringer Grad von Immunität erzielt ist, wird zu lebenden Kulturen übergegangen, indem man je nach der Virulenz der Kultur mit einer ganz kleinen Dose, vielleicht $^1/_{10000}$ Öse, intravenös beginnt und nun ganz allmählich ansteigt. Höher wie 2—4 Ösen einer höchst virulenten Schweinseuchekultur ist es fast nie möglich und auch nicht nötig, anzusteigen. Bedingung ist indessen dabei, die Injektion stets intravenös zu machen. Eine subkutane Vorbehandlung mit Schweineseuchevollbakterien ist nicht möglich, weil an der Infektionsstelle sofort sehr harte Infiltrate entstehen, die sogar häufig in Nekrose übergehen und verhindern, daß die injizierten Bakterien zur Resorption und Immunitätsauslösung gelangen. Wie gesagt, ist es indessen heute auch bei größeren Tieren vorzuziehen, statt der abgetöteten Vollbakterien zuerst die keimfreien Exstrakte nach Wassermann und Citron den Tieren intravenös zu injizieren, auf diese Weise gefahrlos und sicher eine Grundimmunität zu erzielen und alsdann erst zu lebendem Material überzugehen; denn

die größte Gefahr besteht für die Pferde immer bei dem Übergang von abgetöteten zu lebenden Bakterien, da alle Tierarten gleichmäßig für virulente Schweineseucheerreger selbst in den kleinsten Quantitäten ungemein empfindlich sind.

Im Handel kommen eine große Reihe von Bakterienpräparaten vor, die angeblich zur praktischen Verwendung an Schweinen bestimmt, gegen Schweineseuche aktiv immunisieren sollen. Teilweise sind dieselben überhaupt nicht mit den Löffler-Schützschen ovoiden Schweineseuchebakterien hergestellt, wie beispielsweise das von Enoch & Rüete in Hamburg in den Vertrieb gebrachte Euman. Das Euman ist ein Bakterienpräparat, das aus dem von Grips und Glage bei Eiterungen der Haustiere gewonnenen sogenannten Bacillus pyogenes suis hergestellt ist. Es hat natürlich gegen die Infektion mit dem hier in Rede stehenden Schweineseuchebazillus absolut keine schützende Wirkung. Andere Präparate, wie beispielsweise das von der Firma Merck in den Handel gebrachte Suptol stellt, soweit man beurteilen kann, ein nach Art der Wassermann-Citronschen Extrakte hergestelltes Präparat dar. Seine Herstellung wird von der Fabrik geheim gehalten. Nähere Erfahrungen liegen darüber nicht vor. Irgend welche Beachtung verdienen alle diese Präparate nicht, da es, wie gesagt, für jedermann, der bakteriologisch arbeiten kann, leicht ist, sich nach den hier gemachten Angaben jederzeit ein durchaus in jedem Falle zuverlässiges Vaccin gegen die ovoiden Schweineseucheerreger herzustellen.

XXIX.

Tuberkulosevaccin.

Von

Professor Dr. Paul H. Römer

in Marburg.

Unter „Vaccin“ versteht man zunächst ganz allgemein ein Mittel, das geeignet ist, gegenüber den verderblichen Wirkungen eines Infektionsstoffes Schutz zu verleihen. Jedoch bedarf diese Definition einer Einschränkung; denn wir sind nicht gewöhnt, den Gebrauch z. B. des Chinins zum Zweck des Malariaschutzes oder die prophylaktische Anwendung von Quecksilberpräparaten gegen die Syphilis als Vaccination zu bezeichnen. Wir beschränken den Begriff Vaccin in der Regel auf prophylaktisch wirksame Stoffe, die dem betreffenden Infektionsstoff oder dem in ihm wirksamen krankmachenden Prinzip gleich oder ähnlich sind. Im allgemeinen deckt sich also der Begriff der Vaccination ungefähr mit dem, was EHRLICH als „aktive Immunisierung“ bezeichnet.

Wörtlich bedeutet der Name Vaccin einen vom Rinde (vacca) stammenden Stoff und unter „Vaccine“ versteht man die durch Kuhpockenvirus erzeugte Erkrankung, deren Überstehen Immunität gegen die Variola zur Folge hat. Nachdem PASTEUR sodann uns weitere spezifische Schutzmittel kennen gelehrt hatte, bestehend in Impfstoffen, die nicht die Natur, sondern die Hand des Experimentators willkürlich schafft, haben wir uns allmählich daran gewöhnt, jeden zur Schutzimpfung gegen eine Infektionskrankheit geeigneten, für das betr. Versuchsindividuum also abgeschwächten Infektionserreger als Vaccin zu bezeichnen, unbekümmert um den eigentlichen Wortsinn. Neuerdings scheint man dazu zu neigen, den Begriff Vaccin noch weiter auf jedes spezifisch wirksame, auch unbelebte Mittel auszudehnen, das sich prophylaktisch wirksam erweist.

In den nachfolgenden Besprechungen über Tuberkulose-Vaccins werden wir uns aber beschränken auf eine Erörterung nur derjenigen Vaccins, die im Sinne PASTEURS als solche zu bezeichnen wären, also auf die Besprechung der Schutzimpfung mit Hilfe natürlich schwach virulenter oder künstlich abgeschwächter, den Tuberkelbazillen gleicher oder ähnlicher lebender Mikroorganismen. Diese Beschränkung ist umsomehr gerechtfertigt, als bisher noch keine Tierexperi-

mente veröffentlicht sind, die eindeutige und zweifellose Immunisierungserfolge mittels nicht lebender Produkte des Tuberkelbazillus darstellen. Die tierexperimentellen Untersuchungen über den immunisierenden Erfolg des Kochschen Alt- und Neu-Tuberkulins konnten bisher nicht zu eindeutig-positiven Ergebnissen kommen und die übrigen vielfach gepriesenen Schutz- und Heilmittel lebloser Art gegen die Tuberkuloseinfektion sind fast ausschließlich am Krankenbett geprüft, unter Umständen also, wo der betr. Autor die Versuchsbedingungen nicht beherrschte.

Geschichtliches über Tuberkulosevaccins.

Die bei den verschiedenen Tierarten spontan vorkommenden Tuberkuloseinfektionen sind durch Bazillen veranlaßt, die nicht in allen Eigenschaften genau übereinstimmen und selbst bei ein und derselben Tierart, ja selbst bei ein und demselben Individuum kann man Tuberkelbazillen finden, die bemerkenswerte Differenzen aufweisen.

Erkannt wurden solche Unterschiede zuerst, als es sich zeigte, daß die Beschreibung der Tuberkelbazillen hinsichtlich ihres mikroskopischen Aussehens und kulturellen Verhaltens seitens einiger französischer Autoren ein ganz anderes Bild lieferte als die klassische Darstellung Kochs. Der Sache auf den Grund gehend fand man, daß in den französischen Laboratorien mit Tuberkelbazillenstämmen herrührend von Hühnern gearbeitet wurde, in Deutschland dagegen die Säugetiertuberkelbazillen studiert wurden. Besonders auffallend war vor allem die Differenz im krankmachenden Verhalten der von Hühnern einerseits und Säugetieren anderseits stammenden Tuberkelbazillen, insofern als erstere bei den gebräuchlichen kleinen Laboratoriumstieren, wie Meerschweinen und Kaninchen, in der Regel mildere Krankheitsprozesse auslösten als die Säugetiertuberkelbazillen.

Da es sich überdies zeigte, daß die künstliche Veränderung der Virulenz eines Tuberkelbazillenstammes nicht leicht gelang (Martin[67]), Héricourt et Richet[44]), Cavagnis[19])), daß es also nicht ohne weiteres möglich war, einen für eine bestimmte Tierart virulenten Tuberkelbazillenstamm in ein Vaccin umzuwandeln, war es erklärlich, daß man zunächst an die natürlich vorkommenden für die betr. Tierart wenig virulenten Tuberkelbazillen sich hielt, um Immunisierungsversuche anzustellen.

So versuchten Grancher und Ledoux-Lebard[39—40]), sowie Grancher und Martin[41—43]) Kaninchen mit Hilfe intravenöser Einspritzungen von Hühner-Tb. zu immunisieren; ebenso verfuhren Courmont und Dor[21—22]), die auf die gleiche Weise durch allmählich steigende Dosen systematisch Kaninchen zu immunisieren sich bestrebten. Da jedoch frische Hühner-Tb.-Kulturen sich nicht als ganz unschädlich für Kaninchen erwiesen, versuchten Grancher und Martin zuerst mit älteren, nach ihrer Meinung infolge der Aufbewahrung abgeschwächten Hühner-Tb. eine gewisse Grundimmunität zu schaffen, um dann erst allmählich zu frischeren Kulturen überzugehen. Trudeau[95]) will durch intravenöse Injektionen von Hühner-Tb. Kaninchen sogar gegen eine intraoculäre Infektion mit virulentem Tuberkelserum geschützt haben. In ähnlicher Weise wie die zuerst genannten Autoren versuchten Héricourt und Richet[45—47]), sowie Babes[1]) Hunde, Richet[79—81]) auch Affen mit den gleichen Tb.-Stämmen auf intravenösem Wege zu immunisieren. Auch die Experi-

mente Patersons[76]), der allerdings nur mit abgetöteten Hühner-Tb. arbeitete, gehören hierher. —

Zusammenfassend kann man über das Ergebnis aller dieser Experimente wohl sagen, daß ihre Erfolge recht zweifelhaft sind, sicherlich höchstens Ausnahmefälle darstellen. Denn von vielen Untersuchern sind seitdem Immunisierungsversuche bei den genannten Tierarten mit Hilfe derselben Methoden gemacht worden, ohne daß positive Ergebnisse erzielt wurden und der beste Beweis dafür, daß die anfänglich vermuteten Erfolge nur scheinbare waren oder einer anderen Deutung zugänglich sind, dürfte wohl darin zu suchen sein, daß die genannten Autoren selbst später nichts mehr über weitere erfolgreiche Immunisierungen berichtet haben.

Immunisierungs-Versuche mit Fisch-Tuberkulose-Bazillen schlugen Terre[92]) fehl.

Auch mit Tb. ähnlichen, säurefesten Bakterien sind Immunisierungsversuche angestellt worden, so von Moeller[71, 72]), der Meerschweine und Kaninchen auf subkutanem und intravenösem Wege zu immunisieren suchte. Er konnte aber nur einen hemmenden Einfluß auf die Entwicklung der Tuberkulose feststellen, keinen wirklichen Schutz. Das Ergebnis des Selbstversuches Moellers, darin bestehend, daß er sich selbst zuerst Blindschleichentuberkelbazillen und später virulente Tuberkelbazillen menschlicher Herkunft intravenös injizierte, ohne daß sich ernstere Folgen dieser letzten Infektion bemerkbar machten, ist so vielfachen Deutungen zugänglich, daß dieser Versuch keine Grundlage für eine wissenschaftliche Kritik abgeben kann. Es sei nur daran erinnert, daß ein wirklicher Kontrollversuch fehlt; denn man kann ein Meerschweinexperiment doch nicht als exakten Kontrollversuch in diesem Falle ansehen.

Ähnliche zweifelhafte Ergebnisse bei der Immunisierung von Meerschweinen mit Hilfe säurefester Bakterien hatte Klemperer[51]), der durch subkutane und intraperitoneale Injektion dieser Kulturen nur einen gewissen abschwächenden Einfluß auf eine nachfolgende experimentelle Tuberkuloseinfektion feststellen konnte. Ganz negative Ergebnisse bei dem Versuch einer Meerschweinimmunisierung mit Hilfe eines angeblich durch Froschpassage abgeschwächten Säugetiertuberkulosestammes hatte Dieudonné[24]). Auch Koch, Schütz, Neufeld und Miessner[58]) scheinen mit Thimoteebazillen, Pseudoperlsuchtbazillen, Blindschleichentuberkelbazillen bei Ziegen und Meerschweinen kein großes Glück gehabt zu haben. Bemerkenswert ist, daß sie geradezu schädliche Nebenwirkungen dieser Bakterien feststellen konnten.

Ein besonders gut geeignetes „natürliches" Vaccin gegen die Säugetiertuberkulose will Friedmann[29–38]) in seinem Schildkrötentuberkelbazillus gefunden haben, den er als einen wundersam mitigierten Säugetiertuberkelbazillus ansieht. Seine Erfolge werden aber von Libbertz und Ruppel[62]) direkt bestritten; auch ist über praktische Erfolge mit diesem Vaccin bisher nichts bekannt geworden. Da außerdem — soweit Verf. unterrichtet ist — die Kultur Friedmanns sonst anscheinend niemandem zugänglich gemacht wurde, ist es auch unmöglich über ihren Wert als Immunisierungsmittel ein Urteil abzugeben.

Öfters zitiert als erster Beweis für die Möglichkeit einer künstlichen Immunisierung von Rindern gegen die Tuberkulose mit Hilfe lebender Tuberkelbazillen wurden die Experimente M'Fadyeans[69]). Es verlohnt sich wohl deshalb auf dieselben genauer einzugehen.

Einem durch die Tuberkulinprobe als bereits tuberkulös erkannten Rinde spritzte M'Fadyean wiederholt steigende Mengen Tuberkulin ein und injizierte ihm schließlich zusammen mit zwei nicht vorbehandelten Kontrolrindern die Gekrösdrüse eines tuberkulösen Pferdes in die Blutbahn. Nach 2—3 Monaten wurden die drei Rinder getötet. Bei dem mit Tuberkulin vorbehandelten Rind fand sich nur eine verkalkte Mesenterialdrüse; alle übrigen Organe waren tuberkulosefrei. Die Kontrollrinder hatten ausgedehnte Lungentuberkulose. In diesem Falle hat also nur Behandlung mit Tuberkulin stattgefunden, keine immunisierende Behandlung mit lebenden Tuberkelbazillen.

Ein zweites, ebenfalls durch die Tuberkulinprobe als spontan tuberkulös erkanntes Rind behandelte M'Fadyean wiederum zunächst mit Tuberkulin. Dann erhielt es zusammen mit einem Kontrollrind intravenös die Emulsion einer tuberkulösen Kaninchenleber. Das nach sieben Wochen in schwer krankem Zustand getötete Kontrolltier hatte ausgedehnte Miliartuberkulose, während das vorbehandelte Rind gesund blieb. Auch in diesem Falle hat also nur eine Behandlung mit Tuberkulin stattgefunden.

Das vorbehandelte Rind wurde dann weiter wiederholt mit Tuberkulin injiziert; ferner erhielt es tuberkulöse Organe eines Kaninchens und eines Pferdes in die Venen und weiterhin noch viermal Reinkulturen von Tuberkelbazillen, deren Provenienz nicht angegeben ist, in die Blutbahn. Zwei Jahre nach der ersten Infektion mit virulenten Rindertuberkelbazillen starb das Tier mit ziemlich ausgedehnter Tuberkulose. Zu den letzten Versuchen fehlen Kontrollen. Man kann also aus denselben nicht im mindesten einen Erfolg einer immunisierenden Behandlung mit lebenden Bazillen erkennen, zumal das Tier so verschieden artig behandelt wurde.

Zwei weitere nicht auf Tuberkulin reagierende Rinder erhielten eine Emulsion der Leber eines tuberkulösen Huhns intravenös. Dann wurden sie mehrfach mit Tuberkulin behandelt; erhielten sodann 3—4 mal Organe mit Rindertuberkelbazillen und noch 3—4 mal Reinkulturen von Tuberkelbazillen ungenannter Provenienz intravenös. Sie starben nach zwei Jahren und hatten eine nur mäßig ausgedehnte Tuberkulose. Ob in diesen Fällen überhaupt eine Immunität erzielt wurde, läßt sich unmöglich entscheiden, da jeglicher Kontrollversuch fehlt.

Tatsächlich hat also M'Fadyean nur in den beiden erstgenannten Fällen eine gewisse Immunität nachgewiesen. Gerade bei diesen beiden Tieren aber hat überhaupt keine immunisierende Behandlung mit lebenden Tb. stattgefunden. Auch glaube ich, daß die Tuberkulinbehandlung in diesen Fällen keinen wesentlichen Einfluß auf die nachfolgende virulente Infektion gehabt hat, sondern daß die Ursache der Immunität in der schwachen Spontaninfektion dieser beiden Rinder zu suchen ist. Von diesem Gesichtspunkte aus betrachtet — und nur von diesem aus — kommt den Experimenten M'Fadyeans allerdings Bedeutung zu; sie liegt also in anderer Richtung, als dies u. a. Neufeld[93]) anzunehmen scheint. Auf die Frage der Immunität infolge Spontaninfektion komme ich am Schlusse dieser Besprechung noch zurück.

Über erfolgreiche Immunisierung kleiner Versuchstiere und zwar der so sehr tuberkuloseempfänglichen Meerschweine hat Levy[60, 61]) berichtet. Durch Behandeln von Tuberkelbazillen mit 80% Glyzerin bei einer Temperatur von 37° hat Levy nach seinen Angaben ein Vaccin

erzeugt, das sich für Meerschweine als unschädlich erwies, wenn die Behandlung derselben mit Tb. begonnen wurde, die sechs Tage mit Glyzerin behandelt waren, und wenn man dann erst allmählich zu fünf Tage lang, vier Tage und drei Tage hindurch mit Glyzerin abgeschwächten Tb. überging. Nach einer Immunitätsprüfung dieser Meerschweine mit virulenten Kulturen blieben sie gesund, während die Kontrollen an ausgedehnter Tuberkulose erkrankten. Um sehr virulente Kontrollinfektionen hat es sich allerdings anscheinend nicht gehandelt, da ein Kontrolltier erst nach 13 Wochen starb, das andere nach dieser Zeit getötet wurde. Das Immunisierungsverfahren mit durch Glyzerin abgeschwächter Tb. hat Levy dann auch auf Kälber angewandt. Die Abschwächung der Kulturen soll nach Levy vererbbar sein auf die zweite Generation. In ähnlicher Weise abschwächend auf Tb. wie Glyzerin sollen auch 50 % Traubenzucker und 25 % Galaktose wirken, wenn die Tb. mit diesen Substanzen bei 37° geschüttelt werden. Einer Mitteilung von Baumann[3]) zufolge bewirkt die Behandlung von Meerschweinen nach dem Verfahren von Levy nur eine Verzögerung des Todeseintritts, keine eigentliche Immunität.

Die soeben genannten Versuche Levys sowohl, als auch die weiter oben erwähnten Experimente Moellers, Klemperers und Friedmanns folgen zeitlich der ersten Mitteilung v. Behrings[6]) über gelungene Schutzimpfungen von Rindern gegen die Tuberkulose nach. Diese Mitteilung erfolgte am 12. Dezember 1901 in einem Vortrag, den v. Behring als Empfänger des Nobelpreises zu Stockholm hielt. Das damals mitgeteilte Immunisierungsverfahren bestand in der intravenösen Einverleibung lebender Tuberkelbazillen menschlicher Herkunft.

Dieses zuerst durch von Behring für die Rinderimmunisierung bekannt gegebene Prinzip ist inzwischen durch eine größere Zahl sachverständiger Forscher als richtig anerkannt, die Brauchbarkeit der Immunisierungsmethode bestätigt, der Wert des Immunisierungsmittels erprobt worden.

v. Behring ist der Entdecker der spezifischen Rindertuberkuloseschutzimpfung.

Auf einen Punkt sei hier noch etwas eindringlicher hingewiesen. In seiner ersten Publikation über Tuberkulose-Immunisierung vertritt Neufeld[73]) die Ansicht, der Gedanke an die Möglichkeit einer Immunisierung von Rindern gegen die Tuberkulose hätte erst aufkommen können, nachdem Koch die Verschiedenheit zwischen den vom Menschen und den vom Rinde stammenden Tb. nachgewiesen hätte; die gleiche Auffassung vertritt auch Schütz[89a]). Ganz abgesehen davon, daß v. Behring, wie Verfasser[84]) mitgeteilt hat, schon lange vor den Kochschen Experimenten Rinderimmunisierungsversuche mit lebenden Tb. menschlicher Herkunft gemacht hat, muß obige Meinung Neufelds, Schützs u. a. um so mehr überraschen als gerade in dem Nachweis der Immunisierungsmöglichkeit mittels Menschen-Tb. gegen Rinder-Tb. durch von Behring die gesamte übrige wissenschaftliche Welt einen Beweis gegen die Richtigkeit der Kochschen Annahme erblickte. In der Tat ermutigte die Art der Londoner Mitteilung Kochs über die Nicht-Identität der menschlichen und der Rindertuberkulose am allerwenigsten dazu, den Erreger der einen Krankheit gegen den Parasiten einer anderen mit ihr „nicht identischen“ anzuwenden. Kolle[59]) meint allerdings, daß die Anwendung von Menschen-Tb. zum Zweck der Rinderimmunisierung auf Grund der Mitteilungen Kochs etwas war, „was jeder Immunisator tun mußte“.

Wenn in der Tat die Verwirklichung der Rindertuberkuloseschutzimpfung nur eine selbstverständliche logische Konsequenz der KOCHschen Lehre gewesen wäre, wie KOLLE annimmt, dann muß es ein unerklärliches Phänomen bleiben, daß nicht alle Bakteriologen die Gelegenheit wahrnehmen, sich den unverwelklichen Lorbeer zu sichern, als erste erfolgreiche Immunisierungen gegen die Tuberkulose im Tierversuch verwirklicht zu haben. Übrigens ist dieser Ausspruch KOLLES nicht sehr schmeichelhaft für Forscher wie SMITH[90]) die bereits vor KOCH den Unterschied zwischen den vom Menschen und den vom Rinde stammenden Tb. erkannt hatten.

Der Wert der KOCH schen Feststellungen von der in der Regel feststellbaren Differenz zwischen Menschen-Tb. und Rinder-Tb. wird hierdurch nicht berührt; denn zumal für die Immunisierungsfrage waren dieselben, wie gerade VON BEHRING stets hervorgehoben hat, deshalb so bedeutungsvoll, weil sie es ermöglichten, auf experimentellem Wege die Brauchbarkeit der Marburger Immunisierungsmethode bei Rindern zu demonstrieren.

Experimentelle Begründung der Rindertuberkulose-Schutzimpfung.

Der summarischen Mitteilung VON BEHRINGS in Stockholm folgte im März 1902 die eingehende Publikation von VON BEHRING, RÖMER und RUPPEL[18]). In derselben wurde nachgewiesen, daß es mit Hilfe lebender Tb. menschlicher Herkunft möglich ist, Rinder gegen künstliche schwere Infektionen soweit zu schützen, daß sie dieselben ohne wesentliche Schädigung der Gesundheit vertragen oder mit Affektionen davonkommen, die im Vergleich zu den rasch letal verlaufenden Infektionen bei den Kontrollrindern als sehr gering bezeichnet werden müssen.

Die Tatsache, daß manche der immunisierten und auf ihre Immunität mit großen Dosen virulenter Tb. geprüften Rinder nicht ganz ohne Herderkrankungen davonkamen, hat manchen Skeptikern Anlaß zu Zweifeln über den Wert des Immunisierungsprinzips gegeben. Solchen Betrachtungen gegenüber dürfte angebracht sein, was Verf. an anderer Stelle ausführte:

„Gegenüber solchen Einwänden scheint es notwendig zu sein, erst über den Begriff der Immunität zu sprechen. Ich knüpfe an bekannte Beispiele aus der Immunisierungspraxis an. Wenn wir ein Pferd zum Zweck der Heilserumgewinnung einer immunisierenden Behandlung mit steigenden Dosen Diphtheriegift in der gewöhnlichen Weise unterwerfen und die Immunisierung so weit gefördert haben, daß das Versuchstier das Zehnfache der einfach tödlichen Dosis verträgt, so wird es trotzdem an typischer Diphtherie zugrunde gehen, wenn wir als nächste Dosis die 100fach tödliche Minimaldosis wählen. Haben wir nun, weil das Tier an der 100fach tödlichen Dosis zugrunde ging, deshalb das Recht, es als nichtimmunisiert zu bezeichnen?

Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Tetanus. Es gelingt durch vorsichtige Giftbehandlung Kaninchen derart gegen Tetanus zu immunisieren, daß sie mit den größten Dosen unserer wirksamsten Tetanusgifte nicht mehr krank gemacht werden können. Hier muß also der größte Skeptiker hohe Immunität zugeben und doch gelingt es, wie HANS MEYER und RANSOM[68]) gezeigt haben, auch diese hochimmunen Tiere tetanus-

krank zu machen, wenn man ihnen das Gift in einen motorischen Nerven einspritzt. Die Tiere erweisen sich bei diesem Vergiftungsmodus kaum widerstandsfähiger, als nicht vorbehandelte Kontrolltiere.

Die von Jenner eingeführte Vaccination hat die Pocken in den Ländern, in denen sie planmäßig durchgeführt wird, zu einer fast unbekannt gewordenen Krankheit gemacht. Doch können wir immer wieder die Beobachtung machen, daß mit Erfolg schutzgeimpfte Individuen in Pockenländern gelegentlich an Variola erkranken. Es erscheint mir auch durchaus nicht außerhalb des Bereichs der Wahrscheinlichkeit zu liegen, daß man experimentell die Verhältnisse so gestalten könnte, daß ein mit Erfolg Vaccinierter gegenüber einer künstlichen schweren Infektion sich nicht anders verhält, wie ein nicht vorbehandelter Mensch. Jedenfalls dürfte die experimentelle Prüfung eines Vaccinierten mittelst virulenten Variolavirus ziemlich riskant sein und ich möchte das Risiko eines solchen Versuches am Menschen nicht übernehmen.

Kurz — man muß bei allen Immunitätsstudien sich darüber klar sein, daß die Immunität nie eine absolute, stets eine relative ist. Selbst bei hochimmunen Individuen, deren Immunität mit den zur Verfügung stehenden Hilfsmitteln nicht zu brechen ist, muß man zugeben, daß durch die Anwendung besonderer Infektionsmethoden — ich erinnere an das genannte Tetanusbeispiel — nach Auffindung besonders wirksamer Kulturstämme oder Gewinnung hervorragend giftiger Präparate die Immunität versagen kann.

Diese Verhältnisse lassen sich ungezwungen auch auf die Tuberkuloseschutzimpfung übertragen. Die Höhe der erzeugten Immunität ist je nach der Art des Immunisierungsprozesses, wobei neben der Dosierung vor allem die Virulenz des benutzten Kulturstammes eine Rolle spielt, ferner je nach der Länge des zwischen der letzten immunisierenden und der zum Zweck der Immunitätsprüfung erfolgten Infektion liegenden Zeitabschnittes, sowie aus einer Reihe anderer Umstände sehr verschieden bei den einzelnen Tieren, so daß zumal bei Anwendung großer Dosen sehr virulenter Kulturen bei der Prüfung auf Immunität das eine Tier sich sehr widerstandsfähig erweist, wo das andere kaum Unterschiede gegenüber dem Kontrolltier erkennen läßt. Die zur Prüfung der Immunität benutzte Infektionsmethode ist hier von großer Bedeutung; ich erinnere an das angeführte Beispiel des diphtherie-immunisierten Pferdes, dessen Immunität bei Anwendung einer zu hohen Prüfungsdosis ungenügend sein kann. Bei der Tuberkulose liegen für die Beurteilung des Immunitätsgrades die Verhältnisse deshalb noch besonders kompliziert, weil wir nicht, wie z. B. bei der Diphtherieimmunisierung in dem Antitoxingehalt des Blutserums, entscheidende Anhaltspunkte für die Beurteilung der Höhe der erzeugten Immunität haben. Daß bei geeignetem Vorgehen zum Zweck der Immunisierung und glücklicher Wahl der zur Immunitätsprüfung benutzten virulenten Tuberkelbazillen eine Immunität in dem Sinne erwiesen werden kann, daß das immunisierte Tier nicht die geringsten Herderkrankungen davon trägt in Fällen, wo nicht immunisierte Kontrolltiere an Tuberkulose sterben, ist durch experimentelle Erfahrungen genügend erwiesen*)."

---

*) Vorstehende Zeilen dürften auch gegenüber der von Moussu an der bovovaccinatorischen Rinderimpfung geübten Kritik, die nach Drucklegung dieser Arbeit in der „Semaine médicale" erschienen ist, Geltung haben. Im übrigen verweist Verf. auf die Zurückweisung, die Moussus Kritik durch v. Behring erfahren hat. (Siehe Behringwerk-Mitteilungen, Heft 2.)

Da trotz der in unseren ersten Experimenten bei der Immunitätsprüfungen angewandten sehr schweren Kontrollinfektionen zweifellos eine Immunität bei den vorbehandelten Rindern nachgewiesen werden konnte, erwuchs uns nicht nur das Recht, sondern auch die Pflicht das gleiche Immunisierungsprinzip in der Praxis, also gegenüber natürlichen Infektionsbedingungen zu erproben. Zu diesem Zweck verwandten wir anfangs 4—6 Wochen alte Serumkulturen unseres vom Menschen herrührenden, seit langen Jahren schon genau studierten Tb.-Stammes Nr. 1. Dieselben wurden zunächst in der Dosis von 0,001 g und 4 Wochen später in der Dosis von 0,025 g gesunden Rindern intravenös injiziert. Diese Impfstoffe, bestehend aus frischen Serumkulturen, wurden später durch im Vakuum getrocknete, auf Bouillon gewachsene Tb. der gleichen Kultur ersetzt. Auf die Gründe dieser Änderung der Impfmethode kommen wir später zurück. Von diesen Vakuum-Tb. werden als Erstdosis 0,004 g, als zweite Dosis 0,02 g den Rindern intravenös einverleibt. Über weitere experimentelle Erfahrungen mit dieser Schutzimpfungsmethode und über Beobachtungen bei Übertragung derselben in die Praxis haben sodann in zahlreichen Publikationen v. Behring [7—17]) und Römer [82—88]) berichtet.

Ergänzungen fanden die Marburger Versuche durch die Untersuchungen von Lorenz [63]), Schlegel [89]) und Eber [25—26]), die an in Marburg immunisierten Rindern experimentierten. Es handelte sich hier aber um atypisch immunisierte Tiere; es sollten eben diese Experimente lediglich dazu dienen, die Richtigkeit des Immunisierungs-Prinzips unparteiisch zu kontrollieren. Die Richtigkeit des Prinzipes wurde von allen anerkannt, wenn auch eine Entscheidung über den praktischen Wert der Marburger Impfmethode diesen Autoren unmöglich war, da sie keine typisch schutzgeimpften Tiere und überdies Rinder im Versuch hatten, bei denen teilweise die erste immunisierende Infektion mit einem Tb.-Stamm ausgeführt war, der Herde im Körper zurücklassen mußte.

Instruktiver, was den Wert der Marburger Impf-Methode betrifft, sind die Experimente Hutyras [48]). Er impfte genau nach der Behringschen Methode und mit von Marburg aus ihm zugesandten Vaccins. Er prüfte zunächst auf intravenösem und subkutanem Wege mit Hilfe rindvirulenter Kulturen die schutzgeimpften Tiere auf ihre Immunität zusammen mit Kontrolltieren: „Diese Versuche haben somit das übereinstimmende Resultat ergeben, daß durch die Behringsche Schutzimpfung die Widerstandsfähigkeit junger Rinder gegenüber einer schweren künstlichen Infektion sehr bedeutend erhöht wird. Die intravenöse Injektion einer für Rinder sehr virulenten Tb.-Kultur in mehrfach tödlicher Dosis hat ausschließlich in den vom infizierten Blutstrom direkt betroffenen Lungen die Entwicklung von spärlichen tuberkulösen Herden hervorgerufen, während dieselbe Virusmenge subkutan injiziert an der Injektionsstelle lokalisiert blieb. In ähnlicher Weise, wie dies nach subkutaner Injektion von für Rinder wenig virulenten Menschentuberkulosebazillen zu geschehen pflegt. Demgegenüber hat bei den Kontrollrindern das nämliche Virus intravenös injiziert eine rasch verlaufende tödliche Tuberkulose bewirkt, subkutan injiziert aber auch in den inneren Organen tuberkulöse Prozesse hervorgerufen“ (Hutyra).

Die gleichen günstigen Ergebnisse bei der Immunisierung von Kälbern erhielt Hutyra, wenn er von ihm selbst gezüchtete Tb.-Stämme in dem einen Falle herrührend vom Menschen, im andern Fall herrührend vom Affen benutzte. Auch bei diesen Versuchen verwandte Hutyra die

Behringsche Impfmethode. Die Fütterungs-Experimente Hutyras fielen nicht eindeutig aus.

In einer späteren Arbeit hat Hutyra[50]) dann weiter mitgeteilt, daß die durch die Behringsche Impfmethode erzeugte Immunität noch nach 8 Monaten nachweisbar ist. Auch ist es ihm gelungen, durch subkutane Injektion künstlich Immunität gegen nachfolgende Infektion zu erzeugen.

Die umfangreichsten Untersuchungen über den Wert des Marburger Impfstoffs und der Marburger Impfmethode haben wohl Rossignol und Vallée[88a]) angestellt infolge eines Beschlusses der „Société de Médecine Vétérinaire pratique", die für diese Versuche 16000 Francs zusammengebracht hatte.

Es wurden im ganzen 21 Tiere, die durch die Tuberkulinprüfung als tuberkulosefrei erkannt waren, mit dem Marburger Impfstoff am 11. November 1904 zum ersten Male und am 12. März 1905 zum zweiten Male schutzgeimpft. Sämtliche Tiere zeigten vollkommenes Wohlbefinden nach der Infektion mit Ausnahme eines einzigen, das zugrunde ging. Es handelte sich hier um eine sekundäre Infektion. Das Tier erwies sich bei der Schlachtung tuberkulosefrei. 65 Tage nach der ersten Schutzimpfung wurde eine Tuberkulinprüfung der schutzgeimpften Tiere vorgenommen, wobei sieben reagierten. Am 5. Juni 1905 (also nach der zweiten Schutzimpfung) reagierte auf eine erneute Tuberkulinprüfung hin nur noch ein Tier. Bei wiederholten Tuberkulinprüfungen am 6. August und 29. November erwies sich aber auch dieses Tier nicht reagierend und wurde bei der Schlachtung am 6. Dezember 1905 tuberkulosefrei befunden.

Den allgemeinen Eindruck dieser zunächst lediglich durch die Ausführung der Schutzimpfung und Beobachtung der Impflinge gewonnenen Erfahrungen geben Rossignol u. Vallée folgendermaßen wieder: „Un premier point semble définitivement établi: chez les sujets indemnes de toute contamination, la vaccination anti-tuberculeuse est inoffensive. Cette conclusion s'appuie tout à la fois sur l'état clinique des sujets vaccinées, sur leur non-réaction à la tuberculine, sur ce fait que l'on n'a pu trouver à l'autopsie de deux d'entre eux (charlois No. 3 flamand No. 1) morts ou sacrifiés incidemment sans avoir été éprouvés, trace d'une lésion tuberculeuse ou de bacilles virulents dans les ganglions."

Die übrigbleibenden 19 schutzgeimpften Tiere wurden in folgender Weise auf ihre Immunität geprüft: zwei derselben wurden zusammen mit zwei Kontrolltieren vom 16. Juni 1905 ab in einen verseuchten Stall eingestellt und bei einer am 29. November 1905 vorgenommenen Tuberkulinprüfung blieben die schutzgeimpften Tiere reaktionslos, während die Kontrolltiere reagierten und bei der Schlachtung tuberkulös befunden wurden. „Quoique peu large, cet essai est pleinement démonstratif: les deux sujets vaccinés ont victorieusement supporté, 95 jours après la deuxième vaccination, un contact infectant de 165 jours, qui s'est rapidement montré fatal pour les témoins."

Ferner wurden sieben schutzgeimpfte Rinder zusammen mit sieben Kontrollrindern mit virulenter Rindertuberkulosekultur subkutan infiziert. Die Temperatur blieb bei den schutzgeimpften Tieren normal, die anfangs aufgetretenen Schwellungen an der Infektionsstelle bildeten sich allmählich zurück. Dahingegen war die Temperatur bei den Kontrollrindern schwankend, auch zeigten sich an der Infektionsstelle wachsende Tumoren. Am 2. Dezember 1905, also 170 Tage nach der Infektion, wurden die

Kontrollrinder und die schutzgeimpften Rinder geschlachtet. Das Ergebnis der Schlachtungen ist in untenstehender Tabelle verzeichnet.

Weiter wurden sechs schutzgeimpfte Tiere zusammen mit sechs Kontrollrindern mit 0,0045 g einer sehr virulenten Kultur intravenös infiziert. Die schutzgeimpften Tiere zeigten nur anfangs etwas Reaktionsfieber, dann blieben sie fieberfrei und dauernd in bestem Wohlbefinden. Die Kontrolltiere dagegen zeigten nach einem Inkubationsstadium sämtlich Fieberbewegungen. Drei derselben starben 29 bzw. 34 bzw. 37 Tage nach der Infektion. Die drei anderen wurden in stark abgemagertem Zustande zusammen mit den Kontrolltieren am 2. Dezember 1905 getötet Das Ergebnis der Schlachtungsbefunde enthält die nachfolgende Tabelle.

	Art der Infektion	Ergebnis
7 Kontrollrinder	subkutan	4 generalisierte Tuberkulose. 3 lokale Tuberkulose und allgemeine Drüsentuberkulose.
7 nach von Behring schutzgeimpfte Rinder	subkutan	5 gesund. 1 lokale Tuberkulose. 1 kleiner Herd in einer Bronchialdrüse.
6 Kontrollrinder	intravenös	3 † an generalisierter Tuberkulose nach 29—37 Tagen. 3 getötet nach 167 Tagen; generalisierte Tuberkulose.
6 nach von Behring schutzgeimpfte Rinder	intravenös	5 gesund. 1 kleiner Herd in einer Bronchialdrüse*).

Die noch übrigen vier schutzgeimpften Tiere sollen auf die Dauer der Immunität beobachtet werden.

Hervorgehoben sei noch folgendes Experiment der gleichen Autoren. Sie infizierten ein durch die Tuberkulinprüfung als tuberkulös erkanntes Rind zusammen mit den oben aufgeführten Tieren am 15. Juni 1905 mit virulenter Kultur intravenös. Bei der am 22. Oktober erfolgten Schlachtung zeigte das Tier eine sehr geringe Tuberkulose, in der Hauptsache herrührend von der anfänglichen Spontaninfektion.

Nach dieser Feststellung, die gut übereinstimmt mit den eingangs zitierten Beobachtungen M'Fadyeans, scheinen also auch schwache Spontaninfektionen eine Immunität gegen künstliche Infektionen zu erzeugen.

Unter den Schlußfolgerungen der französischen Autoren seien die folgenden hervorgehoben:

1. La vaccination selon le procédé de M. v. Behring, est inoffensive pour les animaux entretenus durant le temps nécessaire à l'immunisation et les six semaines consécutives, à l'abri de toute cause d'infection accidentelle.

*) Dieses Rind hatte eine Pneumonie anderweitigen Ursprungs; es ist also nicht ganz einwandfrei.

2. La vaccination permet aux animaux de résister au moins durant plusieurs mois à la contagion naturelle, qui résulte de la cohabitation avec des sujets infectés.

3. La méthode confère une résistance vraiment considérable aux modes les plus sévères de l'infection expérimentale.

4. Les bacilles immunisants utilisés par M. v. Behring constituent de véritables vaccins.

Lignières [62a], [62b] hat einige Kritik an den Schlußfolgerungen der französichen Kommission geübt.

Im allgemeinen bestätigt er zunächst in einer auf dem Internationalen tierärztlichen Kongreß zu Budapest gemachten Mitteilung die Tatsache, daß die Behringsche Impfmethode Immunität gegen die Tuberkulose bei Rindern erzeugt: „Après beaucoup d'autres j'ai experimenté les vaccinations de Behring et j'ai aussi constaté avec toute evidence l'immunité annoncée par le célèbre professur de Marburg." Nach seiner Meinung ist aber die subkutane Impfung der intravenösen vorzuziehen, eine Ansicht, die sich mit der weiter unten zu erwähnenden Meinung Hutyras u. a. deckt. Andere Forscher wiederum erkennen aber die von Marburg aus zuerst empfohlene Methode der intravenösen Impfung als überlegen gegenüber der subkutanen Methode an, u. a. Arloing [1a]: „La vaccination sous-cutanée toutefois a provoqué une immunité moins forte" und ebenso Vallée: „Je considère ce procédé comme généralement moins efficace que celui de la voie intraveineuse". Ich verweise auch hier schon auf meine weiter unten folgenden Ausführungen betr. des Wertes der subkutanen Impfung.

Im übrigen erkennt aber Lignières die Bedeutung und Richtigkeit des Behringschen Immunisierungsprinzips durchaus an: „Avec nos devanciers nous sommes tous d'accord pour reconnaitre que la vaccination antituberculeuse confère aux bovidés une très forte résistance contre l'infection tuberculeuse naturelle ou artificielle mais que cette resistance n'est que relative". Der letzte Zusatz enthält nur das, was ich selbst des näheren auf Seite 6 und 7 weiter oben ausgeführt habe. Lignières scheint sich aber nicht vollkommen bewußt zu sein, daß Immunität immer ein relativer Begriff ist; denn er stößt sich anscheinend daran, daß bei einigen der in Melun immunisierten und auf ihre Immunität mit enormen Dosen virulenter Tb. geprüften Rindern (die Kontrollen starben nach 28 bis 37 Tagen!) in makroskopisch gesunden Drüsen durch den Tierversuch virulente Tb. nachgewiesen werden konnten. Nun, wenn wir es auch in der Praxis so weit bringen, daß wir so rapid zum Tode oder zu einer schweren Allgemeintuberkulose führende Infektionen, wie sie in Melun zum Zweck der Immunitätsprüfung ausgeführt wurden, durch den Akt der Immunisierung dahin beschränken, daß das betr. Tier das Virus zwar aufnimmt, ohne aber im übrigen die geringste Schädigung seiner Gesundheit zu erleiden, dann — ich muß gestehen — scheint mir die Kritik Lignières für eine praktisch so bedeutsame Methode zu anspruchsvoll.

Lignières scheint aber sogar der Meinung zu sein, jene zuweilen im Körper zurückbleibenden, noch lebensfähigen Tb. rührten vom Impfstoff selbst her, wobei er übrigens nach unserer Ansicht den Trugschluß macht, daß diese Tb. menschlicher Provenienz für den Fleischkonsumenten

solcher immunisierten Tiere gefährlicher sein müßten als die Bazillen bovinen Ursprungs. Das Irrige seiner erstgenannten Schlußfolgerungen hat bereits VALLÉE[95a]) zurückgewiesen; denn bei Tieren, die nur vacciniert, nicht auf ihre Immunität geprüft waren, hatten die Tuberkulinprüfungen, die Autopsien sowie die Verimpfung von Drüsenmaterial der Impftiere auf Meerschweinchen stets negative Ergebnisse. Das gleiche ergab sich sogar bei dreien auf ihre Immunität geprüften Rindern. Mit Recht schließt VALLÉE: „J'étais donc autorisé quoi qu'en pense M. LIGNIÈRES à écrire que les bacilles de Behring se comportent comme de véritables vaccins*).“

Von der Versuchsreihe VALLÉES waren noch vier Tiere übrig geblieben, an denen VALLÉE seine Studien fortgesetzt hat. Das Ergebnis derselben hat ihn von rückhaltloser Anerkennung der Bovovaccination zu kritischer Stellungnahme veranlaßt.

Die zwei unter natürlichen Infektionsbedingungen belassenen Tiere, welche sechs Monate nach der Schutzimpfung nicht auf das Tuberkulin reagierten, während die Kontrollen sehr ausgesprochene Reaktion zeigten

---

*) Es ist sehr zu begrüßen, daß LIGNIÈRES in Buenos-Ayres selbst Gelegenheit haben wird, sich über die Frage der Schädlichkeit oder Unschädlichkeit des Bovovaccins ein persönliches Urteil zu bilden. Verf. dieser Zeilen hält sich zurzeit in Argentinien auf, um neben anderen Tuberkuloseversuchen einen groß angelegten Bovovaccinationsversuch durchzuführen, der sich auf im ganzen 200 Rinder erstrecken wird. Das Ergebnis desselben soll durch eine von der argentinischen Regierung eingesetzte sachverständige Kommission unparteiisch geprüft werden. Da dieses Experiment wohl der am großartigsteu angelegte Experimentalversuch werden wird, der bisher ausgeführt wurde, dürfte vielleicht das zwischen Exz. v. BEHRING und Professor LIGNIÈRES festgesetzte Versuchsprogramm schon jetzt von Interesse sein, wenn auch seine Ausführung noch bevorsteht:

„Die Versuche werden unter nachfolgenden Bedingungen an genau bezeichneten, 20 Tage bis 3 Monate alten Rindern vorgenommen, die aus sicher tuberkulosefreien Herden stammen und eine vorherige Tuberkulinprobe glänzend bestanden haben.

I.

Eine erste Versuchsserie umfaßt 50 Tiere, von denen 20 als Kontrollen dienen, während 30 durch Professor RÖMER den ersten Impfstoff erhalten. Der erste Impfstoff wird außerdem durch die Kommission gewöhnlichen Versuchstieren einverleibt, um seine krankmachenden Eigenschaften festzustellen.

Nach der Erstimpfung werden Kontrollen und immunisierte Tiere zusammen unter gewöhnlichen Lebensbedingungen gelassen, aber ohne in Berührung mit anderen Rindern zu kommen. Nach drei Monaten werden dann Kontrollen und immunisierte Tiere mit Tuberkulin geprüft, hierauf zwei der geimpften Tiere getötet, seziert und einige ihrer Organe, gleichgültig ob sie gesund sind oder nicht, auf Versuchstiere verimpft.

Unmittelbar hierauf erhalten die übrig bleibenden 28 immunisierten Tiere durch Prof. RÖMER die Zweitimpfung. Der Zweitimpfstoff wird ebenso wie der Erstimpfstoff unter den gleichen Bedingungen und zu demselben Zweck gewöhnlichen Laboratoriumstieren einverleibt.

Immunisierte und Kontrollen bleiben dann dauernd zusammen unter den gewöhnlichen Lebensbedingungen.

Drei Monate nach der Zweitimpfung werden Immunisierte und Kontrollen einer weiteren Tuberkulinprüfung unterzogen. Sobald das Ergebnis derselben vorliegt, werden zwei immunisierte Tiere getötet, seziert und ihre Organe, gleichgültig, ob sie gesund sind oder nicht, durch die Kommission an empfängliche Versuchstiere verimpft.

Zum gleichen Zeitpunkt werden die übrigbleibenden 24 immunisierten Tiere und die 20 Kontrolltiere durch die Kommission einer Immunitätsprüfung mit Rindertuberkulosevirus unterzogen:

5 Immunisierte und 5 Kontrollen erhalten das Virus intravenös;

5 Immunisierte und 5 Kontrollen erhalten das Virus subkutan;

14 Immunisierte und 10 Kontrollen werden in einem besonderen Stall in intimen aber natürlichen Kontakt mit tuberkulösen Rindern gebracht.

und bei der Schlachtung mit Fütterungstuberkulose behaftet gefunden wurden, führte er aus dem ursprünglichen Versuchsstall in sein Alforter Laboratorium Dezember 1905 über. Im Februar 1906 schon zeigten die beiden Tiere klinische Anzeichen einer tuberkulösen Infektion und die Juli 1906 ausgeführte Schlachtung ergab bei dem einen Tier eine

---

Sechs Monate nach der Immunitätsprüfung erhalten alle Überlebenden eine Tuberkulin-Injektion; hierauf werden, reagierend oder nicht reagierend, zwei Immunisierte und zwei Kontrollen, die intravenös geimpft sind, sowie zwei Immunisierte und zwei Kontrollen, die subkutan geimpft sind, getötet. Was die Immunisierten und Kontrolltiere betrifft, die den natürlichen Infektionsbedingungen ausgesetzt sind, so werden nur die getötet, welche deutlich auf Tuberkulin reagiert haben.

Ein Jahr nach der Immunitätsprüfung werden die übrigbleibenden Tiere von neuem mit Tuberkulin geprüft und hierauf, reagierend oder nicht reagierend, je zwei intravenös und je zwei subkutan geimpfte Immunisierte und Kontrolltiere seziert. Ebenso je zwei der der natürlichen Ansteckung ausgesetzten Rinder.

Endlich werden $1^1/_2$ Jahre nach der Immunitätsprüfung alle übrigbleibenden Tiere getötet, nachdem sie vorher noch einer Tuberkulinprobe unterworfen sind. Nach jeder Sektion muß die Kommission empfänglichen Versuchstieren Herderkrankungen oder Teile von makroskopisch gesund erscheinenden Organen auf Versuchstiere verimpfen, bei denen sie die Tuberkulosefreiheit glaubt kontrollieren zu müssen. Als Impfstoff dient für diese erste Versuchsserie ein durch Professor Römer von Marburg nach Argentinien transportiertes Vaccin.

II.

Die zweite Versuchsserie umfaßt genau ebenso 50 Rinder, die aber an einem von dem ersten Versuch verschiedenen Platz aufgestellt sind. Diese Versuchsserie beginnt erst einen Monat nach der ersten. Die Immunisierung der Rinder wird nach derselben Methode wie im ersten Versuch vorgenommen, aber in dieser Serie mit einem von Professor Römer in Buenos-Ayres frisch hergestellten Vaccin.

III.

Eine dritte Versuchsserie beginnt einen Monat nach der zweiten und wird die gleiche Zahl von Versuchstieren umfassen, die wiederum an einem anderen Platz aufgestellt und im übrigen den gleichen Immunitätsprüfungen ausgesetzt werden, wie die beiden ersten Versuchsserien. Die Immunisierung der Rinder erfolgt in dieser Serie ebenfalls mit einem durch Professor Römer frisch hergestellten Impfstoff, der aber nur einmal zur Anwendung kommt.

IV.

Eine vierte und letzte Versuchsserie endlich besteht aus 30 Rindern, von denen 10 gleichzeitig mit der ersten Serie, 10 mit der zweiten und 10 mit der dritten schutzgeimpft werden. Diese Versuchstiere werden ohne jegliche Tuberkulinprüfungen unter gewöhnlichen Lebensbedingungen gelassen.

Ein Jahr später werden 10 dieser Tiere mit Tuberkulin geprüft und dann einer Immunitätsprüfung mit Rindertuberkulosevirus unterworfen, zusammen mit Kontrollen.

Der gleiche Versuch wird zwei Jahre nach der Schutzimpfung mit 10 anderen schutzgeimpften Tieren wiederholt.

Endlich werden die 10 letzten nach Ablauf von drei Jahren in gleicher Weise verwertet.

Um die Versuche zu erleichtern, werden die für die Sektion bestimmten Tiere, soviel wie irgend möglich, zur Schlachtung nach Buenos-Ayres geführt.

Die Rinder jeder Versuchsserie werden durch je zwei durch die Kommission vorgeschlagene Veterinärärzte auf ihren Gesundheitszustand beobachtet. Diese Herren werden ihre Beobachtungen genau in einem besonderen Verzeichnis notieren.

Wie auch das Resultat dieses hochwichtigen Versuches ausfallen möge, so werden — peinliche Ausführung und Fortsetzung der Versuche vorausgesetzt — folgende Fragen zu endgültiger Beantwortung kommen:

Tuberkulose des Intestinums und der Lungen, bei dem anderen eine auf eine Rachenmandel und eine Retropharyngealdrüse beschränkte tuberkulöse Infektion. Nach VALLÉE hat also die Immunität gegenüber den natürlichen Bedingungen nicht lange angehalten. Er bezweifelt daher auch den praktischen Wert der Schutzimpfung nach v. BEHRING.

Mir erscheint es zweifelhaft, ob wirklich diese Versuchsbedingungen VALLÉEs natürliche genannt werden dürfen. VALLÉE besitzt sicherlich Erfahrungen genug, um zu wissen, daß Laboratoriumsstallungen nie und nimmer mit natürlichen Verhältnissen verglichen werden dürfen, zumal Laboratoriumstallungen, in denen — wie das sicherlich auch für den Alforter Stall zutrifft — schon mit Tb. gearbeitet wurde. Man muß ferner beachten, daß sich VALLÉE nur auf diese zwei unter natürlichen Bedingungen beobachteten Tiere stützt, um sein Anathema gegen die praktische Brauchbarkeit der Bovovaccination auszusprechen. Andere Forscher, die mit demselben Vaccin arbeiteten, haben bessere Ergebnisse gehabt, wie STRELINGER[91]), obwohl er drei Jahre lange unter ähnlichen Bedingungen seine Tiere beobachtete und EBER[26a]), der sogar noch unter künstlich verstärkten natürlichen Infektionsbedingungen bessere Resultate erzielte.

Wir selbst bezweifeln übrigens durchaus nicht, daß bei besonders schweren Infektionsbedingungen die durch die Schutzimpfung erzeugte Immunität im Einzelfall nicht ausreicht. Die Immunität ist — wie wir immer wieder betonen — relativ. Aber auf die Höhe der erzeugten Immunität kommt es durchaus nicht allein an, sondern vor allem darauf: Was läßt sich in der Praxis mit dem Bovovaccin erreichen?

Die zwei weiteren, noch übrig gebliebenen Tiere hat VALLÉE ein Jahr nach der letzten Schutzimpfung mit 2 mg einer rindvirulenten Kultur injiziert. Ein Tier starb, infolge der Infektion, das andere überstand dieselbe.

VALLÉE gibt zwar ausdrücklich an, daß er in diesem Fall nur die Hälfte der Dosis genommen habe, die er in dem ersten Versuche benutzt hat, er vergißt aber, daß neben der Quantität eines Virus und zumal des Tuberkulosevirus die Qualität desselben von der allergrößten Bedeutung ist. Er hat aber zu diesen letzten Versuchen eine andere Kultur

---

1. Die Frage nach der Unschädlichkeit des Bovovaccins, die zwar schon hinlänglich entschieden ist. Das Ergebnis des vorstehenden Versuchsprogrammes wird aber wohl die letzten Zweifel an der Ungefährlichkeit des Impfstoffes nehmen.

2. Die Frage nach der Leistungsfähigkeit der Bovovaccination gegenüber experimentellen und natürlichen Bedingungen. Auch das wird nur eine demonstrative Wiederholung anerkannter Dinge werden.

3. Die Frage der Haltbarkeit des Vaccins und die Beziehungen seiner immunisatorischen Leistungsfähigkeit zu seiner Virulenz für Rinder und kleine Versuchstiere.

4. Die Frage der Dauer der erzeugten Immunität (VALLÉEs weiter unten anzuführende Experimente sind in dieser Richtung unzureichend), sowohl gegenüber experimentellen (Serie IV) als natürlichen Infektionsbedingungen (Serie I bis III). Es steht zu erhoffen, daß sich in Argentinien den natürlichen und normalen Verhältnissen besser entsprechende Bedingungen finden lassen, als dies in Melun möglich war.

5. Die Frage nach der verschiedenen Leistungsfähigkeit frisch hergestellter sowie älterer Vaccins.

6. Die Frage der Leistungsfähigkeit eines einzigen Vaccins, dessen Einführung — falls er genügend wirksam ist — für argentinische Verhältnisse wichtig erscheint.

7. Die Frage nach der Bedeutung der Tuberkulinprobe bei vaccinierten und bei unter experimentellen und natürlichen Bedingungen auf ihre Immunität geprüften vaccinierten Rindern im Vergleich zu Kontrolltieren.

genommen als zu den ersten Prüfungen. Auch aus diesem Argument folgert Vallée die praktische Nutzlosigkeit der Bovovaccination wegen zu kurzer Dauer der Immunität.

Obwohl Vallée selbst die geringe Virulenz, ja zuerst sogar eine Avirulenz des Bovovaccins festgestellt hat (eine Behauptung, die wir nicht bestätigen können; vergl. Behringwerkmitteilungen, Heft 2), eine Avirulenz selbst für die so empfänglichen Meerschweinchen, spricht er von der Gefährlichkeit des Vaccins für Mensch und Tier. Obwohl bei unserem täglichen Umgang mit großen Quantitäten des Vaccins bisher noch kein Malheur vorgekommen ist, obwohl bei über einer Viertelmillion Einspritzungen des Impfstoffes noch von nirgends her ein Unglücksfall gemeldet ist, obwohl andererseits die Unschädlichkeit für das Rind Vallée selbst in einwandfreien Versuchen festgestellt hat und obwohl er selbst expressis verbis diese Unschädlichkeit selbst behauptet, hält er es nämlich doch für nötig, noch ein neues eignes Vaccin einzuführen, das angeblich noch weniger virulent sein soll. Es entbehrt nicht eines gewissen Reizes zu sehen, wie in Deutschland in dem „Tauruman“ dem Bovovaccin ein Konkurrenzpräparat erwachsen ist, das umgekehrt erheblich virulenter ist als das Bovovaccin. Auch für dieses Vaccin wird natürlich mit dem Brustton der Überzeugung eingetreten. Vallée empfiehlt ein Vaccin, das von einer Pferdetuberkulosekultur herrührt, indem er dieses Vaccin für ungefährlicher erklärt, als das Bovovaccin.

Die theoretischen Ansprüche, die Vallée an ein Tuberkulosevaccin stellt, gehen übrigens weiter. Er verlangt nicht weniger, als daß er bei völliger Unschädlichkeit für alle Versuchstiere eine rasch einsetzende, hohe und sehr lang dauernde Immunität erzeugt.

Im übrigen trifft aber, glaube ich, v. Behring[17a]) den Nagel auf den Kopf, wenn er sagt: „Wir dürfen unser Urteil über die Brauchbarkeit einer präventiven Methode nicht abhängig machen von den theoretischen Forderugen der Akademiker, sondern wir müssen uns mit dem zurzeit Erreichbaren begnügen.“ Hätte man warten wollen, bis die Kathederweisheit ihr Placet zu dem Jennerschen Pockenschutzimpfungsverfahren gegeben hätte — wir litten heute noch unter der Blatternnot!

Soviel über die experimentelle Begründung der Rindertuberkuloseschutzimpfung nach v. Behring.

Die ersten, die nach v. Behring die Möglichkeit der Rindertuberkulose-Immunisierung bestätigten, waren Pearson und Gilliland[77]), die mit vom Menschen stammenden Tuberkelbazillen 3 Rinder vorbehandelten, deren Immunität sie dann durch intraperitoneale und intratracheale Infektion mit Rinder-Tb., die für Kontrolltiere unter ähnlichen Bedingungen stark virulent waren, nachwiesen.

In einer späteren Arbeit[78]) geben die gleichen Verfasser an, durch intravenöse Behandlung mit steigenden Dosen menschlicher Tuberkelbazillen sogar auf schon bestehende tuberkulöse Prozesse günstig eingewirkt zu haben. Eine Entscheidung, ob dies wirklich der Fall war, ist aber deshalb sehr schwierig, weil es sich bei den Versuchstieren um eine spontan entstandene Tuberkulose gehandelt hat.

Erfolgreiche Rinderimmunisierungsversuche nach dem Behringschen Prinzip wurden ferner vorgenommen von Thomassen[93, 94]), der anscheinend hohe Immunitätsgrade erzeugt hat. Nach seiner Angabe waren allerdings die Ergebnisse mit dem Marburger Impfstoff nicht so günstig als mit seinen eigenen Vaccins. Thomassen hat aber weder, was das Alter der

Versuchstiere, noch was Dosierung des Impfstoffs, noch was das Zeitintervall zwischen Erst- und Zweitimpfung betrifft, sich an die Vorschriften für die Anwendung des Bovovaccin gehalten. Was dann weiter die angeblich vergleichenden Experimente mit seinen eigenen Vaccins betrifft, so handelt es sich hier nicht um wirklich vergleichbare Versuche, da er die mit seinen Vaccins geimpften Rinder zu einem für den glücklichen Ausgang der Immunitätsprüfung viel geeigneteren Zeitpunkt prüfte, als die bovovaccinierten Tiere (vergl. v. BEHRING[17a]). Die genau nach den Marburger Angaben ausgeführten Experimente VALLÉES bilden jedenfalls ein interessantes Pendant zu den Versuchen THOMASSENS.

NEUFELD[73—75], der unter KOCHS Leitung arbeitete, hat über Immunisierung mit Hilfe steigender Dosen menschlicher Tuberkelbazillen und abgeschwächter Rindertuberkelbazillen bei Ziegen und Eseln, später auch bei Rindern berichtet. Bemerkenswert ist von diesen Versuchen unter anderem die Feststellung, daß bei allmählicher Steigerung und intravenöser Applikation abgeschwächter Tb. eine deutliche Überempfindlichkeit bei den behandelten Tieren festgestellt werden konnte. Für den Eintritt dieser Überempfindlichkeit hat Verf. ebenfalls instruktive Beispiele angeführt. Dieselbe scheint nach unseren Erfahrungen bei immunisierender Vorbehandlung mit vom Huhne stammenden Tuberkelbazillen noch rascher einzutreten. Hervorzuheben ist von dem NEUFELDschen Berichte noch, daß die zum Zweck der Immunisierung vorgenommene Behandlung mit abgetöteten Tuberkelbazillen ein absolut negatives Ergebnis hatte.

Auch v. BAUMGARTEN[4, 5] hat die Richtigkeit des BEHRINGschen Immunisierungsprinzips bestätigt. Nach seiner Angabe hat die Immunität der von ihm geimpften Tiere mindestens $2^1/_2$ Jahre lang gedauert. Auch durch subkutane Vorbehandlung hat v. BAUMGARTEN Immunität erzeugt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den schon erwähnten Resultaten HUTYRAS, sowie dem gleich zu erwähnenden Versuche KLEMPFRERS. HUTYRA meint auf Grund gewisser theoretischer Erwägungen, daß die subkutane Vorbehandlung vielleicht der intravenösen Immunisierungsmethode vorzuziehen sei, da die an der Injektionsstelle liegen bleibenden, und nur sehr allmählich, dafür aber lange Zeit hindurch ihre Stoffwechselprodukte abgebenden Tb. eine langandauernde aktive Immunität zustande bringen würden. Nach unseren Erfahrungen können umgekehrt die Resorptionsverhältnisse bei subkutaner Injektion infolge Abkapselung der eingespritzten Bazillen sehr ungünstige und sehr ungleichmäßige sein. v. BAUMGARTEN gibt weiter an, daß er mit dem Serum eines mehrfach immunisierten und auch wiederholt auf seine Immunität geprüften Rindes Schutzwirkung bei einem gesunden Tiere erzielte. Sein Versuch hatte folgenden Verlauf:

Kalb I wurde mit dem betreffenden Serum vorbehandelt, dann wurde es zusammen mit Kalb II und Kalb III mit virulenter Kultur infiziert und Kalb III wurde nach der Infektion mit dem gleichen Serum, das zu Schutzzwecken bei dem Kalbe I angewendet war, nachbehandelt. Dieses Tier starb nach sechs Wochen an ausgedehnter Tuberkulose. Das reine Kontrolltier II dagegen wurde nach vier Monaten getötet und hatte ebenfalls eine ausgedehnte Tuberkulose; dahingegen wies das präventiv mit dem Serum behandelte Kalb I nur lokale Tuberkulose bei der Schlachtung auf. Auffallend bleibt in diesem Versuch der bedeutend heftigere Verlauf des Infektionsprozesses bei dem mit dem Serum nachbehandelten

Kalbe III. Wenn in der Tat in dem Serum Antikörper vorhanden waren, ist die beschleunigende Wirkung des Serums in diesem Fall sehr auffallend. Anderseits steht der überraschend günstige Effekt in dem Präventivversuch im Widerspruch mit allen übrigen experimentellen Erfahrungen, die bei Schutzversuchen mit dem Serum tuberkuloseimmunisierter Rinder von uns und anderen (Thomassen) gewonnen sind. Vielleicht findet diese auffallende Beobachtung v. Baumgartens darin ihre Erklärung, daß die präventive Behandlung mit dem „Schutz"-Serum keine passive, sondern eine aktive Immunisierung darstellt, darauf beruhend, daß in dem Serum des so vielfach behandelten Rindes spärliche lebende Tb. vorhanden waren.

Ebenso wie von Baumgarten scheint auch Klemperer[52]) in einem Falle durch subkutane Vorbehandlung eines Kalbes Immunität erzeugt zu haben. Es fehlen aber Kontrollversuche. Ferner glaubt Klemperer durch Nachbehandlung künstlich infizierter Rinder mit Tb. menschlicher Abkunft einen günstigen Einfluß auf den Tuberkuloseprozeß ausgeübt zu haben. Die Unterschiede zwischen den behandelten Tieren und den Kontrollen sind indeß sehr gering.

Klimmer[53—55]), der befürchtet, daß ein vom Menschen stammender Tb.-Stamm als Immunisierungsmittel mit zu großen Gefahren für den Impfarzt verbunden ist, giebt an durch Molch-Passage einen Tb.-stamm menschlicher Herkunft so verändert zu haben, daß er zwar hinsichtlich seiner morphologischen und kulturellen Eigenschaften im wesentlichen weiter als solcher imponierte, aber vollständig avirulent für alle Laboratoriumstiere geworden war. Er hat mit diesem Stamm Kaninchen und Rinder immunisierend behandelt. Die Rinder hat er einmal experimentell auf ihre Immunität geprüft (aber noch nicht, soweit Verf. bekannt geworden ist, darüber berichtet) und außerdem unter natürlich-epizootischen Bedingungen auf ihre Tuberkulose-Widerstandsfähigkeit beobachtet. Das Ergebnis soll ein günstiges gewesen sein. Von seinen Kaninchen-Versuchen teilt er zwei Experimente mit, in denen er auf intravenösem Wege die Immunität mit Hilfe einer virulenten Rinder.-Tb.-Kultur nachzuweisen suchte. Die Kaninchen starben aber frühzeitig an anderweitigen Infektionen. Ein immunisiertes Kaninchen prüfte er auf intraperitonealem, eines auf intraoculärem Wege auf Immunität. Sie erwiesen sich beide geschützt. Diese beiden Kaninchen sind die einzigen experimentellen Beweise, über die Klimmer genau berichtet. Für die Praxis scheint er trotz seiner anfänglichen Bedenken doch wieder auf säugetiervirulente Tb. menschlicher Herkunft zurückgekommen zu sein, und somit durfte sich sein Immunierungsprinzip in nichts von dem Marburger Immunisierungsprinzip unterscheiden.

In ihren mit Unterstützung des Preußischen Landwirtschaftsministeriums systematisch angelegten Rinderimmunisierungsversuchen verwandten Koch, Schütz, Neufeld und Miessner[57]) z. T. Tb. menschlicher Herkunft, z. T. abgeschwächte Rinder-Tb. als Vaccins. Anfangs führten sie Doppelimpfungen aus mit 0,01 bis 0,02 g einer frischen Bouillonkultur als erster und 0,05 g als zweiter Dosis, später bevorzugten sie eine nur einmalige Impfung mit 0,01 bis 0,03 g frischer Kultur. Auch sie benutzten die intravenöse Applikationsmethode. Als Kontrollinfektion wählten sie die intravenöse Einverleibung von 0,02 g Rinder Tb., die bei nicht vorbehandelten Kontrollrindern in 30 Tagen zum Exitus führten. Besonders bemerkenswert ist bei diesen Versuchen, daß die Bedeutung des Zeitintervalles zwischen der letzten zum Zweck der

Schutzimpfung und der zum Zweck der Immunitätsprüfung verabfolgten Infektion experimentell nachgewiesen wurde. Wurden die Rinder schon 40 Tage nach der letzten Schutzimpfung geprüft, so erwies sich der Schutz als unzureichend, während 3 Monate nachher geprüfte Tiere sich unter den angegebenen Bedingungen immun erwiesen. Auf die Wichtigkeit dieses Punktes hatte übrigens Verf. in einem dem Veterinärkongreß zu Budapest im Februar 1905 eingesandten Referat schon hingewiesen. Weiter stellten die genannten Autoren fest, daß sich auch schon mit einer einmaligen intravenösen Applikation von 0,01—0,03 g ihres Vaccins ein ausreichender Schutz erzielen ließ.

Daß Arloing[1a]) ebenfalls die Richtigkeit und Bedeutung des Behringschen Immunisierungsprinzips bestätigte ist schon weiter oben erwähnt.

Ueber die neuerdings von Calmette[20]) beim Rinde durch Verfütterung abgetöteter Tb. angestellten Tuberkuloseschutzversuche liegen noch keine ausführlicheren Angaben vor.

Herstellung und Anwendungsweise des Tuberkulosevaccins.

Man hat zur Immunisierung der Rinder die verschiedensten Kulturen angewendet, z. B. Kaltblüter-Tb., ferner Hühner-Tb., Menschen-Tb. und Rinder-Tb.

Erstere scheinen, wenn wir von den angeblich günstigen Ergebnissen Klimmers absehen, sich nicht bewährt zu haben. Auch die Hühner-Tb., obwohl sie wie Verf.[81]) hervorgehoben hat, im Prinzip zu der Schutzimpfung geeignet sind, dürften sich zu einer allgemeinen Benutzung als Vaccin nicht eignen, da ihre Einverleibung von üblen Zufällen gefolgt sein kann. Rinder-Tuberkelbazillen sind, wie zuerst von Behring[7]) hervorgehoben hat, ebenfalls prinzipiell dazu befähigt, Immunität gegen nachfolgende schwere Infektionen bei Rindern zu erzeugen. Sie müssen aber erst künstlichen Abschwächungsverfahren unterzogen werden, ehe sie ohne Gefahr als Vaccin dienen können. Und selbst wenn eine Abschwächung so weit gediehen ist, daß das Vaccin beim Rinde keine Herderkrankungen bewirkt, so möchte Verf. doch prinzipiell von Anwendung derartiger Imfstoffe abraten. Ebenso, wie dem Experimentator die Abschwächung der Tb. gelungen ist, könnten umgekehrt die Tb. bei langjährigem Verweilen im Rinderkörper atavistische Neigungen bekunden und so verhängnisvoll für das geimpfte Tier werden.

So sind auch die meisten Autoren auf die von Marburg aus zuerst empfohlene Benutzung von Tuberkelbazillen menschlicher Herkunft zurückgekommen. Nun ist aber durchaus nicht jede vom Menschen stammende Kultur zur Rinderimmunisierung brauchbar; sind doch aus tuberkulösen Menschen Kulturen gezüchtet worden, die für das Rind hochvirulent waren und bei ihm schwere Perlsucht erzeugten. Dagegen geht aus den Angaben vieler Autoren (Pearson und Gilliland, Thomassen, Hutyra, Koch, Neufeld u. a.) hervor, daß die Mehrzahl der vom Menschen gezüchteten und den Virulenztypus der gewöhnlichen Menschen-Tb. besitzenden Stämme im Experiment genügende Immunität gegen schwere Infektionen erzeugen. Trotzdem dürfte nicht jede Kultur menschlicher Abkunft und des gleichen Virulenztypus für praktische Zwecke geeignet sein. Im Heft 5 der „Beiträge zur experimentellen

Therapie" sind einige sehr instruktive Protokolle von mit Menschen-Tb. geimpften Rindern mitgeteilt worden, die schwer erkrankten, so daß zeitweise die Prognose quoad vitam sehr ungünstig gestellt werden mußte. Eins dieser Tiere ist sogar schwer marantisch zugrunde gegangen. Selbst Koch, Schütz, Neufeld und Miessner, die die prinzipielle Geneigtheit jedes Menschen-Tuberkulose-Stammes vertreten, sagen, daß sich bei der Prüfung verschiedener Stämme zu Immunisierungszwecken ein Unterschied insofern bemerkbar machte, „als die Kälber durch manche Stämme mehr angegriffen wurden als durch andere." Die erst kürzlich erschienenen Mitteilungeu Fraenkels und Baumanns[28]) enthalten die Schilderung einer neuen sehr feinen Methode zur Unterscheidung von Virulenzunterschieden bei verschiedenen Tb.-Kulturen gleicher Provenienz; vielleicht wird diese Methode sich eignen, um genauer die Geneigtheit einer Tb.-Kultur zur Rinderimmunisierung zu entscheiden als bisher. Mit dem Virulenzgrad einer Kultur hängt aber sicher die immunisierende Leistungsfähigkeit auf das engste zusammen und ebenso wie manche Pockenlymph-stämme sich zur Schutzimpfung besser eignen als andere, werden auch Unterschiede in dieser Richtung zwischen Tb.-Stämmen existieren. Dabei kommt ferner inbetracht, daß die immunisierende Leistungsfähigkeit einer Kultur noch nicht das allein entscheidende ist, zumal für Übertragung der spezifischen Schutzimpfung in die allgemeine landwirtschaftliche Praxis. Denn so erstrebenswert es auch sicherlich ist, einen möglichst hohen Immunitätsgrad zu erzeugen, so ist für die Praxis doch viel wichtiger die Entscheidung der Frage, ob es auf einem einfachen und sicher unschädlichen Wege möglich ist, eine für die epizootischen Bedingungen genügende Immunität zu schaffen.

Von nicht genug zu schätzendem Vorteil ist daher der Besitz einer Kultur, die, wie die von Marburg zur Schutzimpfung empfohlene Kultur, nach allen Richtungen im Tierversuch genau seit langen Jahren studiert ist.

Die Marburger zur Schutzimpfung verwandte Kultur Nr. 1 ist durch von Behring[18]) und Verf.[82]) genau beschrieben worden in ihrer krankmachenden Wirkung gegenüber den verschiedensten Tierarten, besonders gegenüber dem Rinde.

Die Erfahrungen über die Wirkung dieser Kultur bei intravenöser Applikation, die bei der Bovovaccination allein in Betracht kommt, konnten folgendermaßen zusammengefaßt werden: In einer Dosierung von 0,0001 g zeigen die Tb. nicht die geringste Wirkung bei Rindern; Infektionen mit 0,001 bewirken ganz leichte nicht über 1 ° hinausgehende Temperatursteigerungen. Dosen von 0,01 g und noch größere Mengen rufen sehr bedrohliche Erscheinungen hervor; aber auch bei Anwendung der größten bisher zur intravenösen Infektion von Rindern verwandten Bazillenmengen konnten dauernd zurückbleibende Herderkrankungen nicht festgestellt werden.

Diese Unschädlichkeit der Kultur für Rinder ist durch Hunderte von Sektionen kontrolliert worden. Nachdem ferner der Virulenzgrad dieser Kultur sich während nunmehr 11 Jahren unverändert erwiesen hat, darf man wohl mit Recht von Vorzügen dieser Kultur für die praktische Rinderimmunisierung sprechen.

Dieser Tb.-Stamm wird dauernd auf Glyzerinbouillon fortgezüchtet; was die Technik der Züchtung betrifft, so verweise ich auf das in dem Artikel „Tuberkulin zu diagnostischen Zwecken bei Tieren" in diesem Handbuch Gesagte. Nach 4—6 wöchentlichem Wachstum der Tb. auf der Bouillon werden die Bazillen auf einer Nutsche unter aseptischen

Bedingungen abfiltriert und dann im Vacuum während 24 Stunden über Schwefelsäure getrocknet. Der leicht angeriebene Impfstoff wird dann in kleine Röhrchen abgefüllt und zwar in 2 verschiedenen Packungen, die 5 bezw. 20 J. E. enthalten.

1. I.-E. entspricht im allgemeinen 0,004 g Trocken-Tb. und stellt die Dosis für die Erstimpfung eines Rindes dar; 5 I.-E., die Dosis für die 12 Wochen später erfolgende Zweitimpfung, enthalten also 0,02 g Tb. Die aus Trocken-Tb. bestehende I.-E. entspricht 0,02 g frischer Tb., was die Bazillenquantität betrifft: dagegen hat sie den Virulenzgrad von nur 0,002 g Tb. Der fertige Impfstoff also, der als Bovovaccin bezeichnet wird, ist eine abgeschwächte Modifikation der ursprünglichen Kultur. Den Impfstoffsendungen gibt das Behringwerk-Marburg folgende Anweisung bei:

Anweisung für die Ausführung der Tuberkulose-Schutzimpfungen von Rindern mit Behrings Bovovaccin.

Auswahl und Beobachtung der Impflinge.

1. Der Schutzimpfung sind in der Regel nur gesunde Kälber im Alter von 2—12 Wochen zu unterziehen.

2. In solchen Rinderherden, in welchen seuchenartige Erkrankungen herrschen, soll mit dem Beginn des Impfgeschäftes gewartet werden bis zum Erlöschen der infragestehenden Seuche.

Wenn eine Herde unter septischer Pneumonie der Kälber zu leiden hat, so empfiehlt es sich entweder die Kälber in den ersten Lebenstagen mit Pneumonie-Serum zu behandeln und 4 Wochen später die Bovovaccination folgen zu lassen, oder man unterzieht zunächst nur einzelne Kälber der Tuberkulose-Schutzimpfung und führt die Impfung der übrigen Kälber erst dann durch, wenn die zuerst geimpften Tiere die Impfung gut vertragen haben.

3. Die Impftiere sind 2 Tage vor und 14 Tage nach der Impfung im Stalle zu halten.

4. In allen Fällen, in denen die Besitzer mit dem Messen der Mastdarmtemperatur umgehen können, wird empfohlen, 2 Tage *vor der Impfung* je zweimal (morgens und abends) und am Morgen des Impftages einmal bei jedem Impftiere die Temperatur zu messen und zu notieren. Dasselbe hat *nach der Impfung* noch einmal abends und dann an den folgenden 5 Tagen je einmal zu geschehen. Zeigen die Impftiere nach dieser Zeit noch Fiebertemperaturen, so sind die Messungen bei diesen Tieren solange fortzusetzen, bis die Temperatur zur Norm herabgegangen ist.

Numerierung der geimpften Rinder.

Jedes geimpfte Rind erhält eine laufende Nummer. Die Kennzeichnung der einzelnen Tiere erfolgt zunächst durch Aufnahme eines Signalements und ferner durch — am besten zweifache — Zeichnung, die während der ganzen Lebensdauer des betreffenden Tieres zu erhalten ist.

Als solche kommen in Betracht:

1. Ohrmarkenverfahren.
2. Tätowierung.

3. Ausschneiden der Nummer des betreffenden Tieres in den Haaren des Felles.

4. Zeichnung mit Hilfe einer ca. 1 %igen wässerigen Pikrinsäurelösung und einer Fuchsinlösung, welche in der Weise herzustellen ist, daß man zunächst 5 g Fuchsin unter häufigem Schütteln in ca. 100 ccm Alkohol löst und von dieser Lösung soviel in Wasser eingießt, bis eine tiefrot gefärbte Flüssigkeit entsteht. Die Färbung kann in folgender Weise erfolgen: Nr. 1 Rechter Oberschenkel rot, linker Unterschenkel gelb, Nr. 2 Brust rot etc. (Pikrinsäure ist giftig und muß deshalb vorsichtig aufbewahrt werden).

Der Impfstoff (Bovovaccin)

wird in Glasröhren mit 5 I.-E. (Immunisierungseinheiten) und in solchen mit 20 I.-E. abgegeben. Er enthält lebende Tb. (Tuberkelbazillen) mit Kochsalz. Die Wirkung des Impfstoffes auf Rinder unterliegt einer fortgesetzten Kontrolle.

Der Bovovaccin bleibt in geschlossener Glasröhre während einer Zeitdauer von 30 Tagen in seiner Wirkung auf Rinder unbeeinträchtigt. Die Dauer seiner Verwendbarkeit findet sich auf der äußeren Umwicklung der Verpackung angegeben. Nach Ablauf dieser Zeit ist sein Immunisierungswert zwar nicht aufgehoben, aber doch so weit verringert, daß die weiter unten angegebene Dosierung auf ihn nicht mehr Anwendung findet.

Herstellung der Emulsion.

Der ganze Röhrcheninhalt wird in eine vorher ausgekochte, am besten innen rauhe Reibschale gebracht (wenn der Impfstoff an den Wandungen des Röhrchens haften bleibt, so ist er mit Hilfe einer Nadel, eines Löffelchens oder dergl. von dort zu entfernen), mit einigen Tropfen abgekochtem und wieder erkaltetem Wasser eine Minute lang verrieben und dann nach und nach — innerhalb von 2 Minten — mit ca. $^{2}/_{3}$ des im ganzen zu verwendenden Wassers (s. unten) angerührt und in einen sterilen Meßzylinder gebracht. Der Rest des Wassers wird dazu benutzt, die im Mörser zurückgebliebenen Reste der Emulsion in den Meßzylinder zu spülen. Aus 5 I.-E. sind 10 ccm Emulsion, aus 20 I.-E. 40 ccm Emulsion herzustellen, so daß 2 ccm der fertigen Emulsion stets 1 I.-E. enthalten.

Die fertige Emulsion ist am Tage der Herstellung zu verwenden. Vergeht längere Zeit (mehrere Stunden) bis zur Einspritzung, so soll die Emulsion mit besonderer Sorgfalt vor Verunreinigung geschützt werden.

Dosierung.

Von der in oben angegebener Weise hergestellten Emulsion werden 2 ccm (= 1 I.-E.) zur Erstimpfung, 10 ccm (= 5 I.-E.) zu der 12 Wochen später stattfindenden Zweitimpfung verwendet.

Wenn es vorgezogen wird bei der Erstimpfung an Stelle von 2 ccm Emulsion 5 oder 10 ccm zu verwenden, so muß die Stamm-Emulsion mit steriler 1 %iger Kochsalzlösung entsprechend verdünnt werden.

Die Emulsion ist vor jeder Neufüllung der Spritze gut umzuschütteln.

Ausführung der intravenösen Einspritzung.

Zur Ausführung der Schutzimpfung benutzt man am besten eine Asbeststempelspritze, welche vor dem Gebrauch durch mehrmaliges Ausspritzen mit 2%-iger Lysollösung und hierauf durch wiederholtes Nachspülen mit Kochsalzlösung zu reinigen ist. Die auf die Spritze aufgesetzte Kanüle ist äußerlich ebenfalls mit Lysollösung abzureiben.

In der kalten Jahreszeit ist die fertige Tb.-Emulsion durch Einstellen in Wasser von ca. 30° anzuwärmen.

Hierauf saugt man eine bezw. fünf I.-E. von der fertigen Tb.-Emulsion ein; Luftblasen in der Spritze sind vor der Einspritzung auszublasen, wobei darauf zu achten ist, daß mitausfließende Tropfen der Emulsion nicht auf den Boden des Stalles, sondern in eine mit Lysollösung gefüllte Schale fallen. Die mit dem Impfstoff gefüllte Spritze wird bis zu dem Zeitpunkt der Einspritzung auf eine bereit gestellte Schale gelegt, ebenso die nunmehr von der Spritze abzunehmende Kanüle.

Der Impfstoff wird in die linke Vena jugularis eingespritzt. Es empfiehlt sich die Einspritzung, wenn irgend möglich, an dem Standort des Tieres selbst vorzunehmen, um eine unnötige Beunruhigung der Rinder zu vermeiden. Nach Abwaschen der linken Halsseite mit 2%-iger Lysollösung bringt der Operateur durch Zusammendrücken mit dem Daumen der linken Hand das Blut in der Vena jugularis zum Stehen, was sich durch eine deutliche, wurstförmige, beim Fingerdruck fluktuierende Schwellung bemerkbar macht. Dasselbe kann für den Operateur bequemer durch eine von einem Gehilfen um den Hals des Kalbes gelegte Ligatur erreicht werden, die erst nach vollzogener Einspritzung abgenommen wird. Nun nimmt der Operateur die Kanüle von der in leicht erreichbarer Nähe bereitgestellten Schale mit der rechten Hand (während seine linke Hand ununterbrochen die Vena jugularis zugedrückt hält) und sticht sie dicht oberhalb des komprimierenden Daumens der linken Hand in einem Winkel von etwa 45° schräg von unten nach oben in die Vene ein. An dem Ausfließen eines gleichmäßigen, kräftigen Blutstroms aus dem Lumen der Kanüle erkennt man, daß sie sich in der Vene befindet. Tritt kein Blut aus, so ist die Vene noch nicht angestochen. Ohne die Kanüle wieder ganz herauszuziehen, sticht man dann von neuem in die fluktuierende Anschwellung hinein. Sobald das Blut reichlich ausfließt, hört die linke Hand mit dem Zusammendrücken der Vene auf und hält jetzt die Kanüle fest, während die rechte Hand die Spritze von der Schale aufnimmt, sie auf die Kanüle gut schließend aufsetzt und den Impfstoff langsam und gleichmäßig in die Vene hineindrückt. Nach vollständiger Entleerung der Spritze drückt man mit dem Daumen der linken Hand die Haut an der Einstichstelle zusammen, worauf nach dem Herausziehen der auf der Spritze befestigten Kanüle die Blutung in der Regel sofort zum Stehen kommt.

Die Injektionsstelle wird dann mit 2%-iger Lysollösung abgerieben, womit der Impfakt beendet ist.

Sollen mehrere Impfungen hinter einander mit derselben Kanüle ausgeführt werden, so ist die Spritze jedesmal, bevor sie von neuem mit Bazillen-Emulsion beschickt wird, durch Einziehen und Ausspritzen von steriler Kochsalzlösung zu reinigen. Oder man hält eine zweite mit Kochsalzlösung gefüllte Spritze bereit, mit der man die benutzte Kanüle ausspritzt.

Für die technisch einwandsfreie Ausführung der Schutzimpfungen und damit für den ohne Impfschäden erreichbaren Impferfolg haben die Viehbesitzer Sorge zu tragen. Die Firma Behringwerk kann dafür die Verantwortung nicht übernehmen.

Einen Instrumentenkasten mit allen zur Ausführung der Schutzimpfung notwendigen Utensilien liefert die Firma W. Holzhauer in Marburg.

Formulare für die Einzeichnung von Temperaturkurven können von dem Lithographen Meder in Marburg bezogen werden.

Schemata für Sammellisten zum Zwecke einer größeren Statistik sind in der Buchdruckerei von Heinr. Bauer in Marburg erhältlich.

Erläuterung: ad 1. Die Schutzimpfung ist auch bei älteren und erwachsenen Tieren wirksam. Aber die Erfahrung hat uns gelehrt, daß in größeren Beständen, in denen die Rindertuberkulose ja besonders verbreitet und in denen deshalb die Anwendung des Bovovaccins besonders notwendig ist, die meisten der älteren Tiere schon als tuberkulose-infiziert zu betrachten sind. Es würde also rasch zu einer Diskreditierung eines Rindertuberkuloseschutzmittels kommen, wenn auch die älteren schon infizierten Tiere geimpft und bei ihnen Erfolge erwartet würden. Außerdem aber pflegt im Gegensatz zu den jungen, noch nicht mit dem Tuberkulosevirus in Berührung gekommenen Rindern, bei den älteren infizierten Rindern der Vaccination eine Reaktion zu folgen, bestehend in Fieberbewegungen und Abnahme der Freßlust. In einigen solcher Fälle machten sich sogar Anzeichen einer pneumonischen Erkrankung bemerkbar. Es muß deshalb unter den bei uns in der Regel vorhandenen epizootischen Bedingungen von einer Impfung älterer Rinder abgeraten werden.

Es kann aber auch noch innerhalb des von uns empfohlenen Zeitraums die Schutzimpfung zu spät, d. h. zu einer Zeit erfolgen, wo das junge Tier schon infiziert ist, bezw. es kann eine schwere Spontaninfektion in dem Zeitraum einsetzen, wo das Tier noch nicht volle Immunität erlangt hat. Verfasser hat drastische Beispiele hierfür angeführt. Es ist daher für die Praxis empfehlenswert, die Impfung so früh als nur irgend möglich vorzunehmen.

ad 2. Wenn die Schutzimpfung in Herden ausgeführt worden ist, in denen z. B. die Kälberpneunomie herrschte, sind die unangenehmsten Zufälle beobachtet worden, wie Tod der erkrankten Tiere, sowie Aufflackern des Prozesses bei den latent infizierten Kälbern. Es muß deshalb dringend von der Ausführung der Impfung in solchen Fällen abgeraten werden. Was geschehen kann, wenn diese Mahnung nicht befolgt wird, haben die Erfahrungen von Marks gezeigt.

ad 4. Die Messung der Temperatur bildet eine gute wissenschaftliche Ergänzung der Schutzimpfung. Denn nach dem in der Erläuterung zu 1. Gesagten ist es verständlich, daß man aus der Beobachtung und Registrierung der Körpertemperatur sehr brauchbare Anhaltspunkte zur Entscheidung der Frage, ob ein Rind schon vor der Schutzimpfung spontan infiziert war oder nicht, gewinnen kann.

ad „Herstellung der Emulsion“: Die Trocken-Tb. werden schon vor der Absendung mit etwas Kochsalz angerieben, so daß, wenn 5 I.-E. mit 10 ccm, 20 I.-E. mit 40 ccm Flüssigkeit verrieben werden, die gesamte Emulsion 1 % Kochsalz enthält. Wählt der Impfarzt eine stärkere Verdünnung, so hat er über die bezeichneten Flüssigkeitsgrenzen hinaus mit steriler 1 % Kochsalzlösung die Stammemulsion aufzufüllen (s. unter „Dosierung“). Die Verreibung der Trocken-Tb. muß sehr sorgfältig erfolgen, damit eine möglichst gleichmäßige Emulsion entsteht. Von der Feinheit der Emulsion ist der Immunisierungseffekt auch abhängig.

ad „Ausführung“: Die Impfung wird intravenös ausgeführt. Wir widerraten jede subkutane Anwendung des Impfstoffs, wobei wir auf das früher Gesagte sowie auf theoretische Bemerkungen von Behrings verweisen. Die technische Ausführung ist für den Geübten sehr einfach. Wie Ebeling[27]) mitteilt, konnte er in der Stunde durchschnittlich 50 Impfungen erledigen.

Da das Bovovaccin aus lebenden Tuberkelbazillen besteht, muß natürlich vorsichtig mit demselben umgegangen werden. Besondere Ängstlichkeit ist aber durchaus unnötig und bei Beachtung der von uns gegebenen Vorschrift ist bisher unseres Wissens noch kein Unglücksfall vorgekommen. Hervorgehoben sei auch noch einmal, daß es sich um abgeschwächte Tb. handelt.

Neben dem Bovovaccin erscheint seit einem Jahr auch ein von den Höchster Farbwerken gelieferter Impfstoff im Handel. Er wird „Tauruman“ genannt und ist nach den Angaben von Koch und Schütz angefertigt. Auch er wird intravenös injiziert, auch er besteht aus Tb. menschlicher Herkunft, auch er wird zur Schutzimpfung junger Kälber empfohlen. Überhaupt stimmt die Anweisung für den Gebrauch desselben mit der Marburger Anweisung für den Bovovaccin dem Sinn nach überein, so daß es sich erübrigt, dieselbe hier wiederzugeben. Ein gewisser Unterschied in der Anwendung besteht nur darin, daß mit dem Tauruman nur eine einmalige Impfung ausgeführt wird. Das Tauruman wird in 10 ccm fertiger Emulsion in zugeschmolzenen Glasröhrchen geliefert; dasselbe ist nur 8 Tage haltbar. Nach einer Angabe Ottos[75a]) enthält das Tauruman 0,02—0,04 g Tb. Die Herstellungsweise dieses Impfstoffes unterscheidet sich außerdem dadurch von der des Marburger Bovovaccin, daß die Tb. frisch von Bouillonkulturen genommen, dann nur oberflächlich getrocknet und hierauf emulsioniert werden.

Das Tauruman wird in Frankfurt staatlich geprüft und zwar wird es einer fortlaufenden Kontrolle (Untersuchung auf Freisein von verunreinigenden Bakterien, Bestimmung der in der Impfdosis enthaltenen Bakterienmasse) und einer periodischen Prüfung (Bestimmung der Virulenz) unterzogen.

Erfahrungen und Erfolge mit der Bovovaccination in der Praxis.

Die Überschrift dieses Kapitels rechtfertigt sich dadurch, daß über die Anwendung anderer Schutzimpfstoffe gegen die Rindertuberkulose in der Praxis bisher noch keine Erfahrungen berichtet sind, wenn wir von der kurzen summarischen Mitteilung Klimmers absehen.

Mit dem Bovovaccin sind nunmehr ca. 150000 Rinder geimpft.

Das Bovovaccin ist in Deutschland, Österreich, Ungarn, Italien, Schweden, Finnland, Japan und Nordamerika eingeführt.

Die leichte technische Durchführbarkeit der Impfung ist allgemein anerkannt. Diesem Moment kommt erhöhte Bedeutung zu angesichts der Schwierigkeiten bei der Durchführung der hygienischen Bekämpfungsmaßnahmen (Bangsche Methode).

Die Unschädlichkeit des Bovovaccins dürfte auch anerkannt sein, vorausgesetzt, daß die oben wiedergegebenen Vorschriften genau beachtet sind. Die unglücklichen Zufälle, wie sie Marks[65, 66]) und einigen anderen begegnet sind, sind durch Außerachtlassung der Marburger Bestimmungen verschuldet. Die ausgedehnten Erfahrungen, über die Lorenz[64]), Strelinger[91]) und Ebeling[27]) berichten, dürften das zur Genüge beweisen. Letzterem ist bei der Impfung von über 1100 Kälbern kein einziger Unglücksfall zugestoßen*).

Die erste Impfung hat in der Regel keine oder nur eine sehr mäßige, die zweite eine etwas stärkere aber das Wohlbefinden der Tiere in keiner Weise alterierende Temperaturerhöhung zur Folge. Die Kälber entwickeln sich normal weiter, nehmen wie Strelinger ad hoc geprüft hat, auch normal an Gewicht zu. Nur bereits tuberkulöse Rinder reagieren auf die Schutzimpfüng heftiger, so daß, wie erwähnt, die Erstimpfung einen gewissen diagnostischen Wert besitzt. In mehrfachen Fällen hat sich gezeigt, daß sie nicht nur tuberkulöse Herderkrankungen des Organismus anzeigt, sondern auch auf stattgehabte Tuberkuloseinfektionen hinweist. die noch nicht zur Herdbildung geführt haben.

Die Befürchtung, daß etwa durch die Schutzimpfung selbst eine Tuberkulose, also eine „Impftuberkulose“ erzeugt werden könne, konnten wir schon bei Inaugurierung der Impfungen mit absoluter Bestimmtheit auf Grund unserer reichen Erfahrung zurückweisen. Wenn trotzdem Autoren sich für die Annahme einer Impftuberkulose auf Grund des Befundes von Tuberkulose bei geimpften Tieren entschieden haben, so beweist das eben nur ihre mangelhafte Kritikfähigkeit. Im übrigen können wir, was diesen Punkt betrifft, auf die Kritik Hutyras[49]) verweisen, sowie auf die von Ebeling festgestellte absolute Tuberkulosefreiheit von 37 in der Praxis schutzgeimpften Rindern, ein Befund, der sich inzwischen bei vielen Sektionen wiederholt hat. Wenn in irgendeinem Fall, so ist bei solchen Beobachtungen angeblicher Impftuberkulose, ein sehr vorsichtiger Gebrauch des „Post hoc, ergo propter hoc“ anzuempfehlen. Die Frage der Impftuberkulose kann als abgetan gelten.

Was nun die Beurteilung des Erfolges der Schutzimpfung in der Praxis betrifft, so ist diese schwerer als bei den meisten übrigen Krankheiten. Mehrere Gründe sind hierfür verantwortlich zu machen. Bei einer so chronisch verlaufenden Krankheit, wie die Tuberkulose es ist, können wir zunächst nicht, wie bei den akut und stürmisch verlaufenden Infektionen in kurzer Zeit entscheiden, ob das Impfverfahren von Nutzen gewesen ist oder nicht. Wir müssen also die Tiere lange beobachten und das ist oft mit Schwierigkeiten verknüpft bei dem Wechsel des

---

*) Ein durch den Mecklenburger-Strelitzer landwirtschaftlichen Hauptverein an den deutschen Reichskanzler eingesandter Bericht vom 5. XI. 06 ergänzt noch diese Erfahrungen: „Es sind im Lande unter Kontrolle des Hauptvereins im Laufe von 3 Jahren gegen 3000 Impfungen mit Bovovaccin ausgeführt worden. Erkrankungen der Tiere infolge der Impfung mit Bovovaccin haben niemals stattgefunden.“

Standortes, des Besitzers etc. Weiterhin ist es im Einzelfall sehr schwer, um nicht zu sagen unmöglich, zu entscheiden, ob nicht ein Rind bereits vor der Schutzimpfung mit Tuberkulose infiziert war. Wenn uns auch vorhergehende Tuberkulinprüfungen oder Beobachtung der Schutzimpfungsreaktion gewisse Anhaltspunkte geben, die für Schutzimpfungen im großen sogar sehr wertvoll werden können, so geben sie doch keine absolute Garantie weder nach der einen noch nach der anderen Seite hin.

Ferner sei noch darauf hingewiesen, daß die experimentellen Feststellungen ergeben haben, daß erst ca. drei Monate nach der Schutzimpfung die volle Immunität gegen künstliche Infektionen eintritt. Es ist wohl wahrscheinlich, daß auch gegen die natürliche Infektion erst nach Ablauf dieser Zeit Immunität eintritt. Die in dieser Zeitperiode nach Ausführung der Schutzimpfung stattfindenden Infektionen mit positivem Infektionserfolg dürfen also nicht ohne weiteres als Mißerfolg der Schutzimpfung gedeutet werden, ebensowenig wie man die kurz nach Ausführung der Lyssaschutzimpfung sterbenden Individuen als Mißerfolge des Vaccins ansieht, weil in diesen Fällen die Schutzimpfung zu spät kam. Da das Gleiche für die Rindertuberkuloseimmunisierung gilt, kann diesem Moment große praktische Bedeutung zukommen beispielsweise in Gegenden, wo die Ernährung der jungen Kälber mit Milch aus einer Sammelmolkerei stattfindet, die fast immer Tb. in infektionstüchtiger Menge enthält. Es wird also für die Praxis nötig sein, dieser Tatsache dadurch Rechnung zu tragen, daß man die Kälber trotz der Schutzimpfung vor der Milchinfektionsgefahr sorgfältig schützt*).

Das souveräne Mittel zur Entscheidung, ob ein Rind tuberkulös erkrankt ist oder nicht, ist das Tuberkulin. Für die Anwendung des Tuberkulins als diagnostisches Mittel bei schutzgeimpften Rindern stoßen wir aber auf eine Schwierigkeit. Denn diese Tuberkulinüberempfindlichkeit tritt, wie wir genauer in dem Artikel „Tuberkulin" dieses Handbuches ausgeführt haben, auch bei den schutzgeimpften Tieren ein, ohne daß sich Herderkrankungen bei ihnen finden. Es kann also bei Anwendung der Tuberkulindiagnose als Mittel zur Entscheidung der Brauchbarkeit des Rindertuberkuloseschutzmittels die durch die Schutzimpfung erzeugte Tuberkulinüberempfindlichkeit eine Herderkrankung an Tuberkulose vortäuschen.

Schon in dem am 12. März 1903 zu Wien gehaltenen Vortrage hat sich von Behring über die Bedeutung des Tuberkulins als Tuberkuloseerkennungsmittel bei schutzgeimpften Rindern sehr vorsichtig ausgesprochen, indem er sagte: „Es bedarf noch längerer Zeit fortgesetzter Untersuchungen, ehe über den Wert der Tuberkulinprüfungsergebnisse für die Wirksamkeit der immunisierenden Behandlung ein abschließendes Urteil ausgesprochen werden kann." Wenn auch zurzeit ein völlig ab-

*) Der Landwirt entschließt sich aber nur ungern seine Kälber mit erhitzter Milch zu ernähren, da erfahrungsgemäß dieselben bei Ernährung mit roher Milch besser gedeihen und erhitzte Milch das sog. Kälbersterben oft sehr befördert. Um den Landwirt aus dem Dilemma — Tuberkuloseinfektionsgefahr auf der einen, Verluste in der Aufzuchtperiode durch erhitzte Milch auf der anderen Seite — zu befreien, dürfte sich vielleicht das von Much und dem Verf. (Beiträge zur Klinik der Tuberkulose, Bd. V und Berl. klin. Wochenschr., Bd. XXX, XXXI) ausgearbeitete „Perhydrase-Sterilisierungsverfahren" der Milch empfehlen, das die Tb. sicher vernichtet, ohne der Milch im übrigen ihren Rohmilchcharakter zu nehmen. Vergleichende Aufzuchtversuche von Kälbern mit erhitzter Milch einerseits und Perhydrasemilch anderseits sind zurzeit im Gange.

schließendes Urteil in diesem Sinne noch nicht möglich ist, so scheint es trotzdem, daß das Tuberkulin, zu richtigem Zeitpunkt angewandt, uns tuberkulöse Herderkrankungen auch unter den schutzgeimpften Rindern mit der gleichen Sicherheit anzeigen wird, wie in nicht immunisierten Beständen.

Nach Lignières ist die Bedeutung des Tuberkulins als Diagnosticum bei vaccinierten Rindern auch noch nach der Richtung beschränkt, daß bei vorhandener Tuberkulose die Reaktion ausbleibt. Das trifft nach unseren Erfahrungen zwar ab und zu für vaccinierte und nachher experimentell mit großen Dosen virulenter Tb. geprüfter Rinder zu, nicht aber für die hier nur in Frage kommenden natürlichen Infektionen.

Nach unseren Erfahrungen weist eine ein Jahr nach der letzten Schutzimpfung ausgeführte und positiv ausgefallene Tuberkulinprobe mit großer Wahrscheinlichkeit auf bestehende Herderkrankungen hin, während umgekehrt das Ausbleiben der Reaktion in der Regel auch Freisein von Tuberkulose garantiert.

Die Beachtung dieser Erfahrungen ist dringend nötig, wenn man zu einem gerechten Urteil über den Wert der Schutzimpfung kommen will. Es ist wohl kaum nötig hinzuzufügen, daß es außerordentlich erwünscht ist, wenn genaue Daten über die Tuberkulosedurchseuchung eines Bestandes auf Grund von Tuberkulinprüfungen vor Einführung der Schutzimpfung vorliegen. Solchen Besitzern, welche mit der Schutzimpfung noch nicht begonnen haben, ist zu empfehlen, vor Beginn derselben ihren Bestand mit Tuberkulin durchzuprüfen, um für die Stärke der Durchseuchung einen zahlenmäßigen Ausdruck zu bekommen. Man kann dann von Jahr zu Jahr verfolgen, welchen Einfluß auf die Reaktionszahlen die Einführung und konsequente Durchführung der Schutzimpfung hat. Noch einmal ausdrücklich hervorzuheben ist aber, daß nur den frühestens ein Jahr nach Abschluß der Schutzimpfung ausgeführten Tuberkulinprüfungen ein entscheidender Wert zukommt. Wo sich Gelegenheit bietet, mit den schutzgeimpften Tieren nicht immunisierte Rinder des gleichen Alters zu vergleichen, wird man natürlich besonders wertvolle Daten erhalten können. Bei allgemeiner Durchführung der Impfung aber, muß der Vergleich mit den Reaktionszahlen früherer Jahre den Maßstab für das Gesamturteil bilden.

Von diesen Grundsätzen ausgehend hat Verf. im Juli 1905 eine Gesamtstatistik auf Grund von Fragebogen aufgestellt. Von den kleineren Einzelberichten soll nur summarisch mitgeteilt werden, daß alle Berichterstatter unserer früheren Behauptung von der absoluten Unschädlichkeit der Schutzimpfung, ihrer leichten technischen Ausführbarkeit, ihrer praktischen Durchführbarkeit beistimmen. Was die Beurteilung des Nutzens der Schutzimpfung betrifft, so soll hier nur berichtet werden über die Erfahrungen, die in drei großen Impfzentren — Mecklenburg, Teschen und Sárvár — gewonnen sind, vor allem deshalb, weil hier ein nach allen wissenschaftlichen Grundsätzen verarbeitetes Material vorliegt. Die betreffenden Impfärzte haben nämlich die auf die Schutzimpfungen folgenden Reaktionen in jedem Einzelfall genau verfolgt. Sie haben weiter durch sorgfältig ausgeführte Schlachtungen und Tuberkulinproben den Erfolg der Schutzimpfung kontrolliert und endlich sind sie in der Lage, in zuverlässigen Zahlen uns die Stärke der Tuberkulosedurchseuchung ihrer Bestände vor Einführung der Schutzimpfung anzugeben, so daß auf Grund dieser Berichte schon ein Urteil sehr gut möglich ist.

Die zahlreichsten Impfungen hat EBELING in Woldegk in Mecklenburg vorgenommen. Die epizootischen Verhältnisse hinsichtlich der Tuberkulosedurchseuchung sind in den Beständen, in denen EBELING die Impfungen durchgeführt hat, besonders ungünstige. EBELING hat festgestellt, daß vor Einführung der Schutzimpfung der Prozentsatz der tuberkulinreagierenden Tiere bei den zweijährigen und älteren Tieren 80—100 beträgt; aber, wie aus seinem Bericht ersichtlich, ist der Prozentsatz der reagierenden auch unter den jüngeren Altersklassen ein exorbitant hoher und EBELING führt wohl mit Recht die starke Tuberkulosedurchseuchung auf die Ernährung der jungen Kälber mit nicht pasteurisierter Milch aus einer Sammelmolkerei zurück. EBELING ist in der Lage, über Schlachtungen und sorgfältig ausgeführte Sektionen von 37 Impflingen zu berichten. Von diesen erwiesen sich 36 absolut tuberkulosefrei, während bei einem Impfling Tuberkulose festgestellt wurde, die aber, wie EBELING in seiner Publikation in der Berliner tierärztlichen Wochenschrift betont, höchstwahrscheinlich auf Infektion vor der Schutzimpfung bezogen werden muß. Besondere Bedeutung bekommen die Sektionsergebnisse durch die weitere Mitteilung EBELINGS, daß nicht schutzgeimpfte Rinder aus diesen Beständen in der Regel in 30 % aller Fälle Tuberkulose bei der Schlachtung aufweisen. EBELING hat nun unter seinen damals 2—3jährigen Impflingen auch Tuberkulinproben vorgenommen und dabei festgestellt, daß allerdings in etwa 28 % der Fälle Reaktion eintrat. Dies Ergebnis machte uns bezüglich des Erfolges der Impfung recht stutzig; aber EBELING versichert, daß der Erfolg im Vergleich zu seinen früheren Erfahrungen als ein relativ günstiger bezeichnet werden müsse. Hinzu kommt aber weiter, daß gerade die älteren von EBELING geprüften Impflinge nicht einer typischen Schutzimpfung unterzogen sind, da sie zum großen Teil nur einmal und mit der Hälfte der gewöhnlichen Erstimpfungsdosis injiziert wurden.

Recht günstige Ergebnisse lieferten die Versuche auf den Gütern S. K. u. K. Hoheit des Erzherzogs Friedrich von Österreich zu Teschen, wo vom Spätsommer des Jahres 1903 ab die Kälber der Schutzimpfung unterzogen wurden. Es handelt sich hier ebenfalls um meist stark verseuchte Bestände und ich bin in der Lage durch Tuberkulinprüfungsergebnisse, die vor Einführung der Schutzimpfung gewonnen wurden, den Grad der Tuberkulosedurchseuchung genauer zu bezeichnen und dies geschieht übersichtlich in der nachfolgenden Tabelle:

Tabelle 1.

Tuberkulosedurchseuchung

der Rinder zu T. in Prozenten der tuberkulinreagierenden Tiere vor Einführung der Schutzimpfung

	0—1jährige	1—2jährige	2jährige und ältere
Es reagierten	46,0 %	67,4 %	87,5 %

Die Zunahme der Tuberkulinreaktionen mit wachsendem Alter, sowie den erheblichen Grad der Tuberkulosedurchseuchung demonstriert diese Tabelle sehr deutlich.

Die Schutzimpfung wurde hier im Spätsommer des Jahres 1903 eingeführt. Es sind im ganzen 573 Tiere schutzgeimpft und 317 Impflinge sind im Juni 1905 mit Tuberkulin geprüft worden. Wir sind nun zum Zweck vergleichender statistischer Untersuchungen nicht nur auf den Ver-

gleich mit der Tabelle 1, also der früheren Tuberkulosedurchseuchung des Bestandes angewiesen, sondern in der Lage, direkt die Tuberkulosedurchseuchung unter den Impflingen mit nicht geimpften Kontrolltieren zu vergleichen, da das Impfverfahren nicht systematisch zur Anwendung kam. Gleichzeitig ist in diesem Bestande das Bangsche Verfahren, wenn auch durchaus nicht konsequent, angewendet worden; ich schicke aber voraus, daß die Bangschen Forderungen auf die schutzgeimpften Kälber nicht die geringste Anwendung gefunden haben. In der statistischen Aufstellung ist mit Recht ein großer Wert auf die Unterscheidung der Kälber natürlicher und künstlicher Aufzucht (d. h. Fütterung mit sterilisierter Milch) gelegt worden. Das auf Grund dieser Berichte gewonnene statistische Gesamtergebnis habe ich in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Ergebnis von Tuberkulinprüfungen in T. zwei Jahre nach Einführung der Schutzimpfung (2—3jährige Rinder).

Es reagierten:

	Schutzgeimpfte Rinder	Nicht schutzgeimpfte Rinder
A. Natürlich aufgezogene Rinder	6,4 %	40,0 %
B. Künstlich (mit sterilisierter Milch) aufgezogene Rinder	7,1 %	8,4 %

Diese Tabelle ist in mehrfacher Hinsicht recht lehrreich. Sie zeigt zunächst, welchen erheblichen Einfluß auf die Tuberkuloseinfektion die Art der Aufzucht hat, wenn man die beiden Rubriken über die nicht geimpften Tiere vergleicht. Weiter erkennt man aus den beiden ersten nebeneinandergestellten Rubriken, welche die Kälber natürlicher Aufzucht betreffen, daß die Schutzimpfung unter den in Teschen waltenden Bedingungen den Prozentsatz der tuberkulinreagierenden Rinder erheblich vermindert hat. Die beiden unteren Spalten liefern scheinbar das merkwürdige Ergebnis, daß die Schutzimpfung etwa denselben Effekt hat, wie die Aufzucht mit steriler Milch, da der Prozentsatz tuberkulinreagierender nicht geimpfter Rinder nur um weniges geringer ist, als der nicht schutzgeimpften Tiere. Es ist aber zu beachten, daß nach der ausdrücklichen Angabe des amtlichen Berichtes auf die nicht geimpften Rinder auch die übrigen Bangschen Forderungen, insbesondere Isolierungsmaßnahmen, angewandt wurden, während die immunisierten Tiere in den durchseuchten Beständen belassen wurden. Auffallend erscheint weiter, daß der Prozentsatz der tuberkulinreagierenden schutzgeimpften und mit sterilisierter Milch aufgezogenen Rinder größer ist, als der entsprechenden natürlich ernährten schutzgeimpften Kälber. Es ist dies darauf zurückzuführen, daß die Ernährung mit sterilisierter Milch gerade in den am stärksten durchseuchten Beständen zur Anwendung kam, während man in den weniger von Tuberkulose befallenen Herden bei der natürlichen Aufzucht blieb. Aus dieser sorgfältigen Statistik geht hervor, daß bei sachgemäßer Anwendung des Impfverfahrens dasselbe auch unter schwierigen Bedingungen den Prozentsatz der Tuberkulinreaktionen unter den 2—3-jährigen Rindern erheblich herunterdrücken kann. Nachzutragen ist noch, daß als positive Tuberkulinreaktionen diejenigen bezeichnet worden sind, bei denen sich eine Erhöhung der Temperatur gegen die Anfangstemperatur um mindestens 0,6° feststellen ließ.

Sehr ausgedehnte Impfungen sind auf den Gütern S. K. Hoheit des Prinzen Ludwig von Bayern zu Sárvár in Ungarn ausgeführt worden, und zwar wird hier die Schutzimpfung seit vier Jahren in systematischer Weise durchgeführt. Auch hier soll der Einfluß des Schutzimpfverfahrens in ähnlicher Weise auseinandergesetzt werden; zu beachten ist aber, daß als positive Tuberkulinreaktion hier nur die Fälle betrachtet werden, wo eine Erhöhung der Temperatur um mindestens 1° eingetreten ist, während Temperaturerhöhungen von 0,6° bis 1° als zweifelhafte Reaktionen bezeichnet sind. Die aus der sorgfältigen Statistik STRELINGERS gewonnenen Ergebnisse sind deshalb besonders interessant, weil in Sárvár, wie erwähnt, die Schutzimpfung konsequent und systematisch durchgeführt wurde.

Tabelle 3.

Tuberkulose-Durchseuchung

der Rinder zu S. in % der tuberkulinreagierenden Tiere vor Einführung der Schutzimpfung.

Es reagierten nicht . . . . 31,7 %,
es reagierten zweifelhaft . . . . . . 9,5 %,
es reagierten . . . . 58,8 %.

Die Tabelle 3 gibt ein Bild der Tuberkulosedurchseuchung in Prozent der tuberkulinreagierenden Tiere vor Einführung der Schutzimpfung und bezogen auf 3—5jährige Rinder. Die auf den weiteren Tabellen dargestellten Tuberkulinprüfungsergebnisse schutzgeimpfter Rinder können also unmittelbar mit Tabelle 3 verglichen werden. Auf den nachfolgenden Tabellen 4 und 5 sind die zweifelhaften Reaktionen den positiven zugezählt worden.

Tabelle 4.

Ergebnis der Tuberkulinprüfungen

von 590 vom Jahre 1902 bis Dezember 1904 schutzgeimpften Rindern zu S.

Es reagierten . . . . 5,6 %.*)

Die Tabelle 4 enthält zunächst eine Gesamtstatistik über das Ergebnis der Tuberkulinprüfungen von 590 Impflingen und ein Vergleich mit der Tabelle 3 zeigt, daß auch hier nach Einführung der Schutzimpfung der Prozentsatz tuberkulinreagierender Tiere erheblich herabgesetzt ist. Die STRELINGERschen Arbeiten zeichnen sich aber noch dadurch besonders aus, daß hier die auf die Schutzimpfung folgenden Reaktionen nicht nur sehr sorgfältig registriert, sondern auch für die statistische Zusammenstellung verwertet sind. Von den 590 Impflingen zeigten nämlich 62 Tiere sehr lebhafte Reaktionen, vielfach sogar Drüsenschwellungen nach der Schutzimpfung, so daß sie schon zum Zeitpunkt der Schutzimpfung von STRELINGER als tuberkuloseinfiziert bezeichnet wurden.

---

*) Einer mündlichen Mitteilung von STRELINGER zufolge ist der Prozentsatz der reagierenden Tiere bei einer im Juli 1906 vorgenommenen Tuberkulinprüfung aller geimpften Rinder noch weiter zurückgegangen. Besonders wichtig ist, daß auch die ältesten, jetzt schon 5—6jährigen Rinder an den Reaktionszahlen nicht stärker beteiligt sind als sie es auch in früheren Jahren waren. Das deutet darauf hin, daß die Immunität gegenüber den natürlichen Infektionsbedingungen lange anhält.

Tabelle 5.

Ergebnis der Tuberkulinprüfungen

	I. Bei Rindern, die auf die Schutzimpfung lebhaft reagierten, deshalb als tuberkuloseverdächtig bezeichnet wurden.	II. Bei den übrigen, nicht tuberkuloseverdächtigen Impflingen
Es reagierten . . .	37 %	1,5 %.

Die erste Rubrik der Tabelle 5 zeigt nun, daß die positiven Reaktionen hauptsächlich die zur Zeit der Schutzimpfung schon verdächtigen Tiere betreffen, während, wie die zweite Rubrik ergibt, die Zahl der tuberkulinreagierenden übrigen Impflinge sich nicht über 1,5 % erhebt.

Tabelle 6.

Ergebnis der Tuberkulinprüfungen

bei schutzgeimpften und nicht schutzgeimpften, gleich alten und in gleicher Weise ernährten Rindern, die unter denselben Bedingungen (stark durchseuchter Bestand) aufgestellt waren auf dem Hofe zu F.

	I. Schutzgeimpfte Rinder	II. Nicht schutzgeimpfte Rinder
Es reagierten nicht	100 %	25 %,
es reagierten zweifelhaft . .	—	25 %,
es reagierten	—	50 %.

Eine kleine aber besonders lehrreiche Statistik enthält endlich noch die Tabelle 6, die sich auf 16 immunisierte und 12 unter den gleichen Bedingungen aufgezogene, und in gleichem Stall nebeneinander aufgestellte, gleich alte nicht immunisierte Rinder bezieht. Neun Monate nach Beginn des Versuchs wurden alle Tiere mit Tuberkulin geprüft. Von den schutzgeimpften Rindern reagierte kein Tier; von den nicht immunisierten Rindern reagierten deutlich sechs (= 50 %), zweifelhaft drei (= 25 %). Nur drei Tiere blieben reaktionslos. Das Ergebnis dieses Versuches ist um so bedeutungsvoller, als die immunisierten Rinder selbst nach drei Jahren noch keine Reaktion aufwiesen.

Strelinger[91]) schließt seinen Bericht mit folgenden Worten:

„Wenn man berücksichtigt, daß vor Einführung der Schutzimpfung von den mit den Impflingen gleichaltrigen Rindern, trotz der damals konsequent durchgeführten künstlichen Aufzucht, durchschnittlich 50 % auf Tuberkulin reagierten (die Ziffer für die älteren Rinder war noch höher), wenn ich weiter hervorhebe, daß unsere Impflinge im übrigen nicht den geringsten Isolierungs- oder sonstigen hygienischen Schutzmaßnahmen unterworfen, sondern ohne jede Rücksicht da untergebracht wurden, wo es eben die wirtschaftlichen Verhältnisse erforderten, dann scheint mir die Schlußfolgerung nicht unberechtigt, daß in dem Schutzimpfungsverfahren, wie es v. Behring angibt, das Problem einer rationellen Rindertuberkulosebekämpfung als gelöst zu betrachten ist.“

Soviel kann man aus allen diesen Berichten wohl folgern, daß die Schutzimpfung auch unter praktischen Verhältnissen sich bewährt hat. Ob sie nun in ihrer jetzigen Form das Mittel ist, um mit absoluter Sicherheit die Rindertuberkulose auszurotten, das muß noch dahingestellt bleiben, vor allem deshalb, weil eine Frage noch einer einwandfreien Beantwortung harrt, nämlich die Frage, wie lange die durch die Schutzimpfung erzeugte Immunität anhält. Man könnte nun auf experimentellem Wege wiederum prüfen, wie lange nach der Schutzimpfung sich ein Rind noch geschützt gegen eine künstliche Infektion erweist. Es wäre aber nicht berechtigt, wenn man, weil z. B. nach drei Jahren eine solche Immunität auf experimentellem Wege nicht mehr nachgewiesen werden kann, nun daraus folgert, daß auch gegenüber den natürlichen Bedingungen das Rind nicht mehr genügenden Schutz besitzt. Es könnte wohl sein, daß noch ein Rest von Immunität geblieben ist, der experimentell nicht mehr nachweisbar ist, der aber gegenüber der natürlichen Infektion ausreicht. Nicht ohne weiteres berechtigt wäre ferner auch die weitere Schlußfolgerung, daß, weil die Immunität eines Rindes nach gewisser Zeit nicht mehr experimentell nachweisbar ist, die Schutzimpfung wiederholt werden müsse. In der Praxis liegen die Verhältnisse ja so, daß jedes Rind wohl wiederholt Infektionen mit Tuberkulose während seines Lebens erleidet. Trifft eine solche Infektion nun ein schutzgeimpftes Rind, so ist es a priori wohl möglich, daß derartige natürliche Infektionen die durch die künstliche Infektion erzeugte Immunität noch erhöhen. Fallen aber diese späteren natürlichen Infektionen weg, wird also die Immunität nicht verstärkt, sondern verschwindet allmählich, so ist das ja in diesem Fall nicht bedenklich, da ja dann infolge des Fehlens natürlicher Infektionsbedingungen eine erhöhte Widerstandskraft der Tiere unnötig ist. Doch das alles sind Fragen, die erst die Praxis entscheiden muß. Vorläufig sind absolut sicher beweisende Daten noch nicht vorhanden; das ist ja auch nicht verwunderlich, da das Verfahren noch so jung ist. Vorläufig gehen wir so vor, daß wir an der Schutzimpfung des Rindes nur im ersten Lebensjahre festhalten und weitere Schutzimpfungen für überflüssig erklären, bis zwingende Gründe für die Notwendigkeit ihrer Wiederholung vorliegen. Was also für die Entscheidung noch nicht beantworteter praktisch bedeutsamer Fragen notwendig ist, muß uns die Praxis, die große Statistik lehren.

Schlußbemerkungen.

Der Gedanke gegen eine Krankheit zu immunisieren, bei der wir bei oberflächlicher Betrachtung so wenig von Immunität erkennen, hat auf den ersten Blick etwas Befremdendes, fast Phantastisches. Denn wenn wir tuberkulöse Individuen nach Eintritt von gewissen Remissionen im Krankheitsverlauf doch immer wieder von neuen Schüben der Krankheit, von neuen Propagationen des Virus befallen sehen, scheint es in der Tat ein müssiges Unterfangen, gegen eine derartige Krankheit zu immunisieren und Wege einzuschlagen, für deren Gangbarkeit uns die Natur anscheinend keinen Wegweiser leiht. Und doch liefert gerade die genaue Beobachtung des tuberkulösen, ja selbst des phthisischen Individuums Fingerzeige für die Deutung des Wesens der im Experiment künstlich herstellbaren Immunität.

Die Untersuchung des Serums künstlich tuberkulose-immunisierter Individuen auf antitoxische Fähigkeiten hat im wesentlichen negative Er-

gebnisse gehabt. Bakteriolytische Kräfte finden wir wohl gelegentlich angedeutet, ebenso wie agglutinierende, praezipitierende und „opsonische“ Wirkungen des Serums; ihre Beziehung zur Immunität erscheint aber noch recht fraglich. Die tierexperimentellen Beweise für die Schutz- und Heilkraft des Blutes tuberkuloseimmunisierter Individuen bedürfen auch noch sehr der Nachprüfung.

Nun haben die experimentellen Untersuchungen der letzten Jahre eine wichtige Beobachtung gefördert, daß nämlich die Tuberkulose eine primäre Erkrankung des Lymphsystems darstellt. Ich verweise bezüglich der Beweise für die Richtigkeit dieser Anschauung auf die Arbeiten von Behrings[14]) und Weleminskys[96,97]). Letzterer speziell zitiert ein beachtenswertes Experiment, dessen Beobachtung schon auf Koch[57]) zurückgeht. Das tuberkulöse Meerschwein reagiert nämlich auf eine erneute Tuberkelbazilleninfektion ganz anders als das normale Tier; denn die Lokalerkrankung und sonst nachfolgende Lymphdrüsenaffektion bleibt bei solchen Tieren unter geeigneten Versuchsbedingungen aus. Diese Beobachtung ist auch von Deutsch[23]) und Bail[2]) gemacht worden. Es erweisen sich also solche Tiere gegen eine erneute Infektion, eine „Superinfektion“, geschützt. Das gleiche dürfte auch für das Rind sowohl nach künstlich erzeugter Tuberkulose (von Behring) als bei bestehender Spontanerkrankung erwiesen sein. (M-Fadyean, Vallée). Beim Menschen sehen wir nun die Natur dieses Experiments sich ebenfalls täglich wiederholen, da der bereits tuberkulöse oder phthisische Mensch in der Regel ungestraft täglich massenhaft Tuberkelbazillen seine Mund-, Rachen- und Darmschleimhaut passieren lassen kann, ohne daß diese oder die zu ihnen gehörigen Lymphapparate erkranken. Nach Weleminsky liegt hier eine Nichtinfizierbarkeit des Lymphsystems vor, die in demjenigen Moment des Tuberkuloseprozesses einsetzt, in dem größere Mengen Tuberkelbazillen in das Blut gelangen. Die Bovovaccination bedeutet nichts anderes als die Wiederholung dieses Experiments; denn auch hier überschwemmen wir die Blutbahn plötzlich mit Tuberkelbazillen, allerdings in einer Form, daß der betr. Organismus selbst keinen Schaden dabei erleidet. Wird aber durch die Bovovaccination ebenfalls eine Nicht-Infizierbarkeit des Lymphsystems geschaffen, so bewirken wir durch dieselbe gerade eine Immunität der Eintrittspforte für das Tuberkulosevirus, was praktisch besonders bedeutsam erscheint.

Es muß zugegeben werden, daß in dem eben Gesagten noch viel Hypothetisches steckt, ganz abgesehen davon, daß die Hauptsache, nämlich der Grund für jene Nicht-Infizierbarkeit des Lymphsystems noch nicht aufgedeckt ist. Möglich, daß wir auch das, was wir jetzt schon glauben als ziemlich sicher annehmen zu dürfen, später einmal wieder wie so manche andere Hypothese ad acta legen müssen. Vorläufig aber leistet uns diese Hypothese das, was wir von einer solchen in der Wissenschaft verlangen: Sie macht uns die beobachteten Naturphänomene ungefähr begreiflich, sie weist auf neue Wege experimenteller Forschung.

Abgeschlossen im Juli 1907*).

---

*) Die neuesten Arbeiten konnten nicht mehr berücksichtigt werden, da der Autor seit Juli v. J. sich auf einer wissenschaftlichen Expedition in Argentinien befindet. Anm. d. Redakt.

Literatur.

1) Babes, Congrès de la tuberculose, Paris 1893.
1a) Arloing, Veterinärkongreß, Budapest 1905.
2) Bail, Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 30.
3) Baumann, Medicinische Klinik 1905, Nr. 46.
4) Baumgarten, v., Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 43.
5) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 3.
6) Behring, v., Nobel-Vorlesung, Nordisk Archiv 1902.
7) Ders., Zeitschr. für Tiermedizin, N. F., Bd. VI.
8) Ders., Berliner tierärztl. Wochenschr. 1902, Nr. 47.
9) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 11.
10) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 12.
11) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 39.
12) Ders., Naturforscherversammlung 1903.
13) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 6.
14) Ders., Beitr. zur exper. Therapie, Heft 8.
15) Ders., Beitr. zur exper. Therapie, Heft 10.
16) Ders., Beitr. zur exper. Therapie, Heft 11.
17) Ders., Archiv des Deutschen Landwirtschaftsrats, 30. Jahrg.
17a) Ders., Behringwerk-Mitteilungen, Heft 2.
18) Ders., Römer und Ruppel, Beitr. zur exper. Therapie, Heft 5.
19) Cavagnis, C. R. de l'acad. des sciences 1886.
20) Calmette, Academie des sciences, 11. Juin 1906.
21) Courmont et Dor, Sem. méd. 1890, Nr. 52.
22) Ders., Congrès de la tub. 1891.
23) Deutsch, Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 37.
24) Dieudonné, Münch. med. Wochenschr. 1905, Nr. 17.
25) Eber, Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 53.
26) Ders., Zeitschr. für Tiermedizin, N. F., Bd. IX.
26a) Ders., Bericht aus dem Leipziger Veterinärinstitut 1906.
27) Ebeling, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1904.
28) Fraenkel und Baumann, Zeitschr. für Hygiene, Bd. LIV.
29) Friedmann, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 2.
30) Ders., Zeitschr. für Tuberkulose und Heilstättenwesen, Bd. IV, pag. 5.
31) Ders., Centralbl. für Bakteriol., Bd. XXXIV, pag. 7.
32) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 26.
33) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 50.
34) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 5.
35) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 12.
36) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 46.
37) Ders., Therap. Monatshefte 1904, Nr. 3.
38) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 5.
39) Grancher et Ledoux-Lebard. Bull. de l'acad. de méd. 1890.
40) Ders., Arch. de méd. exp. et d'anat. pathol. 1891, Tome II.
41) Grancher et Martin, Sem. méd. 1890, Tome XXXVII.
42) Ders., Congrès de la tub. 1891.
43) Ders., Revue de la tub. 1893, Tome I.
44) Héricourt et Richet, C. R. de la Soc. de biol. 1890.
45) Ders., C. R. de l'acad. des sciences 1892, 23, Tome CXIV.
46) Ders., Études exper. et clin. sur la tub. 1892, A. III, Fasc. 2.
47) Ders., Le bull. méd. 1892, pag. 29 und 481.
48) Hutyra, Beiträge zur experim. Therapie, Heft 9.
49) Ders., Tuberkulosis 1905.
50) Ders., Referat für den Veterinärkongreß Budapest 1905. Sep.-Abdruck.
51) Klemperer, Zeitschr. für klin. Med., Bd. XLVIII.
52) Ders., Zeitschr. für klin. Med., Bd. LVI.
53) Klimmer, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1904, Nr. 30.
54) Ders., Berliner tierärztl. Wochenschr. 1904, Nr. 49.
55) Ders., Berliner tierärztl. Wochenschr. 1905, Nr. 17.
57) Koch, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 3.
58) Koch, Schütz, Neufeld, Miessner, Zeitschr. für Hygiene, Bd. LI.
59) Kolle, Ref. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 35.
60) Levy, Centralbl. für Bakteriol., Bd. XXXIII.
61) Ders., Med. Klinik 1905, Nr. 23.

62) LIBBERTZ und RUPPEL, Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 4 u. 5.
62a) LIGNIÈRES, Recneil de Médicine Vét., Bd. LXXXIII.
62b) Ders., Veterinärkongreß, Budapest 1905.
63) LORENZ, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1903, Nr. 48.
64) Ders., Zeitschr. für Tiermedizin, Bd. IX.
65) MARKS, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1904, Nr. 24.
66) Ders., Berliner tierärztl. Wochenschr. 1905, Nr. 3.
67) MARTIN, Études exp. et clin. sur la tub. 1888, Tome II.
68) MEYER und RANSOM, Archiv für experim. Pathol. und Pharmakol., Bd. XCI.
69) MAC FADYEAN, The Journ. of comparative pathology an therapeutics 1901, pag. 136 und 1902, pag. 60.
70) MELDE, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1902, Nr. 40.
71) MOELLER, Zeitschr. für Tub., Bd. V, Heft 3.
72) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 12.
73) NEUFELD, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 37.
74) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 18.
75) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 34.
75a) OTTO, Arbeiten aus dem Kgl. Institut für experim. Therapie, Frankfurt. Heft 2.
76) PATERSON, The Lancet 1897.
77) PEARSON und GILLILAND, Journ. of comp. med. and veterin. archives, Philadelphia 1902.
78) Ders., Univ. of Pennsylv. Med. Bull. 1905. Vol. XVIII, pag. 2.
79) RICHET, Sem. méd. 1890, Nr. 51.
80) Ders., Sem. méd. 1891, Nr. 5.
81) Ders., Sem. méd. 1892, Nr. 5.
82) RÖMER, Beiträge zur experim. Therapie, Heft 6.
83) Ders., Beiträge zur experim. Therapie, Heft 7.
84) Ders., Tuberkulosis 1904, Bd. V.
85) Ders., Ref. für den Veterinärkongreß, Budapest 1905.
86) Ders., Beiträge zur Klinik der Tuberkulose, Bd. IV.
87) Ders., Hessische landwirtschaftl. Zeitschr. 1906, Nr. 3 ff.
88) Ders., Verhandlungen der Landwirtschaftskammer für Ostpreußen 1906, 23. Jan.
88a) ROSSIGNOL et VALLÉE, Bull. de la Société de Médicine vétérinaire pratique 1906.
89) SCHLEGEL, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1903, Nr. 49.
89a) SCHÜTZ, Verhandlungen des Veterinärkongresses, Budapest 1905.
90) SMITH, Med. Record. 1896.
91) STRELINGER, Zeitschr. für Tiermedizin, N. F., Bd. X.
92) TERRE, Ref. Centralbl. für Bakteriol., Bd. XXXIII.
93) THOMASSEN, Rec. de vét. 1903.
94) Ders., Referat für den Veterinärkongreß, Budapest 1905.
95) TRUDEAU, Ref. Hygien. Rundschau, Bd. V.
95a) VALÈE, Recneil de Médecine Vet., Bd. LXXXIII.
95b) Ders., La tuberculosis bovina — Verlag von Ch. Bouret, Paris 1907.
96) WELEMINSKY, Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 24.
97) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 31 u. 32.

XXX.

Die Vaccination gegen die Peripneumonie (Lungenseuche) der Rinder.

Von

Dr. H. Raebiger,

approb. Tierarzt in Halle a. S.

Zur Geschichte der Lungenseucheimpfungen.

Die um die Mitte des vergangenen Jahrhunderts noch nicht gelöste Frage der Kontagiosität der Lungenseuche[44]) ist nunmehr längst auf Grund von Erfahrungstatsachen dahin entschieden worden, daß die Lungenseuche eine dem Rindergeschlecht eigentümliche Infektionskrankheit ist, welche in der Hauptsache eine ansteckende Lungenbrustfellentzündung (Pleuropneumonia contagiosa boum) darstellt[22]), deren Erreger jedoch erst in neuerer Zeit von Nocard und Roux gefunden worden ist.

Durch Beobachtungen in der Praxis ist schon frühzeitig konstatiert worden, daß Rinder, welche die Lungenseuche einmal überstanden haben, in der Regel eine lebenslängliche Immunität gegen die nochmalige Erkrankung an derselben besitzen[22, 5, 4]).

Infolgedessen machte man alsbald den Versuch, gesunden Tieren die Krankheitsstoffe künstlich einzuführen, um sie nach Überstehen der erfahrungsgemäß milder und gutartiger verlaufenden Impfkrankheit gegen die Lungenseuche unempfänglich zu machen, ähnlich wie es bei der Pockenimpfung geschieht.

Schon von alters her sollen nach Rochebrune[11]) die Mauren in Senegambien ihre Rinder gegen die Lungenseuche geimpft haben, indem sie denselben unter die Haut der oberen Nasengegend die Spitze eines Messers einführten, das mit dem Lungensafte eines der Seuche erlegenen Rindes benetzt war. Nach Sander[48]) und Theiler[17]) glauben die Farmer Südafrikas ihren Rindern dadurch einen Schutz gegen die Seuche zu verleihen, daß sie denselben getrocknete Lungenstücke oder Lungenflüssigkeit und Exsudat aus der Brusthöhle an der Seuche verendeter Tiere unter das Futter mischen bzw. zu saufen geben.

Sieht man jedoch von diesen rein empirischen Impfverfahren ab, so können von den aus wissenschaftlicher Überlegung hervorgegangenen Methoden drei Gruppen der Beurteilung unterzogen werden, nämlich die Impfungen mit Lymphe, mit Kulturen und mit Blutserum.

Impfungen mit Lymphe.

Von den Impfungen mit Lymphe unterscheidet man solche mit Flüssigkeit aus Lungen lungenseuchekranker Tiere — Lungen- oder Primärlymphe — und solche mit aus künstlichen Impfgeschwülsten erhaltener Lymphe — Sekundärlymphe.

Die ersten wissenschaftlichen Impfversuche mit Lungenlymphe im größeren Stil sind von dem belgischen Arzte Willems[56]) in Hasselt in einer Denkschrift über die Lungenseuche des Rindviehs niedergelegt, die er im Jahre 1852 veröffentlicht hat. Er benutzte als Impfmaterial die blutig-seröse Flüssigkeit, die er durch Ausdrücken des hepatisierten Teiles der Lungen eines „in der ersten Periode" erkrankten Tieres gewann. In diese Flüssigkeit tauchte er eine Lanzette und machte damit zwei oder drei Stiche in das unterste Ende des Schwanzes des Impflings. Ein einziger Tropfen der Flüssigkeit war angeblich hinreichend, um die Impfung zu bewirken. Von der Lymphegewinnung aus nekrotischen Lungenherden, sowie von der Einimpfung von Speichel oder anderen Körperflüssigkeiten kranker Rinder riet Willems auf Grund von Mißerfolgen ab, desgleichen von anderen Impfarten. Die Flüssigkeit von den an der Seuche erkrankten Rindern herrührend wirkte nach seinen Untersuchungen nur auf die großen Wiederkäuer.

Seitdem sind in fast allen Kulturländern zahlreiche Impfungen vorgenommen worden.

So hat besonders Pasteur[44, 55, 22]) in den Jahren 1881 und 1882 umfangreiche Untersuchungen auf diesem Gebiete angestellt.

Er stellte durch Versuche fest, daß die Lungenflüssigkeit bei Schwanzimpfungen Schwanzverluste verursachte, bei Trielimpfungen aber fast immer den Tod der Impflinge zur Folge hatte. Angesichts der heftigen Wirkung dieses Impfstoffes stellte Pasteur daher eine sogenannte Kälberlymphe her. Mit zwei bis drei Tropfen einer virulenten Lungenflüssigkeit wurden einige Kälber subkutan am Triel oder hinter der Schulter geimpft. Aus der in der Umgebung der Impfstelle entstehenden entzündlichen Anschwellung wurde nach der Tötung des betreffenden Tieres die (Sekundär-)Lymphe in sterile Glasröhrchen eingesogen, dieselben wurden darauf zugeschmolzen und enthielten sodann die etwa sechs bis acht Wochen haltbare Kälberlymphe.

Mit Glyzerin vermischt ist diese Lymphe nach einiger Zeit wirkungslos geworden.

Durch zeitweiliges Überimpfen auf ein anderes Kalb konnte immer wieder neuer Impfstoff gewonnen werden. Einige Tropfen der Lymphe genügten nach Pasteur für die am Schwanz vorzunehmende Schutzimpfung eines ausgewachsenen Rindes. Die Reinheit der Lymphe prüfte er durch mikroskopische Untersuchungen und durch die Aussaat in sterile Nährbouillon.

Auf demselben Prinzip wie das Pasteursche Verfahren[44]), aseptisch Lymphe zu gewinnen, ist auch die Schütz und Steffensche Methode[52–54]) der Lympheentnahme begründet. Nach ihnen wurde in die im Zusammenhang herausgeschnittene, noch warme Lunge mit einem sterilen Messer ein 1 cm tiefer Einschnitt gemacht und durch Auseinanderreißen der Schnittflächen eine größere Trennung des Zusammenhanges hergestellt. Die sich zwischen den Rißflächen ansammelnde Lymphe wurde in erwärmte sterile Pravazsche Spritzen eingesogen und warm verimpft. Desgleichen wurde kalte Lymphe und Gewebsteile aus

erkrankten Lungen verimpft. Als Impfstelle wurde die hintere Fläche des Schwanzes oberhalb der Schwanzquaste empfohlen. Die Impfungen geschahen unter allen Regeln der Antiseptik. Die Impfstiche bzw. Wunden (nach Einführung der Lungenstückchen in eine Hauttasche) wurden mit Sublimatkollodium und Watte verschlossen.

Durch diese Versuche wurde dargetan, daß warme Lymphe eine starke, kalte eine viel schwächere und krankhaft veränderte Lungenteilchen fast gar keine Wirkung hervorriefen. Die nachfolgende Probeimpfung am Triel ergab jedoch, daß auch die Schwanzimpfung mit kalter Lymphe die Impflinge gegen Lungenseuche zu schützen vermochte, denn sie ertrugen dieselbe gut, während die nicht vorgeimpften Kontrollrinder schwer erkrankten oder starben. Ebenso blieben sie gesund, nachdem sie der natürlichen Ansteckung zwischen akut lungenseuchekranken Tieren ausgesetzt worden waren.

Beide Forscher impften mit unverdünnter (1,0—0,5—0,3 ccm) und mit keimfreiem Wasser verdünnter Lymphe und fanden, daß die Menge des verimpften Materials ohne Bedeutung für die Reaktion war. Die spezifische Substanz in der Lungenlymphe hielt sich bei niederen Temperaturen (im Eisschrank) mindestens acht Tage wirksam. Die Reinheit der Lymphe wurde in einigen Fällen durch den Kulturversuch geprüft. Schließlich wurde ein Verfahren ermittelt, um kalte Lymphe, ohne ihre Wirksamkeit zu vernichten, für eine längere Aufbewahrung geeignet zu machen. Hierzu diente die Vermischung der Lymphe mit gleichen Teilen Glyzerin und Einfüllung in Impfröhrchen zu 1 ccm Inhalt. Die Einimpfung von 0,5 ccm dieser Glyzerinlymphe vermochte nach den Versuchsergebnissen ebenfalls gegen die Lungenseuche zu schützen.

Infolge der günstigen Ergebnisse der letzteren Versuche, wurde der speziell in der Provinz Sachsen gehegte Wunsch, die Impfungen auf staatliche Anordnung als Bekämpfungsmittel der Lungenseuche zur Anwendung kommen zu sehen, allgemeiner und fand in der Novelle zum Reichstierseuchengesetz vom 1. Mai 1894 als Zusatz zu § 45 die Anerkennung der gesetzgebenden Faktoren[39]).

Trotz des von Schütz und Steffen ermittelten Verfahrens, die Lungenlymphe durch Glyzerinzusatz längere Zeit wirkungsfähig zu erhalten, war dennoch, wie die spätere Erfahrung gelehrt hat, die Dauer der Haltbarkeit der glyzerinierten Lymphe nur eine beschränkte.

Um daher die erforderlichen Lymphemengen jederzeit zur Verfügung zu haben und in der sicheren Erwartung, daß einwandsfrei ausgeführte Impfungen tatsächlich ein zuverlässiges Mittel zur Tilgung der Lungenseuche werden würden, errichtete der Magdeburger Verein für Landwirtschaft und landwirtschaftliches Maschinenwesen im Jahre 1896 eine Anstalt zur Gewinnung von Lungenseuchelymphe, mit deren Leitung Leistikow betraut wurde[39]).

Die Anstalt hatte nicht allein die Aufgabe, Lymphe aus den Lungen lungenseuchekranker Tiere, die Primärlymphe, anzusammeln, sondern diente auch zur ständigen Erzeugung sekundärer (Kälber-)Lymphe.

Es wurden zu diesem Zwecke Kälber mit 1—2 ccm reiner Primärlymphe hinter der linken Schulter oder am oberen Triel geimpft. Es eigneten sich hierzu ältere Kälber besser als nur einige Woche alte, da letztere schwieriger zu pflegen und empfindlicher gegen äußere Einflüsse sind, sowie eine geringere Empfänglichkeit gegen das Kontagium der Lungenseuche zeigten. Die Lymphegewinnung geschah in der Weise, daß den getöteten Tieren die Haare über der Impfgeschwulst abrasiert, die

darüber liegende Hautpartie desinfiziert und darauf mehrfache Einschnitte in dieselbe gemacht wurden. Nach dem Auseinanderreißen der Unterhaut sammelte sich in den entstandenen Spalten und Taschen allmählich eine gelbliche, fast ganz klare Flüssigkeit an, welche mit sterilisierten Metalllöffeln ausgeschöpft und in sterile Fläschchen gefüllt wurde. Hierzu wurden dann entweder 25 % Glyzerin gesetzt oder die Lymphe ohne Zusatz gelassen. In einem Falle wurde die Brauchbarkeit der Lymphe durch die subkutane Impfung (hinter der Schulter) einer Versuchsfärse (Jungrind) und Nachimpfung mit Primärlymphe geprüft.

Nach der damaligen Ansicht Leistikows besaß die sekundäre Lymphe dieselbe Wirksamkeit wie die primäre und vermochte den Rindern mit ausreichender Wahrscheinlichkeit dieselbe Schutzkraft gegen die Ansteckung zu verleihen.

In der Praxis kamen Dosen von 0,5 - 0,7 ccm zur Anwendung.

Im Jahre 1897 ging diese Einrichtung unter dem Namen „Anstalt zur Gewinnung von Lungenseuchelymphe“ an die Landwirtschaftskammer für die Provinz Sachsen zu Halle a. S. über.

Der Anstalt standen Pütz, A. Schmidt, Nörner und vom Winter 1900 bis zur Einstellung der Impfungen im Jahre 1902 der Verfasser vor[45]).

Zur Gewinnung von Sekundärlymphe fanden nunmehr anstatt der Kälber, Rinder im Alter von 1—4 Jahren Verwendung und wegen besserer Ausnutzung des Fleisches wurden die Injektionen von Primärlymphe nicht mehr hinter der Schulter, sondern nur noch am Triel vorgenommen.

Im übrigen vollzog sich die Lymphentnahme und die Behandlung der Lymphe durch Pütz und Schmidt im Allgemeinen in derselben Weise wie in Magdeburg.

Zur Lymphgewinnung habe ich nur Rinder aus nachweislich lungenseuchefreien Gegenden benutzt, ohne dabei Rücksicht auf Rasse oder Geschlecht zu nehmen.

Als Impfort diente gewöhnlich der linksseitige Triel, nachdem die betreffende Stelle eingeseift, im Umfang eines Handtellers mit dem Rasiermesser von den Haaren befreit, sodann gründlich abgewaschen und darauf sorgfältig mit Alkohol desinfiziert worden war.

In der Regel wurden die Tiere mit Lungen-(Primär-)lymphe vorbehandelt, in Ermangelung derselben fand aber auch frische Sekundärlymphe Verwendung.

Verschiedene Versuche, die Reaktion durch größere Dosen der einzuspritzenden Lymphe möglichst zu beschleunigen und zu erhöhen, blieben erfolglos. Es haben nämlich nachstehende Versuchsrinder auf verschieden große Lymphmengen in folgender Weise reagiert:

Bezeichnung	Geimpft am	Dosis	Art der Lymphe	Resultat
Färse 1 . .	19. Dez. 1900	6 ccm	primäre	reagiert
Färse 2 . .	15. Jan. 1901	10 „	prim. glyc.	„
Färse 3 . .	15. Jan. 01	10 „	sekundäre	„
Färse 4 . .	4. Febr. 01	10 „	primäre	nicht reagiert
Färse 5 . .	13. „ 01	6 „	prim. glyc.	„ „
Färse 6 . .	15. „ 01	6 „	sek. glyc.	„ „
Färse 7 . .	23. „ 01	2,5 „	prim. glyc.	reagiert
Färse 8 . .	5. März 01	3,5 „	„ „	nicht reagiert
Färse 9 . .	21. „ 01	10 „	sekundäre	reagiert

Die Reaktionen traten nicht schneller auf und verliefen nicht heftiger als bei den Rindern, denen nur 0,5 oder 1,0 ccm Lymphe in den Triel injiziert worden war. Demnach übte die Menge des einverleibten Impfstoffes keinen Einfluß auf die Reaktion aus, während es bekanntlich bei den Erregern anderer Seuchen, z. B. des Milzbrandes oder des Schweinerotlaufs von wesentlicher Bedeutung ist, ob kleinere oder größere Kulturmengen verabfolgt werden.

Hatte ein Rind auf die erste Impfung mit frischer Lymphe nicht reagiert, so verlief auch die zweite Impfung, gleichviel mit welcher Art der Lymphe und mit welcher Dosis, ohne Ausnahme reaktionslos.

Bei den reagierenden Tieren nahm die Impfgeschwulst in der Regel stetig an Größe zu. Es konnte jedoch in zwei Fällen beobachtet werden, daß 6 Tage nach der Impfung ein Rückgang der Geschwulst eintrat. worauf drei Tage später wieder eine fortschreitende Zunahme erfolgte.

Sobald die Geschwulst eine bestimmte Größe erreicht hatte, d. h. etwa kindskopf- bis mannskopfgroß geworden war, und es der Zustand des Tieres angezeigt erscheinen ließ, erfolgte — in der Regel 14—24 Tage nach der Infektion — die Tötung des Lymphrindes. Der Körper wurde sodann in Rückenlage gebracht und die Impfgeschwulst nebst Umgebung einer sorgfältigen Reinigung und Desinfektion unterworfen. Darauf wurde die Geschwulst unter aseptischen Kautelen aus den sie einschließenden Haut- und Muskelpartien herausgeschält und gleichzeitig wurden von einem Gehilfen die in den Spalten der Schnitte zusammenfließenden Lymphmengen mit sterilen Metallöffeln in einen ebensolchen Glaszylinder zusammengegossen.

Derartige Impfgeschwülste sind von derber Konsistenz, weißer Farbe und lassen sich hinsichtlich ihrer Struktur am besten mit den Honigwaben eines Bienenstockes vergleichen, nur daß die Lymphe enthaltenden Hohlräume kleiner sind und das auf dem Durchschnitt maschenartige Gerüst dickwandiger ist.

Die Geschwult wurde in etwa fingerdicken Scheiben sofort in große sterile Doppelschalen gelegt, in denen die Lymphe bei Eisschranktemperatur aussickern konnte.

Nach ungefähr 12 Stunden wurden die Scheiben in eine sterilisierte, nach Art der Fruchtpressen konstruierte Metallpresse verbracht und unter einem Mantel von Fließpapier während einiger Minuten mäßigem Drucke ausgesetzt, um eine möglichst ergiebige Ausbeute zu erzielen. Die so gewonnene Lymphe wurde dann in sterile Glaszylinder abgegossen, zum vierten Teile mit Glyzerinum purum versetzt und zur gleichmäßigen Verteilung etwa eine Viertelstunde lang geschüttelt. Die glyzerinierte Sekundärlymphe hatte ein klares weingelbes Aussehen und wurde nunmehr bis zum Gebrauch im Eisschrank aufbewahrt. Auch die aus den Lungen gesammelte (Primär-)Lymphe wurde in derselben Weise behandelt, in der Regel aber mit der gleichen Menge Glyzerin versetzt. Derartig präparierte Lymphe blieb, ohne erkennbare Veränderungen einzugehen, ca. 6 Wochen brauchbar.

Die Dosis für ein erwachsenes Rind betrug für die Praxis 0,5 ccm.

Vor der Abgabe habe ich die Lymphe stets durch eine mikroskopische Untersuchung, sowie durch Kultur- und Tierversuche auf etwaige Verunreinigung durch fremde Mikroorganismen geprüft. Zu diesem Zwecke wurden mikroskopische Ausstrichpräparate aus der Lymphe angefertigt, unter Benutzung der üblichen Nährböden, aërobe und anaërobe

Kulturen angelegt und untersucht und Kaninchen oder Meerschweinchen mit je 1 ccm unverdünnter Lymphe in die Bauchhöhle geimpft.

Waren die Versuchstierchen am dritten Tage nach der Probeimpfung noch gesund und die Nährböden steril, und war außerdem die mikroskopische Untersuchung negativ verlaufen, so wurde die Reinheit der Lymphe als erwiesen erachtet.

Durch die unschädlich verlaufene intraperitoneale Impfung war gleichzeitig auch die Gewißheit gegeben, daß der Impfstoff frei von Septikämieerregern und deren Stoffwechselprodukten war.

Eine Prüfung der Lymphe auf ihre Wirksamkeit durch probeweise Verimpfung an ein Versuchsrind wäre im Hinblick auf die später geschilderten Erfahrungen nicht ausschlaggebend gewesen, außerdem hätte wegen der Kostspieligkeit derartiger Kontrolltiere doch immer nur eines in Betracht kommen können.

Der Versuch, die Lymphe mit Karbolsäure in 0,5 % wässeriger Lösung zu konservieren, mißlang insofern, als sie sich bei Zusatz derselben schwach trübte und flockige Niederschläge zeigte, während das Karbol für Blutserum bekanntlich ein ganz vorzügliches Konservierungsmittel geworden ist.

Testtiere.

Die in Halle seit 1898 angestellten Versuche, geeignete Testtiere zur Wertbestimmung der Lymphe zu erhalten, hatten keinen Erfolg. Die kleineren Laboratoriumstiere, wie Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten, Mäuse, Hühner, Tauben und Sperlinge, auch Hunde, Schafe und Ziegen vertrugen die Einverleibung reiner Primär- und Sekundärlymphe, selbst in die Bauchhöhle, völlig reaktionslos. Nicht einmal das Rind hat sich als zuverlässiges Testtier erwiesen, denn die wissenschaftlichen Erfahrungen stimmen darin überein, daß ca. 20 % der gesunden Rinder eine natürliche Unempfänglichkeit gegen die Lungenseuche besitzen[53]).

In der Lungenseuchelymphanstalt zu Halle sind z. B. in der Zeit vom Februar 1898 bis Juni 1901 47 Rinder, die in lungenseuchefreien Provinzen aufgezogen waren, eingestellt und behufs Gewinnung von Sekundärlymphe mit frischer Lymphe in den Triel geimpft worden, davon haben, wie ich den Impflisten entnehmen konnte, 10 Stück, also fast 20 % auf die Impfung nicht reagiert, obgleich nach Bouley und Willems[55]) die Einspritzung der Lymphe in den Triel bei 75 % der nicht am Schwanz vorgeimpften Rinder sogar den Tod hervorrufen soll.

Impftechnik.

Hinsichtlich der zweckmäßigsten Impfstelle sind Versuche nach den verschiedensten Richtungen hin angestellt worden. Robeis und Duprez[46]) impften am oberen Halse, in die vordere Augenkammer und unter die harte Hirnhaut; Nocard und Roux[36]) sowie Arloing[36]) in die Brusthöhle, bezw. in die Lungen. Impfungen in die Blutbahn-(Jugularvene) nahmen Thiernesse, Degive, Chaveau, Defays, Bouley, Sanderson und andere vor[22]). Am häufigsten wurde aber am Triel und am Schwanze geimpft. Alle Sachverständigen sind darin einig, daß der Schwanz des Rindes, und zwar die hintere (dorsale) Seite desselben diejenige Stelle ist, an der die Impfung den geringsten Schaden verursacht.

Der Schwanz besitzt ein straffes Unterhautbindegewebe, er ist trocken und 10° kälter als die inneren Teile eines Rindes, und diese Eigenschaften bilden die Ursache, daß sich der Erreger der Lungenseuche

im Gegensatz zu den Körpergegenden mit lockerem Bindegewebe nur langsam vermehren und schwer resorbiert werden kann. Dadurch wird aber in der Regel der gutartige Verlauf der Schwanzimpfung bedingt. Ferner ist die hintere Seite des Schwanzes in weniger hohem Grade Beschmutzungen ausgesetzt, kann leichter überwacht werden und wird bei Bewegungen des Schwanzes seltener verletzt als die vordere Seite[55]).

Auch bezüglich der Ausführung der Impfungen ist ein Fortschritt insofern gemacht worden, als an Stelle des Bistouris, der Lanzette oder Impfnadel und der mit Lymphe getränkten, unter die Haut des Schwanzes zu ziehenden Wollfäden die PRAVAZsche Spritze getreten ist, die eine genaue Dosierung des Impfstoffes sichert. Damit ist man auch von einer Dosierung nach einer unbestimmten Anzahl von Tropfen abgekommen und hat in den letzten Jahren allgemein den erwachsenen Rindern 0,5 ccm, den Kälbern 0,25 ccm Lymphe pro Tier injiziert.

Abschwächungsverfahren.

Auch die verschiedenen Methoden zur Abschwächung der reinen Lungenlymphe haben zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt. TOUSSAINT[55]) wollte durch eine 15—20 Minuten lange Erwärmung der Lungenflüssigkeit auf 55° eine Abschwächung erzielen. Die von A. SCHMIDT[51]) nach dieser Richtung hin angestellten Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß die Lymphe schon bei einer Erwärmung auf 50° C völlig unwirksam wird. Ferner glaubte die im Jahre 1882 ernannte französische Kommission in der Verdünnung der Lungenflüssigkeit ein Mittel zur Abschwächung gefunden zu haben. Bei den Versuchsimpfungen der mit 50 Teilen destillierten Wassers verdünnten Lymphe stellte sich aber heraus, daß sie nicht schwächer wirkte als unverdünnte[55]). Zu demselben Resultate sind SCHÜTZ und STEFFEN[52]) im Jahre 1889 gekommen, die Impfversuche mit Lymphe gemacht hatten, welche zu 20 bzw. 50 % mit abgekochtem Wasser verdünnt war.

WILLEMS[56]) nahm an, daß die Virulenz der Lungenlymphe abgeschwächt würde, wenn sie mehrere Male von dem Schwanze eines Rindes auf den eines andern übertragen würde. Er verimpfte die nach der 25. Übertragung aus dem Schwanze des letzten Rindes gewonnene Flüssigkeit auf mehrere andere Rinder und beobachtete bei keinem derselben ein brandiges Absterben des Schwanzes, alle wurden dagegen angeblich immun.

PASTEUR[55]) stellte später fest, daß sich bei Kälbern, welche nur mit einigen Tropfen Lungenlymphe hinter der Schulter geimpft waren, eine entzündliche Anschwellung der Unterhaut bildete, aus welcher die sogenannte subkutane Kälberlymphe gesammelt werden konnte. Dieselbe ließ sich von Kalb zu Kalb übertragen und verursachte an den Schwänzen der damit geimpften Rinder zwar ebenfalls eine Anschwellung aber keinen Brand. Die Immunität dieser Rinder wurde dadurch bewiesen, daß eine darauf vorgenommene, für sich allein angewandt, sehr gefährliche Trielimpfung mit Flüssigkeit aus erkrankten Lungen ohne Reaktion ertragen wurde.

Es handelte sich also bei WILLEMS und PASTEUR um Impfungen mit sekundärer Lymphe, welche durch die Tierpassage eine Abschwächung erfahren, dagegen die volle Schutzkraft bewahrt haben sollte. Auch LEISTIKOWS[39]) Versuche mit Kälberlymphe haben ergeben, daß die Reaktion auf die Impfung mit Sekundärlymphe viel günstiger verlief als die

Reaktion nach Verimpfung von primärer (Lungen-) Lymphe, und daß dieselbe ebenfalls eine genügende Schutzwirkung entfaltete.

Wie im nachstehenden gezeigt werden soll und Leistikow selbst später zugegeben hat, sind die Versuchsergebnisse der letzteren drei Forscher nicht stichhaltig gewesen.

Besonders haben die Vorkommnisse im Regierungsbezirk Magdeburg[55]) während des Jahres 1898 bewiesen, daß die sekundäre Lymphe den gedachten Schutz gegen die Lungenseuche nicht verleiht. Von 246 Rindern, die sich auf drei Ortschaften verteilen und die auf die Schwanzimpfung mit sekundärer Lymphe reagiert hatten, sind nämlich trotzdem, einschließlich der schwer erkrankten Rinder, 47 Stück = 19,1 % an den Folgen der im Anschluß daran ausgeführten Trielimpfung mit Primärlymphe, die zwecks Erhöhung des Impfschutzes vorgenommen wurde, zugrunde gegangen. Nach den obwaltenden Anschauungen durfte aber die durch die Sekundärlymphe erzielte Schutzwirkung als ausreichend erachtet werden, wenn deutliche Rötung, vermehrte Wärme, Schwellung und Schmerz in der Umgebung des Impfstiches wahrzunehmen waren, d. h. wenn die Tiere reagiert hatten. Unter diesen Umständen konnte dann am 28. Tage nach der ersten Impfung die Trielimpfung vorgenommen werden. (Anweisung zur Handhabung der §§ 2 und 3 des Gesetzes vom 18. Juni 1894 betreffend die technischen Bestimmungen für die Kreistierärzte[40]).)

Andererseits liegen Beobachtungen vor, nach denen die Sekundärlymphe einen hohen Grad von Virulenz entfaltet hat. Eine im März 1901 von mir der Trielimpfung mit Primärlymphe unterzogene 2½ Jahre alte Färse aus Westpreußen hatte nur in geringem, für die Zwecke der Lymphegewinnung nicht ausreichendem Maße reagiert. Da gerade frische Sekundärlymphe zur Verfügung stand, so wurden dem Tiere versuchsweise 8 Tage nach Ablauf der Reaktion wiederum in den Triel 10 ccm Sekundärlymphe injiziert. Darauf trat eine außerordentlich heftige Reaktion ein, so daß die Impfgeschwulst am 16. Tage nach der Injektion etwa mannskopfgroß war, und der Zustand des Rindes, welches zuletzt Temperaturen bis zu 40,6 °C zeigte, die Schlachtung bedingte.

Ferner hatte ein Quantum Sekundärlymphe, das im Juni 1901 in der Lungenseuchelymphanstalt zu Halle von einem ausgewachsenen Rinde gewonnen, in der üblichen Weise durch Kultur- und Tierversuch auf seine bakterielle Reinheit geprüft und mit Glyzerin versetzt im Eisschrank aufbewahrt worden war, nach privaten Mitteilungen der betreffenden Impfärzte in verschiedenen Beständen ganz verschiedene Wirkungen hervorgebracht. Im Kreise Wanzleben verursachten die Impfungen in drei Beständen vier Verluste, und riefen starke Reaktionen hervor, im vierten Bestande dagegen, obwohl die Impfungen an demselben Tage ausgeführt wurden, nur mittlere Reaktionen. Im Kreise Neuhaldensleben wurden nach Verimpfung derselben Lymphe schwache Reaktionen, im Kreise Wolmirstedt nur vereinzelt Reaktionen beobachtet.

Ähnliche Erfahrungen nach Verimpfung von Primärlymphe hat Roloff[47]) schon im Jahre 1868 veröffentlicht.

Die nicht zu beeinflussende Wirkung des Impfstoffes erklärt es auch, daß die Impfverluste in den Motiven zum deutschen Reichstierseuchengesetz auf 2—4 % angesetzt sind. Die Verluste an Schwanzenden werden von einer französischen Impfkommission auf 25 %, von Degive auf 10—15 % geschätzt. Dazu kommen die oft erheblichen ökonomischen Nachteile, welche die Impfkrankheiten zur Folge haben[22]).

Ermittelungen über die Schutzzeit.

Ferner glaubte man nach den SCHÜTZ-STEFFENschen Versuchen annehmen zu können, daß die Schutzkraft der Lungenseucheimpfung in einem gewissen Verhältnis zur Stärke der Reaktion steht. Die Unzuverlässigkeit der Impfreaktion in bezug auf die zu erwartende Schutzkraft ist aber inzwischen nicht allein durch die oben geschilderten Vorgänge im Regierungsbezirk Magdeburg, sondern auch durch zahlreiche weitere Erfahrungen in der Praxis erwiesen worden.

Demzufolge gehen auch die Ansichten über die Immunitätsdauer sehr auseinander. Dieselbe wird zwar im allgemeinen auf ein Jahr bemessen, hat sich jedoch auch innerhalb dieser Frist sehr unbeständig gezeigt. Dazu liefert LEISTIKOW[40]) einen Beitrag: In drei verschiedenen Beständen, welche der Schwanz- und Trielimpfung unterzogen worden waren und deutliche Reaktionen gezeigt hatten, erkrankten (außer garnicht oder nur einmal geimpften Rindern) trotzdem einige Tiere drei Wochen, sieben Wochen, bzw. zwei bis drei Monate nach der zweiten Impfung.

Außerdem sprechen für die Richtigkeit dieser Tatsache die Berichte des Reichsgesundheitsamtes über die Ergebnisse der Lungenseucheimpfungen in den Jahren 1892—1901[24—33]). Danach sind in schutzgeimpften Beständen trotzdem bei Ausbruch der Seuche innerhalb der „einjährigen Schutzzeit" erkrankt:

Im Jahre 1892	von 438	Impflingen	23	Stück	= 5,3 %
„ „ 1893	„ 546	„	31	„	= 5,7 %
„ „ 1894	„ 256	„	14	„	= 5,5 %
„ „ 1895	„ 518	„	11	„	= 2,1 %
„ „ 1896	„ 229	„	8	„	= 3,5 %
„ „ 1897	„ 314	„	4	„	= 1,3 %
„ „ 1898	„ 187	„	17*)	„	= 9,1 %
„ „ 1899	„ 385	„	23	„	= 6,0 %
„ „ 1900	„ 339	„	4	„	= 1,2 %
„ „ 1901	„ 138	„	8	„	= 5,8 %

also durchschnittlich 4,55 %.

Nach amtlichen Berichten[34]) war das Ergebnis der im Jahre 1902 ausgeführten Schutzimpfungen, welche im obigen Sinne in Betracht kommen, folgendes: In einem am 28. September schutzgeimpften Bestande des Landkreises Halberstadt wurde die Seuche am 31. Januar des folgenden Jahres bei einem Ochsen festgestellt.

Unter 147 im Kreise Wanzleben im letzten Viertel des Jahres 1901 schutzgeimpften Rindern brach am 3. Januar 1902 die Krankheit aus.

Von 22 Stück Rindern im Kreise Wolmirstedt, die am 3. April mit Lungenlymphe geimpft worden waren, erkrankten am 1. Oktober zwei Stück an Lungenseuche. Bei der Abschlachtung des Restbestandes zeigten sich noch drei Tiere mit akuter Lungenseuche, eins mit einem alten Sequester behaftet. In diesem Falle hat die Impfung nach der Meinung des betr. Bericherstatters sogar völlig versagt.

Man ist also zurzeit nur imstande unter Anwendung der Asepsis und Antiseptik einen reinen Impfstoff zu gewinnen und den Tieren in einwandsfreier Weise einzuverleiben. Es haben mithin lediglich Lymphegewinnung und Impftechnik eine gewisse Vollkommenheit erreicht, dagegen ist es bis jetzt noch nicht gelungen, den Titer des Impfstoffes, bzw. die Dauer des Impfschutzes mit Sicherheit vorher zu bestimmen.

*) Darunter 14 etwa einen Monat nach der Impfung.

Man muß vielmehr annehmen, daß der Impfstoff in bezug auf seine Wirksamkeit unter unbekannten Einflüssen den verschiedensten Schwankungen unterworfen ist.

Die mit den Schutzimpfungen gemachten Erfahrungen.

Im völligen Einklang mit dem Charakter der Lungenseuche und dem, was über den Impfstoff gesagt wurde, stehen auch die Beobachtungen, welche im Laufe der Jahre mit den Impfungen als Bekämpfungsmittel der Seuche in allen Ländern gemacht worden sind. Es kann zwar für das einzelne Rind, sofern es sich um die Impfung eines gesunden Tieres handelt, vielleicht ein genügender Grad von Immunität erreicht werden, im allgemeinen kommt jedoch die Impfung nur im großen Maßstabe als Seuchentilgungsmittel in Frage. Hierbei hat aber die Erfahrung vielfach gelehrt, daß nicht alle geimpften Rinder Immunität erlangen.

Erfahrungen im Inlande.

Leistikow[41]) berichtete, daß er mehrere Monate hintereinander Seuchenausbrüche fast ausschließlich in solchen Beständen beobachtet hat, welche seit langer Zeit ständig geimpft worden waren. Oft verläuft die Impfung reaktionslos oder die Impflinge bleiben trotz erfolgter Reaktion für die Ansteckung empfänglich. Andererseits tritt bei noch nicht offensichtlich erkrankten, aber doch schon infizierten Rindern auf die Impfung am Schwanz eine ähnliche Reaktion ein, wie bei gesunden Impflingen. Ferner wird durch die Impfung der Krankheitsprozess in den Lungen keineswegs beeinflußt, es kann daher bei den während des Inkubationsstadiums geimpften Tieren die Lungenseuche später ebenso zum Ausbruch kommen wie bei nicht geimpften Rindern. Dies ist, wie die technische Deputation für das Veterinärwesen in ihrem Gutachten über die Zwangsimpfung ausführt, bis zum Jahre 1893 bei fast der Hälfte der geimpften Bestände des mitteldeutschen Seuchengebietes der Fall gewesen[55]). Weiterhin ist die Tatsache zu berücksichtigen, daß die Seuche in infizierten und geimpften Beständen anders verläuft als in infizierten und nicht geimpften. Alle Sachverständigen, welche vorurteilsfrei diesbezügliche Beobachtungen gemacht haben, sind der Ansicht, daß die Krankheit in infizierten und nicht geimpften Beständen gewöhnlich einen schweren Verlauf annimmt und bei einer größeren Anzahl von Rindern den Tod bedingt, während sie in schon angesteckten Beständen durch die Impfung in einem frühen Entwickelungsstadium kupiert werden kann, ohne daß sie aber gleichzeitig auch die Ansteckungsfähigkeit aufhebt, und das ist, wie Leistikow sagt, das Bedenkliche in veterinärpolizeilicher Hinsicht. Die Zahl der Rinder, welche in diesen Beständen offensichtlich erkrankt, ist daher oft eine so geringe, daß sich der Ausbruch der Lungenseuche nur schwer feststellen läßt. Die Seuche kann in infizierten und geimpften Beständen sogar völlig latent, d. h. ohne jedwede auffälligen Krankheitserscheinungen verlaufen. Die Möglichkeit, daß bereits infizierte Bestände geimpft werden, liegt aber besonders in Gegenden vor, in denen Landwirtschaft und Industrie in hoher Blüte stehen, keine Aufzucht betrieben wird, sondern ein ausgedehnter Verkehr mit Handelsvieh stattfindet. Es werden somit verdeckte Seuchenherde geschaffen, welche durch wiederholte Impfungen zu chronischen werden,

in denen außerdem sichtbar hervortretende Erkrankungsfälle leicht verheimlicht werden können.

Diese verheimlichten Seuchenherde entziehen sich jeglicher Bekämpfung!

Weiterhin muß hervorgehoben werden, daß die durch die Impfung nicht geschützten Rinder an der Seuche bei später sich bietender Gelegenheit zur Ansteckung erkranken können. Es ist aber sehr schwer, die infolge der Impfung nicht geschützten, später aber erkrankten Rinder aus einem solchen Bestande herauszufinden. Infolge des Charakters der Lungenseuche liegen die Verhältnisse schließlich auch anders, wie z. B. beim Milzbrand und Rotlauf. Sind einige Tiere durch die Impfung gegen letztere Seuche nicht geschützt, infizieren sie sich aber später, so gehen die erkrankten Tiere fast regelmäßig zugrunde, der gegen diese Seuchen geschützte Bestand ist aber in veterinärpolizeilicher Beziehung ungefährlich. Die Lungenseucheimpfungen können jedoch nicht verhindern, daß latent erkrankte Rinder in einem Bestande vorkommen, ja sie sind sogar der Grund, daß dieselben häufiger in geimpften als nicht geimpften Beständen angetroffen werden[42, 55]). Diese Tiere bilden dann eine dauernde Ansteckungsquelle für gesunde Rinder und geben die Veranlassung zu der Kette von Seuchenausbrüchen, wie sie in Gegenden, in welchen geimpft wurde, zu verzeichnen gewesen sind[41]).

Schließlich ist ja auch der Gang der Lungenseuchetilgung in Deutschland ein unwiderleglicher Beweis für die Unzweckmäßigkeit der Impfungen. Ein Blick in die Statistik über den Stand der Lungenseuche im deutschen Reiche lehrt, daß dieselbe in denjenigen Landesteilen die größte Verbreitung angenommen hat, in welchen die Impfungen als Seuchentilgungsmittel herangezogen wurden, daß die Seuche aber von der Zeit an erfolgreich bekämpft werden konnte, als man von den Impfungen Abstand nahm. So hat Anhalt während der Jahre 1893 bis 1896 eine sehr hohe Verlustziffer aufzuweisen gehabt, die jedoch nach dem Fortfall der Impfungen im Jahre 1897 sofort auf Null sank. Andererseits haben sich in der Provinz Sachsen, wo noch bis zum Jahre 1902 geimpft worden ist, ebensolange stationäre Lungenseuchenherde erhalten.

Erfahrungen im Auslande.

In keinem Staate ist bis jetzt die Tilgung der Lungenseuche durch die Impfung gelungen. So geht schon nach Roloff[8]) aus amtlichen Berichten hervor, daß die Lungenseuche in dem Spölingdistrikte in Holland häufig auch geimpfte Tiere befallen hat und sich in den der Schutzimpfung unterworfenen Distrikten oft recht lange hielt. Und die Geschichte hat gezeigt, daß die Tilgung der Lungenseuche in Holland erst dann gelungen ist, als die gesetzlich angeordneten uud ganz allgemein ausgeführten Zwangsimpfungen durch Massenschlachtungen ersetzt worden waren[55, 22]).

Nach Leblancs[6]) Beobachtungen fordert die Lungenseuche oft nur wenige Opfer und hört nicht selten plötzlich auf. Dieser Verlauf wird dann unter Umständen der Impfung zugute gerechnet. In anderen Fällen dauert die Seuche trotz der Impfungen fort. Wehenkel[8]) sagt in seinem Sanitätsberichte vom Jahre 1883, daß in Belgien die zahlreichsten Verluste an Lungenseuche in denjenigen Bezirken vorkommen, in denen die Tierärzte und Landwirte Anhänger der Impfung sind. Auch Salmon[11]) kommt auf Grund seines statistischen Materials zu den

Schlüssen, daß die Impfung die Lungenseuche nicht auszurotten vermag, und daß ihre Anwendung die durch die Seuche verursachten Verluste nicht bedeutend vermindert.

Mac Fadyean[14]) bezeichnete in einer Besprechung über den Kampf gegen die Lungenseuche in England schon im Jahre 1892 die Impfung als einen überwundenen Standpunkt und vertritt die Ansicht, daß die Seuche durch ein anderes Verfahren als durch die Tötung aller kranken und der Seuche bzw. der Ansteckung verdächtigen Tiere nicht zu tilgen sei. In Großbritannien ist die Lungenseuche seit 1899 nicht mehr aufgetreten.

Leblanc[18]) äußert sich später nochmals dahin, daß die Seuche durch die Impfung, auf welche Weise sie auch ausgeführt wird, niemals erfolgreich bekämpft werden kann.

Auf der anderen Seite ist die Ausrottung der Lungenseuche in jedem Fall geglückt, in welchem die Keulung als Tilgungsmittel herangezogen wurde, und zwar die Keulung aller kranken, sowie der Seuche und der Ansteckung verdächtigen Tiere. Nur diese Maßregeln tragen dem Charakter der Lungenseuche völlig Rechnung und die Wirksamkeit derselben für die Ausrottung der Lungenseuche ist ebenso vielseitig erwiesen, wie die Unwirksamkeit der Lungenseucheimpfung für denselben Zweck[49]).

Impfungen mit Kulturen.

Es ist aber nicht allein bei den Impfversuchen mit Lymphe geblieben, sondern man war infolge der häufig beobachteten ungleichmäßigen Wirkung der Lymphe von jeher bestrebt, den Erreger der Lungenseuche zu ermitteln, weil man annehmen durfte, daß die Entdeckung desselben eine feste Grundlage für die genauere Erforschung des Wesens dieser Seuche abgeben würde.

Willems und van Kempen[7]) glaubten schon in den fünfziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts den Erreger der Lungenseuche gefunden zu haben; sie entdeckten in der Lungenflüssigkeit feine, stark lichtbrechende Körperchen, welche die Brownesche Molekularbewegung zeigten. Später isolierte Sussdorf einen Mikroben aus peripneumonischen Lungen, und Bruylants und Verriest[6]) führten sogar im Jahre 1880 mit den von ihnen gezüchteten Kulturen subkutane Impfungen aus, desgleichen einige Jahre später Lwow[9]).

Es sind aber die Ergebnisse dieser Forschungen wie diejenigen von Lustig[10]), Poels, Molen[9]) und Arloing[15]) durch Nocard und Roux[35]) im Jahre 1898 vollständig widerlegt worden.

Sie zeigten, daß die für spezifische Erreger des pneumonischen Virus gehaltenen Mikroben mit der Lunge eingeatmete und durch den Lungenfilter zurückgehaltene Bakterien darstellten.

Will man virulente peripneumonische Flüssigkeit erhalten, die bei Kultur auf den gewöhnlichen Nährböden steril bleibt, muß man eine an akuter Peripneumonie erkrankte Lunge benutzen. Die Serosa einer solchen Lunge kauterisiert man, wie Nocard[38]) vorschlägt, leicht an einem Punkte der flüssigen Ansammlung, und führt hier unter das Brustfell das fein zugespitzte Ende einer sterilisierten Pipette ein. Auf diese Weise kann man durch leichtes Ansaugen $^1/_2$ ccm und bisweilen mehr durchsichtiger, bernsteinfarbener Flüssigkeit erhalten, die gleichzeitig virulent und mikrobenfrei ist.

Außerdem läßt sich noch Flüssigkeit für Kulturversuche aus den interlobulären Septen entnehmen, welche durch einen aseptisch in die hepatisierte Gegend gelegten Schnitt bloßgelegt werden.

Die Pipette darf jedoch nicht zu tief eingeführt werden, damit sie nicht in das immer der Verunreinigung verdächtige Lungenparenchym dringt.

Mit wenigen Tropfen auf diese Weise gewonnener Lungenflüssigkeit stellten Nocard und Roux ihre Kulturversuche an. Nocard [38]) beschreibt das Verfahren folgendermaßen: „Ein im Autoklaven sterilisiertes Kollodiumsäckchen wird mit Bouillon gefüllt, in die zuvor etwas seröse peripneumonische Flüssigkeit gesät ist; das Säckchen wird dann sorgfältig geschlossen und in die Bauchhöhle eines Kaninchens getan. Nach 15—20 Tagen enthält es eine opalisierende, schwach albuminöse Flüssigkeit. Die Opaleszenz ist so gering, daß, um sie mit Sicherheit feststellen zu können, man klug daran tut, ein zweites Kollodiumsäckchen ohne peripneumonische Flüssigkeit in das Bauchfell desselben Kaninchens zu legen. Da der Inhalt des Kontrollsäckchens seine Durchsichtigkeit bewahrt hat, so kann man genau den Grad der Opaleszenz des ersten Säckchens schätzen. Die opalisierende Flüssigkeit enthält jedoch weder Zellen noch Mikroben, die in den gewöhnlichen Medien kultivierbar wären. Hingegen lassen sich mikroskopisch bei starker Vergrößerung (1500) eine Unzahl kleiner lichtbrechender beweglicher Punkte wahrnehmen, die so winzig sind, daß es selbst mittels Färbung unmöglich ist, ihre genaue Form zu bestimmen. Diese beweglichen, stark lichtbrechenden Punkte, die so zahlreich sind, daß sie trotz ihrer außerordentlichen Kleinheit das Opalisieren der Bouillon bewirken, sind Lebewesen, welche sich in der Bouillon dank den Modifikationen der Kulturflüssigkeit und dem durch die Kollodiumwand den Phagozyten entgegengesetzten Hindernisse haben ungeheuer vermehren können.

Mit der opalisierenden Flüssigkeit des fruchtbaren Säckchens kann man wiederum andere Säckchen besäen, welche man in das Bauchfell eines dritten Kaninchens tut, usf. Man erzielt immer dieselben Resultate. Es ist jedoch geraten, für jeden Durchgang verschiedene Säckchen zu verwenden, da dieselben häufig zerbrechen. Oft sind die Kaninchen sehr abgemagert, wenn man die Säckchen herausholt; oft sogar sterben sie vor dem hierfür festgesetzten Tage; sie sind dann stark kachektisch und haben nur noch Haut und Knochen. Bei der Autopsie findet man trotzdem keine nennenswerte organische Veränderung; Blut und Gewebebrei, die in verschiedenen Medien selbst in Kollodiumsäckchen ausgesät werden, ergeben keine Kulturen". Die Tiere gehen demnach an einer Intoxikation zugrunde.

Das Kulturverfahren gelingt auch beim Ochsen, dagegen nicht beim Meerschweinchen. Statt der Kollodiumsäckchen kann man auch Säckchen von reiner Zellulose (Viskose) verwenden, welche den Vorzug größerer Geschmeidigkeit haben, dabei ebenfalls für dialysierbare Substanzen durchlässig, widerstandsfähig und bequem zu sterilisieren sind.

Nocard und Roux gelang es auch, in vitro Kulturen zu erzielen. Sie benutzten dazu sterile Bouillon, welche während einiger Wochen in Kollodiumsäckchen im Peritoneum einer Kuh oder eines Kaninchens gewesen ist. Diese sterile Bouillon verändert sich gleichfalls während ihres Aufenthalts im Peritoneum infolge der osmotischen Vorgänge, welche durch die Wand des Säckchens hindurch stattfinden; sie wird schwach albuminös und ist schließlich imstande, außerhalb des lebenden Organismus der Kultur der Mikroben der Peripneumonie in vitro zu dienen.

Die opalisierende, die kleinen, beweglichen, stark lichtbrechenden Körnchen enthaltende Kultur läßt sich auch erreichen, wenn man sich ein Gemisch von der Peptonlösung, die Martin zur Bereitung des Diphtherietoxins benutzt hat, und Kuh- oder Kaninchenserum herstellt. Die brauchbarste Mischung enthält 6—8 % Serum.

Die Martinsche Bouillon mit einem Zusatz normalen Ochsenserums in dem oben angegebenen Verhältnis wird durch eine Chamberland-Kerze filtrirt und dann wieder in Kolben oder sterilisierte Röhren verteilt; sie wird erst nach einer 48 stündigen Prüfung im Brutschrank benutzt.

Die so präparierte Bouillon ist eine bernsteinfarbene, gänzlich durchsichtige Flüssigkeit; man kann daher mit Bequemlichkeit die Fortschritte der Kultur verfolgen.

Aus diesem Grunde darf der Bouillon kein durch Hitze sterilisiertes Serum zugesetzt werden, denn eine solche Mischung bleibt selbst nach dem Sterilisieren opalisierend.

Die mit Lungenflüssigkeit geimpften Serumbouillonröhrchen werden nach 48 stündigem Aufenthalt im Thermostaten bei 37° C leicht opalisierend.

Unter 30° C findet keine Vermehrung statt.

Untersucht man die opalisierende Bouillon mikroskopisch, so sieht man bei 1200—1500 facher Vergrößerung sehr feine, bewegliche, stark lichtbrechende Granulationen in derselben. Bestimmte Formen lassen sich jedoch nicht unterscheiden. Neben den feinen Elementen findet man dickere von unregelmäßigen Konturen, das sind die in der Serumbouillon schwebenden Eiweißteilchen.

Dujardin-Beaumetz kultivierten den Erreger der Peripneumonie auf festen Nährmedien. (Auf 1 Liter Martinscher Bouillon 15 g Agar-Agar, auf 115° C erhitzt, filtriert und in schräg stehende Röhrchen verteilt. Kondenswasser wird mittels Pipette entzogen und durch auf dem Wege des Filtrierens keimfrei gemachtes Serum ersetzt.) Nach dreitägigem Aufenthalt im Brutschrank sind die Kolonien mit der Lupe als tautropfenähnliche Gebilde erkennbar. Später erscheint im Mittelpunkt der Kolonien eine Art granulierter, opaker, brauner Warzenbildung. Die Lungenseucheerreger entwickeln sich bei künstlicher Einverleibung auch im gesunden Kuheuter. Sie erlangen im Euter sogar eine größere Giftigkeit, als sie ursprünglich besessen haben[33]).

Die Färbung der einzelnen Mikroben gelingt nicht; entnimmt man jedoch mit einem scharfen Rasiermesser der Oberfläche des Agars eine dünne Scheibe, die einige inkrustierte Kolonien enthält, trocknet das Präparat auf dem Objektträger und löst nach 24 Stunden den Agar ab, so kann man die bakteriellen Anhäufungen leicht mit allen basischen Anilinfarbstoffen färben. Die Gramsche Tinktion nehmen sie nicht an. Die Mikroorganismen der Peripneumonie sind hauptsächlich aërob. Das Temperaturoptimum liegt zwischen 37 und 38° C. Sowohl in der Kultur als auch in der Lungenflüssigkeit sterben sie bei 58° C ab.

Nach 7—8 tägiger Bebrütung bleiben die Kulturröhrchen luftdicht verschlossen, im Dunkeln und kühl aufbewahrt fast ein Jahr lebensfähig. Bei Temperaturen unter 0° C ist die Lebensdauer noch erheblich länger. Die Kultur gelingt nur in Serum enthaltenden Nährmedien, am vorteilhaftesten ist der Zusatz von 5—10 % Rinder- oder Kaninchenserum.

Sowohl bei der Kaninchenpassage als auch bei der Fortzüchtung in vitro wird nach Nocard die Virulenz der Mikroben abgeschwächt,

sie soll sich dagegen in Medien mit Zusatz von Ochsenserum konstant erhalten. Das Blutserum selbst hochimmunisierter Rinder entwickelt weder agglutinierende noch bakterizide Eigenschaften.

Filtriert man Lungenflüssigkeit (Lymphe) oder Serumbouillonkulturen durch CHAMBERLANDsche Porzellankerzen oder BERKEFELDsche Kerzen aus Infusorienerde, so verlieren die Mikroben enthaltenden Flüssigkeiten jegliche Virulenz, denn die Impfung damit verläuft völlig reaktionslos und verleiht auch keine Immunität. Die Mikroben werden also durch die Filter zurückgehalten. Verdünnt man aber die Lymphe um das 60—80 fache mit Wasser oder nicht eiweißhaltiger Bouillon, bzw. Serumbouillonkulturen um das 8—10 fache ihres Volumens mit Wasser, bleibt die das Filter passierende Flüssigkeit virulent.

Die Erklärung für dieses verschiedene Verhalten liegt darin, daß die unverdünnte Lungenlymphe und die konzentrierten Eiweißlösungen auf der Wand des Filters eine Schicht ablagern, so daß die Flüssigkeit das Filter nur mittels wahrer Dialyse passieren kann.

Durch die KITASATOschen Kerzen und die Chamberlandkerze B werden die Mikroben aber auch in den genannten Verdünnungen zurückgehalten. Dieser Umstand ist nicht nur theoretisch interessant, sondern kann auch praktisch zur Sicherung der Diagnose Verwendung finden.

Daß die von NOCARD und ROUX isolierten Reinkulturen tatsächlich die Erreger der Lungenseuche darstellen, belegen die Forscher mit folgenden Untersuchungsergebnissen:

„Impft man den Mikroorganismus in sehr kleiner Dosis in das subkutane Zellgewebe des Halses, der Schulter oder der Seite ein, so verursacht er beim ausgewachsenen Rinde eine um sich greifende, oft tödliche Schwellung, die im ganzen derjenigen gleicht, die auf die Inokulation der serösen Flüssigkeit aus der Lunge folgt: die verschieden lange Inkubation, der heftige Fieberzustand, Veränderung des Zellgewebes — alles ist identisch. Gleichfalls ertragen diejenigen Tiere, die erfolgreich der Entwicklung der inokulierten Kultur Trotz geboten haben ohne jegliches Unbehagen die Inokulation enormer Dosen seröser Lungenflüssigkeit in der „verbotenen Gegend“ und ebenfalls sind sie für natürliche Ansteckung unempfänglich.

Selbst wenn man die Injektion in das Zellgewebe der Schwanzspitze, der bevorzugten Stelle für die WILLEMSsche Inokulation, vornimmt, merkt man keinen Unterschied: es erscheint daselbst nach dem gewöhnlichen Zeitraum eine entzündliche, etwas heiße und empfindliche Schwellung, die in der Regel keine Neigung zeigt, bis zur Schwanzwurzel fortzuschreiten, während einiger Tage stationär bleibt, dann allmählich abschwillt, schließlich verschwindet und das Tier für virulente Inokulation an verbotener Stelle wie auch für natürliche Ansteckung unempfänglich macht.“

In Anbetracht dessen haben NOCARD und ROUX den Tierärzten empfohlen, anstatt der wenig haltbaren, in ihrer Wirkung unbeständigen und oft schwer zu beschaffenden Lymphe die Reinkulturen zu inokulieren. Nach NOCARD spritz man einige Tropfen Mikrobenkultur unter die Haut des Schwanzendes und erzielt dann angeblich bei nur sehr geringen Impfverlusten eine sichere und dauernde Immunität. Von 970 geimpften Rindern ist keins gestorben und nur bei zwei Tieren fielen die Schwänze ab[33]).

Die NOCARD-ROUXschen Impfversuche mit künstlich hergestellten Kulturen sind von TARTAKOWSKY und DSCHOUNKOWSKY[22]) nachgeprüft und im wesentlichen bestätigt worden. Auch die von A. SCHMIDT[51]) veröffentlichten Kulturversuche bestätigen die NOCARD-ROUXsche Entdeckung.

Aus späteren Versuchen geht jedoch hervor, daß die Erreger der Lungenseuche nach der Passage durch Kaninchen keine derartige Abschwächung erfahren haben, daß sie in der Praxis ohne Gefahr für die Impflinge verwendbar wären; denn die mit nur wenigen Tropfen einer einmal durch den Kaninchenleib gezüchteten Kultur geimpften Kühe erlagen ebenso der Impfkrankheit oder zeigten genau so stürmische Reaktionen nach der Impfung, wie diejenigen Rinder, welchen Kulturen nach mehrmaliger Fortzüchtung durch Kaninchen injiziert worden waren. Desgleichen vermochte eine im Reagenzglase gezüchtete Kultur 5. Generation noch eine Kuh nach subkutaner Verimpfung von 10 Tropfen zu töten[35]. Nach Leclainche können Reinkulturen Immunität verleihen, in gleicher Weise aber auch neue Infektionsherde schaffen, indem sie in gewissen Fällen die Krankheit erzeugen[20].

Tartakowsky und Dschounkowsky[19] modifizierten die Methode der Fortzüchtung der Reinkulturen im Kaninchenkörper und glaubten auf Grund ihrer Kälberimpfungen, daß die 5. Generation deutlich abgeschwächt war.

Impfungen mit Blutserum.

Impfversuche mit Blutserum lungenkranker Tiere sind nach Roloff[47] schon in den sechziger Jahren des vorigen Jahrhunderts von einigen Tierärzten gemacht worden. Im Jahre 1899 veröffentlichten Nocard, Roux und Dujardin-Beaumetz[36] Versuche über eine Serumtherapie der Lungenseuche und bald darauf erschien Arloings und Duprezs Arbeit über die Schutzkraft des Blutserums einer gegen die Lungenseuche immunisierten Kalbin[1].

Wenn man ein Lungenseucheserum herstellen will, so behandelt man immunisierte Rinder längere Zeit mit virulenten Kulturen. Aber selbst nach literweisen Einspritzungen erhält man nur ein Serum von schwacher Heilkraft im Anfangsstadium der Erkrankung und von schnell vorübergehender Schutzwirkung[38]. Dosen von 40 ccm eines solchen Serums verleihen nur eine passive Immunität von 8—10 Tagen Dauer.

Demnach ist die antiperipneumonische Serumtherapie wegen der zu großen Serumdosen und des zu kurzen Impfschutzes für die Praxis nicht verwendbar.

Diagnostische Impfungen.

Im Hinblick auf den meist latenten, chronischen Verlauf der Lungenseuche wurde im letzten Jahrzehnt von verschiedenen Forschern versucht, die Feststellung der Seuche möglichst frühzeitig durch diagnostische Impfungen zu sichern. Die Tatsache, daß die Stoffwechselprodukte der Erreger gewisser Infektionskrankheiten (Rotz, Tuberkulose) zur Erkennung derselben als subkutane Injektionsmittel diagnostisch verwendet werden können, veranlaßte Siedamgrotzky und Noak[14] die Lymphe aus den Lungen wegen Lungenseuche getöteter Rinder in derselben Weise zu verwenden. Sie benutzten zu ihren Versuchen das Koagulum der auf Siedehitze gebrachten Lungenlymphe, welches mit destiliertem Wasser verrieben wurde. Desgleichen hat Arloing[15] ein dem Tuberkulin und Mallein ähnliches Kulturextrakt, das Pneumobazillin, aus der Flüssigkeit der frisch entzündeten Lunge und den Bouillonkulturen seines Pneumobazillus liquefaziens mit Glyzerinzusatz hergestellt. Ferner hat Laquerrière[15] einige Versuche mit der Anwendung des sterilisierten und konzentrierten Saftes der Lungenlung enseuchekranker Rinder behufs Diagnostizierens latenter

Lungenseuche angestellt. Damit behaftete Tiere zeigten angeblich eine sehr markante Temperaturerhöhung und ließen auch eine bedeutende allgemeine und lokale Reaktion erkennen. Indessen haben sich diese Methoden nicht bewährt. Nach dem SIEDAMGROTZKYschen Verfahren haben nicht alle bei der Schlachtung krank befundenen Rinder reagiert, und auch die von WALTHER[15]) angestellten Versuche haben keine diagnostisch verwertbaren Resultate geliefert. Ebenso führten UJHELYS Versuche[15]) mit Pneumobazillen zu keinem einheitlichen Ergebnis, da bei entschieden kranken Tieren die Reaktion gleichfalls ausblieb. Schließlich lassen auch LAQUERRIÈRES Versuchsergebnisse keine bestimmten Schlüsse zu.

Schlußfolgerung.

Ich fasse meine Ausführungen dahin zusammen: In Anbetracht des unbekannten Grades des Schutzwertes und der unzuverlässigen Wirkung der zur Verfügung stehenden Impfstoffe, sowie im Hinblick auf die Ansteckungsgefahr von seiten der geimpften Tiere wird die wichtigste, dem Charakter der Lungenseuche allein Rechnung tragende Maßregel in der Abschlachtung aller kranken, sowie der Seuche und der Ansteckung verdächtigen Tiere zu erblicken sein. Nur wenn die wirtschaftliche Lage eines Landes die Einfuhr von Vieh aus einem Nachbarstaate erfordert, in welchem die Peripneumonie stationär ist, und Massenschlachtungen undurchführbar sind, darf zu den Schutzimpfungen — sei es mit Lymphe oder mit Kulturen — gegriffen werden.

Literatur.

1) ARLOING und DUPREZ, Über die Schutzkraft des Blutserums einer gegen die Lungenseuche immunisierten Kalbin. Österr. Monatsschr. für Tierheilkunde 1901, pag. 174—176.
2) Berliner tierärztl. Wochenschr. 1903, Nr. 7, pag. 122: Seuchenstand in Deutschland.
3) BERMBACH, Veröffentlichungen aus den Jahres-Veterinär-Berichten der beamteten Tierärzte Preußens für das Jahr 1901, pag. 72 usf.
4) BEYER, Viehseuchengesetze, 4. Aufl. 1897, pag. 123 usf., 426, 430, 431.
5) DAMMANN, Gesundheitspflege der landwirtschaftlichen Haussäugetiere 1902, 3. Aufl.
6) ELLENBERGER und SCHÜTZ, Jahresbericht über die Leistungen auf dem Gebiete der Veterinär-Medizin, Berlin 1881, pag. 25.
7) Dies., Ebenda 1882, pag. 25.
8) Dies., Ebenda 1883. pag. 31, 32.
9) Dies., Ebenda 1884, pag. 22, 25, 26.
10) Dies., Ebenda 1885, pag. 25, 27.
11) Dies., Ebenda 1886, pag. 24, 27, 28.
12) Dies., Ebenda 1889, pag. 33—37.
13) Dies., Ebenda 1890, pag. 33.
14) Dies., Ebenda 1892, pag. 30—32.
15) Dies., Ebenda 1893, pag. 30, 31.
16) Dies., Ebenda 1894, pag. 29.
17) Dies., Ebenda 1899, pag. 41.
18) Dies., Ebenda 1900, pag. 37.
19) Dies., Ebenda 1901, pag. 35, 36.
20) Dies., Ebenda 1904, pag. 50.
21) ELLINGER, Die bisherigen Erfolge des Kampfes gegen die Lungenseuche in den europäischen und außereuropäischen Staaten. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1896, Nr. 27, pag. 316, 317.
22) FRIEDBERGER und FRÖHNER, Lehrbuch der speziellen Pathologie und Therapie der Haustiere 1900, Bd. II, pag. 554, 555, 567, 569, 571.
23) JOEST, Unbekannte Infektionserreger. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXI, pag. 389.

24—34) Kaiserliches Gesundheitsamt, Jahresbericht über die Verbreitung von Tierseuchen im Deutschen Reiche. 5. Lungenseuche des Rindviehes, 1892—1902.
35) Kitt, Neues aus der Seuchenkunde. Monatshefte für praktische Tierheilkunde 1898, Bd. IX, pag. 498—501.
36) Ders., Ebenda, 1901, Bd. XII, pag. 228—234.
37) Koch, Enzyklopädie der gesamten Tierheilkunde und Tierzucht, Bd. VI, pag. 175, 176.
38) Kolle und Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen 1903, Bd. III, pag. 695 usf.
39) Leistikow, Versuche zur Gewinnung von Lungenseuchelymphe durch Impfung von Kälbern. Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde 1896, Bd. XXII, pag. 1 usf.
40) Ders., Erfahrungen über die im Regierungsbezirk Magdeburg ausgeführten Schutzimpfungen gegen Lungenseuche. Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde 1899, Bd. XXV, pag. 447, 452—454.
41) Ders., Über die Impfung gegen die Lungenseuche. Berliner tierärztliche Wochenschrift 1902, Nr. 29, pag. 438.
42) Ders., Referat über die Lungenseuche. Berliner tierärztliche Wochenschr. 1902, Nr. 46, pag. 713.
43) Lothes, Vortrag über die Lungenseuche. Berliner tierärztliche Wochenschr. 1902, Nr. 46, pag. 715.
44) Pütz, Zur Geschichte der Lungenseucheimpfung. Berliner tierärztliche Wochenschrift 1892, Nr. 16, pag. 185, 186.
45) Raebiger, Jahresbericht des Bakteriologischen Institutes der Landwirtschaftskammer für die Provinz Sachsen 1902, pag. 9.
46) Robeis und Duprez, Berliner tierärztliche Wochenschr. 1894, Nr. 51, pag. 609.
47) Roloff, Über die Lungenseucheimpfung. Verlag Aug. Hirschfeld, Berlin 1868, pag. 4, 5, 9, 10, 42.
48) Sander, Südafrikanische Epizootien. Berliner tierärztliche Wochenschr. 1896, Nr. 11, pag. 126.
49) Schmaltz, Über die Lungenseucheimpfung. Berliner tierärztliche Wochenschr. 1899, Nr. 16, pag. 199.
50) Ders., Bericht über die IX. Plenarversammlung des Deutschen Veterinärrates 1902, pag. 66.
51) Schmidt, Über Versuche, welche im Laboratorium und Impfstall der Lungenseuche-Lymphanstalt der Landwirtschaftskammer für die Provinz Sachsen im Jahre 1898 angestellt wurden. Deutsche tierärztliche Wochenschr. 1899, Nr. 30, pag. 266.
52) Schütz und Steffen, Die Lungenseuchen-Impfung und ihre Antiseptik. Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde 1889, Bd. XV.
53) Dies., Ebenda 1890, Bd. XVI.
54) Dies., Ebenda 1891, Bd. XVII.
55) Technische Deputation für das Veterinär-Wesen. Gutachten über die Zwangsimpfung zum Schutze gegen die Lungenseuche. Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde 1899, Bd. XXV, pag. 316—320, 323, 333—335.
56) Willems, Denkschrift über die Lungenseuche des Rindviehes. Magazin für die gesamte Tierheilkunde 1852, pag. 434 u. s. f.

XXXI.

Darstellung des Schutzstoffes gegen Rinderpest.

Von

Prof. W. Kolle,

Direktor des Instituts zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern.

Ehe wir auf die Beschreibung der Methodik und Technik der aktiven Immunisierungsverfahren eingehen, ist es notwendig, die wichtigsten Tatsachen über das Kontagium der Rinderpest, sowie über die Symptome und pathologischen Veränderungen dieser Krankheit vorauszuschicken.

Was zunächst das Kontagium der Rinderpest betrifft, so ist dasselbe trotz eifrigster Nachforschungen bisher nicht entdeckt worden. Es existieren in der Literatur zwar mehrere Angaben über die Auffindung des Erregers. Es sind Bazillen, welche in der Galle bei Rinderpestleichen gefunden wurden, z. B. von SIMPSON als Erreger angesprochen worden, aber von KOCH und EDINGTON wurden dieselben Mikroorganismen auch in der Galle gesunder Rinder gefunden. Auch die Angaben von NENCKI, SIEBER und WYCNIEKIEWITZ über die Entdeckung der Rinderpestparasiten sind nicht bestätigt. Wir wissen über den Erreger der Rinderpest nur, daß er nicht zu den kleinsten Mikroben gehören kann, denn es ist nicht möglich den Infektionsstoff, dessen natürlicher Fundort das Blut rinderpestkranker Tiere ist, durch Bakterienfilter zu filtrieren. Die Angaben von NICOLLE, daß es möglich sei, im Filtrat von Rinderpestblut den Infektionsstoff durch Verimpfung dieses Filtrates auf Tiere nachzuweisen, sind durch die Angaben von KOLLE oder TURNER, sowie neuerdings von BITTER und TODD widerlegt worden. Aber zu diesen negativen Angaben läßt sich noch über das biologische Verhalten des Rinderpesterregers hinzufügen, daß derselbe verhältnismäßig wenig widerstandsfähig ist. Er geht durch die Einwirkung des Sonnenlichtes, durch Austrocknung und durch die gebräuchlichen Desinfizientien in stark verdünnten Lösungen ziemlich leicht zugrunde und dürfte im allgemeinen kaum widerstandsfähiger sein, als der Erreger der Cholera, dessen Widerstandskraft ganz genau festgestellt und als allgemein bekannt vorausgesetzt werden kann. Auch die neuesten Ausbrüche der Seuche auf den Philippinen, ferner die Versuche von ROGERS und LINGARD in Indien, von BITTER und TODD in Ägypten und die neuerlichen Studien von KOCH, THEILER und HUTCHEON in Südafrika haben zur Auffindung des Krankheitskeimes nicht geführt.

Aus diesen Gründen ist es aber besonders wichtig, genau die Krankheitserscheinungen der Rinderpest, sowie die pathologisch-anatomischen Veränderungen, wie sie bei den an Rinderpest verendeten Tieren gefunden werden, zu kennen. Die Krankheit beginnt plötzlich. Sie setzt mit Fieber ein, das sich meist 24—36 Stunden vor den übrigen sichtbaren Krankheitssymptomen zeigt. Die Tiere zeigen ein gesträubtes Fell und sind freßunlustig. In dieser Periode der Krankheit besteht häufig Verstopfung. Sehr bald zeigt sich eine starke Injektion und Hyperämie der Augenbindehäute. Es stellt sich meist ein übelriechender Ausfluß aus der Nase ein, und mit zunehmender Krankheit wird die Respiration außerordentlich oberflächlich und rasch. Sie beträgt zwischen 60 und 80 und der Puls steigt auf 180 bis 200 Schläge in der Minute. Vom zweiten bis dritten Krankheitstage an pflegt sich Durchfall einzustellen, dem häufig Blut beigemischt ist. Die Tiere werden zusehends matter; sie können sich nicht mehr erheben und sterben am fünften bis sechsten Tage nach Beginn des Fiebers unter starkem Absturz der Temperatur und raschem Verfall der Kräfte.

Die ausgesprochensten Veränderungen bei den gestorbenen Tieren finden sich vor allen Dingen im Verdauungstraktus. An der Schleimhaut des vierten Magens und des Darmes findet sich starke Hyperämie, namentlich auf der Höhe der Schleimhautfalten. An diesen Stellen sind häufig auch Petechien zu sehen und bei langsamem Krankheitsverlauf ausgebildete Geschwüre. Sehr charakteristisch sind fibrinöse Auflagerungen auf der entzündeten Schleimhaut. Es kann auf diese Weise zur Entstehung von Ausgüssen des ganzen Darmes kommen. Die Peyerschen Plaques und die Solitärfollikel sind häufig vergrößert und hyperämisch. An den übrigen Organen sind verhältnismäßig wenig Veränderungen nachweisbar. Zuweilen finden sich an den serösen Häuten, namentlich am Herzbeutel und in der Pleura Blutungen und ein geringfügiges seröses Exsudat. Die Leber und die Milz sind nicht wesentlich vergrößert, wenngleich beide Organe recht blutreich zu sein pflegen.

Nicht in allen Epizootien hat man Veränderungen an der Schleimhaut des Maules und der Nase gefunden, wie sie bei einigen Ausbrüchen der Seuche, namentlich in Europa beobachtet worden sind und zur Bildung von Geschwüren an den genannten Schleimhäuten, hauptsächlich an der Scheidewand der Nase gelegentlich geführt haben.

Technik der aktiven Immunisierung.

Alle Methoden der aktiven Immunisierung basieren auf der grundlegenden Beobachtung, daß Rinder nach dem Überstehen einer spontanen Rinderpesterkrankung eine meist lebenslängliche Immunität gegen Rinderpest erwerben. Diese Feststellung hat schon vor längerer Zeit dazu geführt, auf ähnliche Weise wie bei der Pockenvaccination mit Hilfe eines abgeschwächten Infektionsstoffes künstlich eine Immunität gegen Rinderpest hervorzurufen. Die Herstellung eines solchen Vaccins, die Semmer, Nencki und auch Tokishige gelungen sein sollte, hat sich indessen bei der Nachprüfung seitens anderer Forscher als unzuverlässig erwiesen. Das Rinderpestkontagium ist so wenig widerstandsfähig, daß durch physikalische und chemische Einflüsse eine Abschwächung sich überhaupt nicht erzielen läßt. Schon bei Anwendung sehr geringfügiger schädlicher Einflüsse erfolgt ein rasches Absterben des Rinderpesterregers.

Ebensowenig erfolgreich wie die Versuche, durch physikalische oder chemische Einflüsse den Rinderpestinfektionsstoff abzuschwächen, sind diejenigen gewesen, eine Virulenzverminderung des Kontagiums durch Verimpfung auf andere Tierarten, namentlich auf die wenig empfänglichen, zu erzielen. Die einzige Tierart, bei der durch mehrmalige Passage des Rinderpesterregers eine Abschwächung für Rinder zutage tritt, scheint die Ziege zu sein; aber die Abschwächung ist auch bei Ziegen selbst nach langdauernden Passagereihen eine so geringe, daß von einer praktischen Verwendung des Ziegenvirus bis jetzt keine Rede sein kann.

Fig. 1. Typischer Verlauf der Temperatur eines am 10. mit 1 ccm Schaf-Rinderpestblut infizierten Rindes, das am 19. zur Gewinnung virulenten Blutes tot geblutet wurde.

Fig. 2. Typischer Verlauf der Temperatur eines am 16. mit 1 ccm virulenten Rinderpestblutes infizierten Rindes.

Wir verfügen zur Erzielung der aktiven Immunität über zwei Methoden, die heutzutage für die praktische Ausführung in erster Linie in Frage kommen können: Die Kochsche Gallenmethode und das Kolle-Turnersche Simultanverfahren.

1. Die Kochsche Gallenmethode. Die Galle von Rindern, welche der Rinderpest erlegen sind, besitzt, wie Robert Koch entdeckte, die Fähigkeit, gesunde Rinder gegen die Infektion mit Rinderpest zu schützen, wenn sie diesen Tieren subkutan einverleibt wird. In der Galle ist, wie experimentell von Kolle nachgewiesen werden konnte, der Infektionserreger in virulenter Form erhalten. Zentrifugiert man die

Rinderpestgalle und injiziert den gewaschenen, von der Galle befreiten Bodensatz gesunden Rindern unter die Haut, so erkranken dieselben an Rinderpest. Aus diesem Fundamentalversuche geht hervor, daß in der Galle Stoffe enthalten sein müssen, welche auf den Rinderpesterreger so einwirken, daß er vom Subkutangewebe aus, bei Gegenwart der Galle das Tier nicht mehr krank machen kann. Es kommt gewissermaßen zu einer lokalen Rinderpestinfektion, durch welche eine allgemeine Immunisierung ausgelöst wird. Daß es sich um eine wahre aktive Immunität bei Benutzung der Kochschen Gallenmethode handelt, geht auch daraus hervor, daß die Immunität sich voll erst ungefähr vom zehnten Tage

Fig. 3. Temperaturkurven von Rindern, die mit $^1/_{1000}$ ccm virulenten Rinderpestblutes infiziert sind, um den Verlauf der Temperatur, die Inkubationszeit und die Dauer der tötlichen Krankheit zu zeigen.

nach der Injektion einstellt. Ihre Dauer ist schwankend, dürfte aber im allgemeinen kaum unter sechs Monaten betragen. In vielen Fällen wird durch eine einmalige Galleinjektion aber eine Immunität erzeugt, welche sich über lange Zeit, ja Jahre ausdehnt. Sehr bald nach Entdeckung der Kochschen Gallenmethode ist behauptet worden, daß durch die Impfung mit Galle die Rinderpest verbreitet werden könnte. Diese Angaben haben sich aber nicht aufrecht erhalten lassen, nachdem namentlich Kolle und Turner den Nachweis erbrachten, daß Impfverluste nach der Gallenimpfung stets in solchen Herden vorkam, bei denen der Beweis einer vorhergehenden Infektion mit Rinderpest erbracht werden konnte. In vielen Fällen waren die Tiere im Augenblick der Impfung allerdings nicht augenscheinlich krank, sie befanden sich aber, wie die

sehr bald eintretenden Erkrankungen und Todesfälle zeigten, bereits im Stadium der Inkubation. Da die Rinderpestgalle nicht zu gleicher Zeit wie das Serum, Heilkraft besitzt, so wird eine Infektion, die bereits im Augenblick der Impfung vorhanden ist, durch die Galleninjektion nicht beeinflußt. In vielen Fällen konnte nun durch die genannten Autoren direkt nachgewiesen werden, daß bereits am Tage nach der Injektion der Galle die Tiere anfingen schwer an Rinderpest zu erkranken oder zu sterben. Es trat also in solchen Fällen klar zutage, daß unter keinen Umständen die Injektion der Galle die Rinderpest hervorgerufen haben konnte. Auch experimentell läßt sich zeigen, daß Rinderpestgalle direkt mit virulentem Blut gemischt werden kann und Tieren ohne Schaden einverleibt werden darf. Daraus geht mit Sicherheit hervor, daß Rinderpestgalle, auch wenn sie größere Beimengungen von Blut enthält, also sicher große Mengen des Infektionsstoffes beherbergt, doch nicht imstande ist, bei gesunden Rindern Rinderpest hervorzurufen.

Bei der Dauer des durch Gallenimpfung verliehenen Impfschutzes spielen Rassenunterschiede der Rinder offenbar eine erhebliche Rolle. Überall da, wo die Gallenimpfung obligatorisch eingeführt wird, ist aber die Dauer der Immunität von keiner sehr großen Bedeutung, da der Infektionsstoff außerhalb des Tierkörpers offenbar nur kurze Zeit lebensfähig und virulent bleibt und deshalb sehr bald zugrunde gehen muß, wenn keine Erkrankungen mehr vorkommen.

Aus allen diesen Gründen müssen die ungünstigen Urteile, welche manche Forscher über die Rindergalle als Immunisierungsmittel bei der praktischen Bekämpfung der Rinderpest gefällt haben, als nicht stichhaltig betrachtet werden. Es sind mit Hilfe der Gallenmethode zahlreiche Distrikte mit großen Mengen von Rindern, z. B. in Südafrika, vor der Infektion mit Rinderpest geschützt worden. Im Basutolande ist es auf diese Weise gelungen, durch obligatorische Anwendung der Kochschen Gallenmethode die ins Land eingedrungene Seuche auszurotten. Der Infektionsstoff konnte sich bei den immunen Tieren nicht halten, ging außerhalb des Körpers zugrunde und wurde ausgerottet, da er in dieses schwer zugängliche Gebirgsland Südafrikas nicht von außen eingeschleppt werden konnte.

Wenn man die Methode der Immunisierung mittels Rinderpestgalle anwendet, so empfiehlt es sich, die von Koch gegebenen Vorschriften für die Technik der Gewinnung der Galle und ihre Anwendung genau inne zu halten. Um ein gut immunisierendes Präparat zu gewinnen, wird nur die Galle von solchen Tieren zur Immunisierung benutzt, die am 5. bis 6. Tage von Beginn des Fiebers gegen Ablauf der Krankheit, deren Temperaturkurve sehr charakteristisch ist, getötet oder gestorben sind. Die Galle darf nicht blutverfärbt und nicht zu stark eingedickt, sondern muß dünnflüssig, von schöner, grünlicher Farbe sein. Von jedem Tiere, dessen Galle zur Immunisierung benutzt werden soll, muß eine vollkommene Obduktion gemacht werden. Es dürfen weder makroskopische Veränderungen an den Organen vorhanden sein, vor allem nicht solche, welche auf das Bestehen einer anderen Infektionskrankheit schließen lassen. Namentlich ist die Galle von solchen Tieren, die stark vergrößerte Milz und Leber haben, unter allen Umständen zurückzuweisen. Auch Tiere, in deren Blut sich irgendwelche Infektionserreger nachweisen lassen, dürfen nicht benutzt werden. Die Galle wird in sterilen Gefäßen aufgefangen, kühl, vor Licht geschützt, aufbewahrt und möglichst bald zur Immunisierung verwendet. Sie bewahrt ihre Wirkung außer-

halb des Tierkörpers im Eisschranke bis zu 10 Tagen. Bei Zimmertemperatur und höherer verliert sie dagegen nach 3—5 Tagen ihre immunisatorische Kraft. Es treten dann auch leicht Zersetzungen durch Bakterien auf, und solche Galle, Tieren subkutan injiziert, ruft leicht Abszesse hervor. Die Stelle der Injektion der Galle ist ziemlich gleichgültig, man muß nur dafür sorgen, daß das Injektionsmaterial wirklich in das Unterhautzellgewebe gelangt.

Die Modifikationen der von Koch angegebenen Gallenmethode, welche von Edington und Kohlstock eingeführt sind, haben sich weder praktisch bewährt, noch bieten sie theoretisch Gewähr für eine stärkere Wirksamkeit dar.

Fig. 4. Verlauf der Temperatur bei Anwendung der Simultan-Methode. Injektion des Virus und des Serum am 12.

Edington benutzte statt der reinen Rinderpestgalle eine Mischung von Galle und Glyzerin, im Verhältnis von 4:1. Der Glyzerinzusatz wurde gewählt, um die angebliche Gefährlichkeit der Galle, Rinderpest in tötlicher Form zu übertragen, auszuschalten. Es wird nun sicher durch das Glyzerin nach längerer Einwirkung eine Vernichtung der in der Galle vorhandenen Rinderpesterreger erzielt, aber damit wird das Präparat auch seiner wertvollsten Eigenschaft, eine aktive Immunität hervorzurufen, beraubt. Die Methode Edingtons ist vollkommen verlassen worden, seitdem man weiß, daß die Rinderpestgalle, selbst wenn sie größere Mengen Blut enthält, nicht imstande ist, gesunde Rinder mit Rinderpest zu infizieren.

Kohlstock wollte die Gallenmethode dadurch modifizieren, daß er 4 Wochen nach der Gallenimpfung eine Injektion von virulentem Blut folgen ließ. Auch diese Methode ist verlassen worden, da wir ja wissen, daß der Rinderpesterreger bereits in der Galle enthalten ist. Andererseits zeigen die Erfahrungen, daß auch ohne Blutnachimpfung die Tiere eine Immunität von erheblicher Dauer erlangen können. Experimentell läßt sich die Methode nicht begründen, denn die spezifischen Blutveränderungen, bestehend in Schutzkraft, erfahren bei den mit Galle immunisierten Tieren keine Zunahme, wenn der Gallenimpfung eine Nachimpfung mit so geringen Blutmengen, wie sie Kohlstock vorgeschlagen hatte, folgt.

Fig. 5. Verlauf des Fiebers bei Anwendung der Simultan-Methode. Das Tier ist außerdem infiziert mit Trypanosoma Theileri, wodurch die starken Remissionen der Temperatur zum Teil zu erklären sind. Injektion am 12.

2. Die Simultanmethode ist die Kombination eines aktiven und passiven Immunisierungsverfahrens und besitzt nicht nur theoretisch, sondern namentlich praktisch Bedeutung. Est ist mit Hilfe der Einverleibung des virulenten Infektionsmaterials und geeigneter Serummengen möglich, den Tieren eine langdauernde Immunität zu verleihen. Die praktischen Erfahrungen und experimentellen Prüfungen haben gezeigt, daß auch diejenigen Tiere, welche bei Anwendung der Simultanmethode keine ausgesprochene Reaktion zeigen, doch eine aktive Immunität von langer Dauer durch das Immunisierungsverfahren davontragen. Es ist notwendig, das Serum und virulentes Blut getrennt, an verschiedenen Körperstellen einzuspritzen. Die Dosis des virulenten Blutes beträgt 0,5—1 ccm, während auf der anderen Köperseite den Tieren 10—20

bis 30 ccm des spezifischen Serums, je nach der Wertigkeit desselben, einverleibt werden. Zur Gewinnung des Infektionsstoffes (virulentes Blut) werden die Tiere auf der Höhe der Krankheit, am 4. Tage zu Beginn des Fiebers, totgeblutet. Das Blut wird in sterilem Gefäße aufgefangen und defibrimiert. Erweist es sich auf Grund der mikroskopischen Untersuchung frei von Bakterien und ergibt die Obduktion der Tiere das Fehlen anderer Infektionskrankheiten als Rinderpest, so kann es zur Impfung benutzt werden. Es bewahrt seine Virulenz mehrere Tage, wenn es bei niederen Temperaturen — vor Licht geschützt — aufbewahrt wird. Die Impfung verläuft, bei Benutzung der jedem Serumpräparate

Fig. 6. Verlauf der Temperatur bei einem mit 150 ccm Rinderpestblut infizierten Schafe. Injektion am 7.

beigegebenen Vorschriften, und bei Anwendung von Blut, welches außer dem Rinderpesterreger keine anderen Krankheitsstoffe enthält, ohne nennenswerte Schädigung am Tiere. Die Verluste betragen, wie ausgedehnte in Südafrika gesammelte Statistiken von Kolle und Turner und auch die neueren Erfahrungen von Bitter und Todd in Ägypten zeigen, kaum mehr als 1 %, wenn die Tiere nicht mit komplizierenden Infektionskrankheiten infiziert sind. In diesem Falle erkranken etwa 90—94 % der geimpften Tiere mit vorübergehenden Temperaturerhöhungen an einer leichten Rinderpestattacke, während 5—10 % der Tiere keine wahrnehmbaren Reaktionserscheinungen erkennen lassen. Lokale Veränderungen stellen sich im Subkutangewebe weder an der Injektionsstelle des Blutes noch des Serums ein. Die Methode empfiehlt sich

aber nicht zur Anwendung bei Milchkühen, da diese in der Milchproduktion oft erheblich nachlassen. Auch bei trächtigen Kühen ist sie nicht anzuwenden und auch in denjenigen Fällen, wo es sich um die Immunisierung von Tieren handelt, die chronisch mit Blutinfektionserregern infiziert sind; z. B. in Distrikten, in welchen Texasfiber vorkommt, ist die Anwendung der Simultanmethode mit Schwierigkeiten verknüpft. Denn in diesem Falle können durch die kombinierte Wirkung der milden Rinderpestattacke und der infolgedessen aufflammenden Blutkrankheiten große Impfverluste entstehen. Man ist dann gezwungen, die Impfverluste entweder zu ertragen oder die Immunität durch Anwendung größerer Mengen des Immunserums allein hervorzurufen (passive Immunisierung allein). Statt des von Rindern stammenden virulenten Blutes kann man auch solches benutzen, welches von Schafen stammt. Es ist auf diese Weise unmöglich, durch das virulente Blut Infektionskrankheiten der Rinder zu übertragen. Die Simultanmethode ist in vielen hunderttausenden von Fällen in Südafrika, auf den Philippinen, in der Türkei und neuerdings in Ägypten angewandt worden und hat sich als eine durchaus brauchbare Methode erwiesen, wenn sie auch in manchen Fällen nicht anwendbar ist.

Die Benutzung der sogenannten französischen Methode von Bordet und Danysz, wobei den Rindern zunächst große Mengen defibrinierten Immunblutes eingeimpft werden und darauf die natürliche Infektion der Rinder durch Kontakt mit rinderpestkranken Tieren herbeigeführt wird, ist durch die Simultanmethode nahezu vollständig verdrängt worden. Dieser Infektionsmodus hat sich vielfach als nicht zuverlässig erwiesen. Man ist später so verfahren, daß man den Tieren infektiöses Material, z. B. Nasenschleim, Darminhalt erkrankter Tiere auf Nase oder Maul gestrichen hat. Die Entdecker dieser Methode, Bordet und Danysz halten dieselbe in erster Linie für infizierte Herden geeignet. Vielfach sind aber gerade in solchen Herden sehr schlechte Resultate mit dieser Methode erzielt worden. Als ein bedenklicher Umstand aber muß die Benutzung größerer Mengen infektiösen Immunblutes bezeichnet werden, weil auf diese Weise sehr leicht Blutinfektionskrankheiten übertragen werden können. Außerdem ist eine Wertbestimmung des Blutes nicht möglich, wie dies beim Serum der Fall ist, und deshalb ist heutzutage zu der Anwendug dieser Methode nicht mehr zu raten.

(Literatur s. II. Bd.: Rinderpestserum.)

XXXII.

Schutzimpfung gegen Maul- und Klauenseuche.

Von

Prof. Dr. M. Casper

in Breslau.

Die Arbeiten, welche eine eigentliche Schutzimpfung gegen die Maul- und Klauenseuche zum Gegenstande haben, datieren erst aus den letzten 20 Jahren. In früheren Zeiten begnügte man sich mit der sogenannten Notimpfung, d. h. man infizierte, sobald die Seuche bei einigen Tieren eines Bestandes ausgebrochen war, sämtliche Tiere des betreffenden Stalles künstlich. Diese seit langem und heute noch allgemein übliche Notimpfung ist angezeigt, um durch eine raschere Durchseuchung des Bestandes die durch Mangel an Arbeitstieren (Zugochsen) bedingten Verluste möglichst herabzusetzen und eine frühere Beseitigung der Sperrmaßregeln zu erreichen. Die Zweckmäßigkeit dieser Methode wird auch durch die Erfahrung unterstützt, daß die Impfkrankheit in der Regel milder und oft auch rascher verläuft als jene nach natürlicher Infektion. Um schweren Verlusten vorzubeugen, darf jedoch die Impfung nur dann vorgenommen werden, wenn die Seuche einen milden Charakter besitzt; bei bösartigem Verlaufe der Seuche ist die Notimpfung als gefährlich zu unterlassen.

Das einfachste Verfahren dieser Notimpfung besteht darin, daß man auf die vorher mit reiner, rauher Leinwand etwas geriebene oder oberflächlich verletzte Maulschleimhaut den Speichel eines kranken Tieres aufstreicht oder den Tieren mit solchem Speichel verunreinigtes rauhes Futter verabreicht. Weniger praktisch und weniger zuverlässig ist die von einigen Seiten empfohlene Methode, mit Speichel oder Blaseninhalt imprägnierte Fäden aus Baumwolle oder Seide unter die Haut der Ohren oder des Schweifes hindurchzuziehen. Von den derartig infizierten Tieren erkranken durchschnittlich 50—80 %, die übrigen erweisen sich als immun.

Die ersten Schutzimpfungsversuche bei Maul- und Klauenseuche wurden 1880 von Nosotti[26]) in Oberitalien angestellt. Nosotti gewann den Inhalt von geschlossenen Blasen aus der Maulschleimhaut geschlachteter Rinder, verdünnte denselben mit Flüssigkeit aus der vorderen Augenkammer von Rindern oder mit Blutserum und injizierte diese Flüssigkeit mittels Pravatzscher Spritze bei Rindern subkutan, ca. 1 ccm pro Kopf. Die Versuche wurden durch eine vom Landwirtschaftsrate zu

Pavia eingesetzte Kommission bei einer großen Anzahl von Tieren, bei etwa 2000 Rindern vorgenommen und hatten folgendes Resultat: ein Teil der Tiere bekam nach der Einspritzung keinen Blasenausbruch, war aber auch gegen spätere Infektionen nur zum Teil geschützt; ein anderer Teil der geimpften Rinder erkrankte schon nach der Einspritzung von Lymphe an Maul- und Klauenseuche. Die Kommission sprach sich daher in einem am 4. August 1883 publizierten Bericht sehr vorsichtig aus und hielt mit einer Anpreisung der Methode zurück mit Hinweis darauf, daß die Zahl der Versuche noch zu gering sei.

Später wurden von verschiedenen Seiten Versuche in Angriff genommen, um festzustellen, ob man durch Injektion von Blut, Serum oder Milch solcher Tiere, die die Maul- und Klauenseuche überstanden haben, Immunität bei anderen Rindern erzeugen kann. Alle diese Versuche führten übereinstimmend zu einem negativen Resultat. So wurde von Schütz[31]) zwei Rindern, welche nach künstlicher Infektion durchgeseucht hatten, nach völliger Genesung Blut entzogen und das daraus gewonnene Serum zwei Rindern, welche nachweislich vorher an der Krankheit nicht gelitten hatten, unter die Haut gespritzt (100—200 ccm). 22 Tage später wurden beide Rinder mit virulentem Blaseninhalt infiziert und erkrankten nach 48—60 Stunden typisch an der Seuche. — David und Zernecke[4]) entnahmen zu demselben Zweck drei Rindern, welche vor 3 Wochen die Seuche natürlich überstanden hatten, Blut und injizierten das daraus gewonnene Serum neun bisher noch nicht erkrankten Rindern in Dosen von 20, 50, 100 ccm. Eine Woche danach wurde allen Rindern Geifer und Milch seuchenkranker Tiere teils ins Maul gewischt, teils in die Tränke gegeben. Genau 5 Tage darauf erkrankte das erste Tier (welches 100 ccm Serum erhalten hatte), und in wenigen Tagen waren alle Tiere von der Seuche ergriffen. — Auch Löffler und Frosch[17]) gelangten bei ihren Versuchen, das Blut durchseuchter Tiere zu Immunisierungszwecken zu verwenden, zu dem Resultat, daß das Blut in den angewendeten Mengen — 10—150 ccm — eine schützende Wirkung nicht besitzt und daß eine Schutzimpfung auf diesem Wege nicht erzielt werden kann. — Dieselben Autoren[18]) wiesen nach, daß auch in der Milch der immunen Kühe immunisierende Stoffe nicht enthalten seien, denn von den zwei frisch angekauften Kälbern, welche 14 Tage lang mit der Milch einer immunen fremden Kuh ernährt worden waren, erkrankte eins spontan an Maul- und Klauenseuche (Stallinfektion), das andere nach der Einspritzung von $^1/_{100}$ ccm Lymphe.

Ohne praktischen Wert sind auch die Versuche geblieben, die Behla[2]) zur Erzielung einer Schutzimpfung 1892 anstellte. Er injizierte Blasenlymphe oder Maulspeichel, die durch Filtration gereinigt und mit 0,5 % Karbolsäure versetzt waren, subkutan bei drei Hühnern, einem Lamm und einem Ferkel. Alle Tiere blieben nach der 6 Tage später ausgeführten Kontrollimpfung gesund. Ebertz[5]) bemerkt zu diesen Versuchen mit Recht, daß sie keinen praktischen Wert hätten, da sie an Tierarten vorgenommen wurden, die überhaupt nicht oder nur unsicher zu infizieren sind. —

Ebensowenig führte das Verfahren, welches Behla[3]) 1898 als Schnellimmunisierung veröffentlichte, zu einem praktisch brauchbaren Resultat. Er vermischte Speichel von kranken Tieren nach der Filtration mit gleichen Teilen einer 20 %igen (für Schweine) bzw. 40 %igen Jodkaliumlösung (für Rinder) und spritzte 3 Tage hintereinander bei Ferkeln bzw. Rindern je 10 ccm subkutan ein. —

Wichtige Fragen auch bezüglich der Immunität bei Maul- und Klauenseuche wurden entschieden durch die Arbeiten der Kommissionen, welche zur Erforschung der Ätiologie und zur Ermittlung einer wirksamen Bekämpfung der Seuche seitens des preußischen Kultusministeriums im Institut für Infektionskrankheiten unter Leitung Löfflers und seitens des Reichsamtes des Innern im Kaiserlichen Gesundheitsamte eingesetzt wurden. Im Jahre 1897 veröffentlichten zuerst Löffler und Frosch[16]), daß im Blute von Tieren, welche die Krankheit überstanden haben, Stoffe vorhanden seien, denen die Fähigkeit innewohnt, die Erreger der Maul- und Klauenseuche unschädlich zu machen. Wenn das defibrinierte Blut solcher Tiere mit virulenter Lymphe gemischt und Versuchstieren in die Blutbahn eingespritzt wurde, so erkrankten diese nicht augenfällig und erwiesen sich bei der 3 Wochen später vorgenommenen Kontrollimpfung immun. Es ließ sich also durch die Einspritzung eines Immunblutlymphegemisches Immunität erzielen. Die Versuche im Reichsgesundheitsamte hatten nicht gleichgünstige Ergebnisse, vielleicht weil bei den Kontrollimpfungen 20—40mal mehr Lymphe als im Institut für Infektionskrankheiten verwendet worden war. — Ferner konnten Löffler und Frosch[17]) Immunität hervorrufen durch intravenöse Einspritzung von Lymphe, welche durch Erwärmen auf bestimmte Temperaturgrade abgeschwächt bzw. unwirksam geworden war.

Diese Schutzimpfung mit erhitzter Lymphe ließen die Genannten später fallen, weil der Prozentsatz der nach der Probeimpfung erkrankten Tiere größer war als der immun gewordenen. Die Lymphe konnte weiterhin auch dadurch abgeschwächt und für die Erzielung der Immunität brauchbar gemacht werden, daß sie längere Zeit im Eisschrank stehen blieb.

Alle diese Versuche liefen darauf hinaus, eine aktive Immunität herbeizuführen, d. h. einen Impfschutz, bei welchem der Körper selbst diejenigen Stoffe produziert, welche nachher einen Schutz gegen eine spätere Infektion bedingen. In einem späteren Versuch konnten Löffler und Frosch mitteilen, daß das zur Immunisierung von Kälbern notwendige Quantum frischer Lymphe $^1/_{40}$—$^1/_{50}$ ccm beträgt, während die Menge des dieser Lymphe zuzusetzenden Immunblutes innerhalb weiter Grenzen — 1—50 ccm — variiert.

Als nun Löffler und Frosch[17]) die Versuche, mit dem Immunblutlymphegemisch Immunität zu erzeugen, in größerem Umfange in der Praxis ausführten, zeigte es sich, daß einzelne der behandelten Tiere infolge der Einspritzung des Lympheserumgemisches erkrankten, gleichviel ob 1, 5, 10, 20, 50 oder 100 ccm Serum mit $^1/_{50}$ ccm Lymphe vermischt waren und auch dann, wenn das Quantum der Lymphe auf $^1/_{100}$ bis $^1/_{200}$ ccm herabgesetzt wurde, ferner auch dann, wenn Serum von sehr hoch immunisierten Tieren verwendet wurde. Der Grund hierfür lag, wie sich herausstellte, darin, daß bei dieser Methode ein Faktor vorhanden war, welchen die Kommission nicht beherrschen konnte, nämlich die Virulenz der Lymphe. Es wurde ermittelt, daß die Virulenz der Lymphe in den verschiedenen Seuchengängen eine verschiedene ist, und daß namentlich bei der Fortzüchtung der Lymphe von Tier zu Tier bald schneller bald langsamer eine Abnahme der Virulenz eintritt. die bis zur vollständigen Unwirksamkeit führen kann. Da also das Immunblutlymphegemisch unsichere Resultate gab, weil der Faktor der Virulenz ein so schwankender war, so suchte die Kommission[18]), in welche in-

zwischen an Stelle der Prof. Dr. FROSCH der Oberarzt Dr. UHLENHUTH eingetreten war, dem Immunblute eine solche Kraft zu verleihen, daß auch die stärkste Lymphe mit demselben vermischt, bei der Einspritzung unwirksam gemacht werden mußte. Um ein so hochwirksames Serum zu erhalten, spritzte man größeren Tieren, Rindern und Pferden, große Mengen von Lymphe ein, 10, 20, 30 ccm und mehr, ging also in ähnlicher Weise vor wie bei der Herstellung des Diphtherieserums.

Durch diese Art der Vorbehandlung großer Tiere mit steigenden Mengen möglichst virulenter Lymphe glaubte die Kommission ein für die Praxis brauchbares Schutzimpfungsverfahren gewonnen zu haben.

Von den Farbwerken vorm. Meister, Lucius und Brüning zu Höchst a. Main wurde diese Schutzserumlymphe unter der Kontrolle LÖFFLERS im großen hergestellt und Anfang November 1898 unter dem Namen „Seraphthin" in den Handel gebracht.

Nach der dem Mittel beigegebenen Gebrauchsanweisung bestand dasselbe aus Dosen von 10, 15 und 20 ccm Blutserum von immunisierten Tieren, das durch einen Gehalt von 0,5 % Karbolsäure gegen das Verderben geschützt war. Den einzelnen Dosen Serum war jedesmal $^1/_{50}$ ccm Lymphe zugesetzt. Die Einspritzung sollte bei Rindern in die Drosselvene (Vena jugularis), bei Schweinen in die Muskulatur des Hinterschenkels erfolgen. Die Menge der einzuspritzenden Flüssigkeit betrug bei Rindern unter 400 kg und bei Schweinen 10 ccm, bei Rindern von 400—800 kg 15 ccm und bei noch schwereren Tieren 20 ccm. Das Mittel wurde von der Fabrik zur Impfung in folgenden Fällen empfohlen:

1. In Beständen, in welchen die Maul- und Klauenseuche ausgebrochen ist. Die erkrankten Tiere werden von den gesunden isoliert und ihre Stände mit 2 % Formallösung oder mit Kalkmilch desinfiziert. Die noch nicht erkrankten Tiere werden möglichst schnell der Schutzimpfung unterzogen. Die Mehrzahl dieser der Infektion ausgesetzten Rinder wird dann nicht erkranken.
2. In gesunden Beständen, in deren Nachbarschaft die Seuche ausgebrochen ist.
3. In gesunden Beständen, in welche von außerhalb bezogene Tiere eingestellt werden sollen.

Bezüglich der Dauer des Impfschutzes besagt die Gebrauchsanweisung, daß die mit dem Seraphthin behandelten Tiere sich drei Monate nach der Behandlung immun gegen Einspritzungen virulenter Lymphe in die Blutbahn erwiesen hätten. Voraussichtlich werde die künstliche Immunität ebenso lange dauern wie die natürliche Immunität, deren Dauer nach den bisherigen praktischen Erfahrungen zu einem bis mehreren Jahren ermittelt sei.

Das Seraphthin fand trotz des hohen Preises — 10 ccm kosteten 3 M., 15 ccm 4.50 M., 20 ccm 5.50 M., Füllungen 5 Dosen à 10 ccm 13.50 M. und 10 Dosen à 10 ccm 25 M. — in kurzer Zeit eine ausgedehnte praktische Anwendung, ein Beweis dafür, daß für ein brauchbares Schutzimpfungsverfahren ein dringendes Bedürfnis vorlag. Leider aber hat das Präparat in der Folge die versprochenen Eigenschaften nicht gehalten: es war nicht imstande, die geimpften Tiere vor der Maul- und Klauenseuche zu schützen, und zweitens wurde durch dasselbe die Aphthenseuche in einen großen Teil der Bestände sogar eingeschleppt. Aus letzterem Grunde wurde die Ausgabe des Seraphthins seitens der Höchster Farbwerke bald eingestellt.

Ungünstige Resultate nach der Impfung mit Seraphthin wurden u. a. mitgeteilt von Kitt und Hermann[15]), Schmidt[28 29]), Flatten[6]), Jonen[12]), Schrader[30]), Friedrich, Winter[34]), Schindler[27]).

Auch die Nachprüfungen im Gesundheitsamt an Rindern ergaben, daß dieselben durch die Impfung nicht immun geworden waren. Der Grund, weshalb durch die Impfung mit Seraphthin statt der Immunität eine Verschleppung der Seuche erzielt wurde, lag in folgendem: Nachdem die Lympbe ein Jahr lang von Tier zu Tier fortgezüchtet worden war, hatten die Höchster Farbwerke, weil eine Abschwächung dieses Lymphestammes sich bemerkbar machte, einen neuen Lymphestamm aus einem frischen Seucheausbruch in den Betrieb eingeführt. Diese Lymphe war nun von so heftiger Virulenz gewesen, daß selbst das hochwirksame Serum ihre krankmachende Wirkung nicht aufzuheben vermocht hatte. Die Schwierigkeit lag darin, daß man keinen geeigneten Maßstab hatte, um die Virulenz der Lymphe zu messen. Die kleinen Versuchstiere, welche man bei der Herstellung anderer Sera zur Wertbestimmung benutzte, versagten bei Maul- und Klauenseuche vollkommen, sie erkrankten und starben selbst nach der Einverleibung großer Lymphemengen nicht.

Auf der Suche nach einer geeigneten Tierspezies fanden später Löffler und Uhlenhuth[19]) in dem Ferkel ein Tier, mit Hilfe dessen die Virulenz der Lymphe sich bestimmen ließ. Sie konnten feststellen, daß eine aus einem frischen Ausbruche gewonnene Lymphe gewöhnlich in der Dosis von $^1/_{10}$ ccm ein Ferkel von vier bis fünf Wochen innerhalb kurzer Zeit tötet, daß zuweilen schon $^1/_{20}$—$^1/_{50}$ ccm einer Lymphe hierzu genügen. Die Dosis Lymphe aber, welche eben noch imstande ist, ein Ferkel zu töten, ist der Maßstab für die Virulenz der Lymphe. Man hatte nur nötig, die Menge des Immunserums zu bestimmen, welche zur Lymphe hinzugesetzt werden muß, um den Tod bzw. eine Erkrankung des Ferkels zu verhindern.

Angesichts der großen Schwierigkeiten, welche infolge der schwankenden Virulenz der Lymphe für dieses Immunisierungsverfahren erwachsen, konnte man daran denken, die Lymphe bei der Immunisierung ganz fortzulassen und das Serum allein zur Schutzimpfung, zur Erzielung einer passiven Immunität zu verwenden. Bei den in dieser Richtung angestellten Versuchen der Kommission hat sich aber herausgestellt, daß die Dauer des Serumschutzes eine begrenzte ist und nur etwa zwei bis drei Wochen beträgt. Gibt man ein Multiplum der schützenden Dosis, so dauert der Schutz auch nicht wesentlich länger. Die Beobachtungen in der Praxis haben diesen Befund durchaus bestätigt; die Tiere waren zwei bis drei Wochen geschützt, dann aber erkrankte die überwiegende Mehrzahl bei einer künstlichen Infektion.

Parallel mit diesen Immunisierungsversuchen der Kommission hatte Tierarzt Hecker im Seucheninstitut der Landwirtschaftskammer für die Provinz Sachsen Untersuchungen angestellt, um ein Schutzimpfungsverfahren bei Maul- und Klauenseuche auszuarbeiten. Nachdem der erste Bericht von Löffler und Frosch erschienen war, teilte Hecker[7]) in einem Artikel, in welchem er die Priorität eines Schutzimpfungsverfahrens für sich in Anspruch nahm, mit, er habe gefunden, daß im Blute der immun gewordenen Tiere Stoffe vorhanden seien, welche sogar noch den Ausbruch der Seuche verhindern bei Tieren, die das Kontagium vor der Injektion dieser Stoffe schon aufgenommen haben. Außerdem behauptete Hecker, daß der Immunisierungswert des Serums

in mehrfacher Weise erhöht werden kann. Die Herstellungart des HECKERschen Serums wurde aber nirgends veröffentlicht.

Nach weiteren Angaben HECKERS[8, 9]) soll es ihm gelungen sein, durch fortgesetzte Injektionen gesteigerter Mengen virulenten Kontagiums und virus- und toxinhaltigen Blutes bei einer großen Anzahl von Tieren die schützenden Stoffe im Blute zu steigern und ein Serum darzustellen, das für sich angewandt, bei ca. 1000 Impfungen ca. 81 % der Impflinge vor der Seuche schützte. Die Versuche aber, die im Auftrage des preußischen Landwirtschaftsministeriums auf verschiedenen Gütern der Regierungsbezirke Breslau, Frankfurt a. O. und Potsdam mit dem HECKERschen Impfstoffe vorgenommen wurden, um ein Urteil über den praktischen Wert desselben zu gewinnen, haben dargetan, „daß das HECKERsche Verfahren in seiner derzeitigen Form und Anwendung nicht geeignet ist, eine Heil- und Schutzwirkung gegenüber der Aphthenseuche zu entfalten“[10]).

Die späteren Mitteilungen der Kommission (LÖFFLER und UHLENHUTH[20, 21]) lassen einen wesentlichen Fortschritt in der Erzielung einer praktisch zuverlässigen Schutzimpfungsmethode nicht erkennen. Da der durch Serum allein bedingte Schutz von sehr kurzer Dauer ist, und da die Rinder bei drohender Seuchengefahr in etwa 14tägigen Zwischenräumen immer wieder geimpft werden müßten, um sicher geschützt zu sein, so würden die Kosten der Schutzimpfung so hohe sein, daß sie praktisch nicht durchführbar wäre. LÖFFLER und UHLENHUUH[20]) selbst erklären daher diese Art der Schutzimpfung für Rinder als unmöglich, empfehlen dagegen die Anwendung dieses Serums als Immunisierungsmittel für Schafe und Schweine. Eine Menge von 5—20 ccm des Serums sei ausreichend, um Schafe und Schweine selbst in Mitten kranker Tiere vor der Infektion sicher zu schützen. Der durch das Serum gewährte Schutz erstreckte sich über drei bis vier, ja selbst sechs Wochen, d. h. über einen Zeitraum, innerhalb welcher die Seuche stets erlösche.

Mit der Herstellung des hochwertigen Pferdeserums erklärten LÖFFLER und UHLENHUTH das Problem der Schutzimpfung für Schweine und Schafe als endgiltig gelöst, das Serum habe sich in ausgedehnten Versuchen in der Praxis ausgezeichnet bewährt. Die Kommission ließ daher im Jahre 1901 durch die Höchster Farbwerke ein Serum herstellen, welches der staatlichen Prüfung durch das EHRLICHsche Institut für experimentelle Therapie unterstehen sollte, und empfahl dasselbe für die Schutzimpfung von Schafen und Schweinen. — Man muß aber MALKMUS[24]) entschieden recht geben, wenn er dieser Impfung jeden praktischen Wert abspricht. Was will eine Schutzimpfung gegen Maul- und Klauenseuche, die nur bei Schafen und Schweinen wirksam ist? Der Regel nach tritt die Seuche bei diesen Tieren so gelinde auf, daß sie nicht bemerkt wird; in vielen Fällen erkranken sie gar nicht. Wenn noch dazu auch bei diesen Tieren der Serumschutz unter Anwendung größerer Dosen nur vier bis sechs Wochen dauert, so kann von einer praktischen Bedeutung dieses Verfahrens nicht die Rede sein. In der Tat ist auch nach diesem Schutzserum für Schafe und Schweine gar keine Nachfrage gewesen.

Da bei Rindern die passive Immunisierung mit Serum wegen der zu kurzen Dauer des Impfschutzes und der hohen Kosten aussichtslos war, so entschlossen sich LÖFFLER und UHLENHUTH[22]) wieder dazu, die aktive Immunität mit Hilfe der Lymphe zu versuchen. Nach vergeblichem Bemühen, die virulente, mit Wasser oder physiologischer Kochsalslösung verdünnte und dann durch BERKEFELD-Filter bakterienfrei filtrierte

Lymphe durch Aufbewahrung bei niedriger Temperatur (im Eisschrank) oder durch Einwirkung hoher Temperaturen oder durch Zusatz chemischer Substanzen derartig abzuschwächen, daß ein geeignetes Immunisierungsmaterial daraus entsteht, gelangte Löffler[22]) im weiteren Verlauf der Versuche zu folgenden Ergebnissen:

1. Bei Einspritzungen von Serumlymphegemischen muß die Serummenge in einem bestimmten Verhältnis zur Lymphe stehen, wenn eine gleichmäßige Grundimmunität erzielt werden soll.

2. Es ist möglich, diese Grundimmunität mit Hilfe sehr geringer Serummengen herbeizuführen und

3. es gelingt sicher, die relativ schwache Grundimmunität durch nachfolgende Einspritzungen von Lymphe zu einer sehr hochgradigen zu machen.

Auf Grund dieser Ergebnisse gab Löffler[23]) auf dem VIII. internationalen tierärztlichen Kongreß zu Budapest 1905 ein neues Immunisierungsverfahren bekannt, welches in folgendem besteht:

„Den zu immunisierenden Rindern werden 0,5 ccm hochwertigen Rinderserums vermischt mit $^3/_{100} = 0{,}03$ ccm frischer virulenter Lymphe unter die Haut gespritzt. Nach 24—26 Tagen wird ihnen $^1/_{300} = 0{,}0033$ ccm Lymphe ebenfalls unter die Haut gespritzt, nach weiteren 12—14 Tagen $^1/_{100} = 0{,}01$ ccm Lymphe und nach ferneren 12—14 Tagen $^1/_{25} = 0{,}04$ ccm Lymphe.“

Dieses Verfahren sei zwar etwas umständlich, weil bei vollständiger Durchführung desselben vier Einspritzungen erforderlich sind, aber es sei ungefährlich, und vor allem außerordentlich billig, das gesamte für ein Rind erforderliche Material würde 30—50 Pfg. kosten.

Hierzu muß bemerkt werden, daß der Anwendung dieses neuesten Immunisierungsverfahrens in der Praxis schwere Bedenken entgegenstehen, auf die schon Hecker[11]) aufmerksam gemacht hat. Zunächst dürfte es praktisch kaum durchführbar sein, größere Rinderbestände viermal in ganz bestimmten Zeitpunkten zu impfen. Weiterhin tritt die volle Immunität erst ca. 50 Tage nach Beginn der Impfung ein; in Zeiten der Seuchegefahr könnte die Seuche inzwischen längst den Bestand ergriffen haben, ehe der Schutz, die Immunität perfekt wird. Dazu kommt endlich der Umstand, daß die Einspritzung virulenter Lymphe zu verschiedenen Zeiten nicht ganz unbedenklich ist, es erscheint die Gefahr nicht ausgeschlossen, daß hierbei eine Verschleppung des Infektionsstoffes in gesunde Bestände erfolgt. Hecker[11]) betont ganz richtig, daß derartig behandelte Rinder für die Dauer der Impfung, d. h. ca. 2—3 Monate unter Sperre gestellt werden müßten.

Wenn daher Löffler sich dahin ausspricht, es sei nicht nur die Wirksamkeit des Schutzserums, sondern auch seine eminente praktische Brauchbarkeit zur Bekämpfung der Seuche zur Evidenz bewiesen, so liegt für diese zuversichtliche Auffassung bisher keine Berechtigung vor.

Zu ähnlichen Resultaten, wie die Kommission, gelangte Nocard[25]) bei seinen Untersuchungen, die er zusammen mit Roux im Auftrage und mit Unterstützung des ehemaligen Landwirtschaftsministers Dupuy ausgeführt hat. Wie Löffler und Frosch konnten auch Nocard und Roux nachweisen, daß das Serum von Tieren, die einen schweren Anfall von Aphthenseuche überstanden haben, auf die Entwicklung des Ansteckungsstoffes einen hemmenden Einfluß ausübt. Wenn es Rindern in großen Mengen eingespritzt wird, so verleiht es Schutz gegen eine nachfolgende künstliche Infektion, verringert die Heftigkeit des Ausbruchs

und verhindert zuweilen überhaupt den Ausbruch der Krankheit. Dazu sind aber Mengen bis zu 1000 ccm erforderlich. Durch weitere Versuche ist es allerdings gelungen, die Aktivität des Serums derart zu erhöhen, daß eine Einspritzung von 20 ccm genügt, um Rinder gegen die nachfolgende künstliche Infektion zu schützen, während die Kontrolltiere heftig erkranken. Diese Versuche sind nicht nur im Laboratorium, sondern auch in der Praxis mit gleich günstigen Resultaten angestellt worden. Das antiaphthöse Serum erwies sich dabei sehr wirksam, ist aber wie NOCARD selbst betont, für die Anwendung in der Praxis und für die Bekämpfung der Maul- und Klauenseuche nicht brauchbar, weil die dadurch bedingte Immunität nur 14 Tage vorhält. Es ist aber erstens unmöglich, so große Mengen von Serum herzustellen, um beim Ausbruch auch nur einer kleinen Epizootie jedem Tiere alle 14 Tage 20 ccm Serum einzuspritzen, und zweitens würden die Kosten eines solchen Verfahrens viel zu hoch sein. An eine praktisch brauchbare Schutzimpfung gegen Maul- und Klauenseuche wird man nach NOCARD erst dann denken können, wenn es einmal gelingen sollte, die Erreger dieser Krankheit künstlich zu züchten.

Anhangsweise sei hier erwähnt, daß vor einigen Jahren WINKLER[33]) behauptete, man könne durch Verfütterung abgekochter Milch maul- und klauenseuchekranker Tiere Immunität erzielen. Einen Anspruch auf wissenschaftliche Bedeutung konnte diese Mitteilung von vornherein nicht machen und die Erfahrungen in der Praxis lehrten bald die vollständige Wertlosigkeit dieses Verfahrens.

Wenn wir am Schlusse unserer Ausführungen das Fazit ziehen, so müssen wir gestehen, daß das Resultat der mühevollen und kostspieligen Untersuchungen, so wertvoll dieselben für die Wissenschaft sind, bezüglich praktischer Erfolge ein sehr bescheidenes ist und daß wir zur Stunde ein Schutzimpfungsverfahren, welches den berechtigten Anforderungen der Praxis genügt, noch nicht besitzen. Die Gründe, weshalb alle in dieser Richtung angestellten Versuche gescheitert sind und scheitern mußten, sind nach der Ansicht des Referenten hauptsächlich folgende:

1. Wir kennen den Erreger der Maul- und Klauenseuche bis heute nicht; wir wissen nur aus den schönen Untersuchungen von LÖFFLER und FROSCH[17]), daß die Erreger der Seuche so klein sein müssen, daß sie die Poren eines auch die kleinsten bisher bekannten Bakterien sicher zurückhaltenden Filters zu passieren vermögen. Es ist daher nach den Berechnungen von HELMHOLTZ und ABBE über die Grenzen der Leistungsfähigkeit unserer Mikroskope anzunehmen, daß die Erreger auch mit den besten modernen Immersionsystemen nicht mehr differenzierbar sind.

Man könnte sich über diesen Mangel hinwegsetzen, wenn es

2. durch irgend ein Verfahren gelingen würde, die Erreger künstlich zu züchten, so daß man auf künstlichen Nährböden größere Mengen virulenten Materials gewinnen könnte. Bisher sind alle dahin zielenden Bemühungen vergeblich gewesen, trotz der Anwendung der verschiedenartigsten Züchtungsmethoden und Substrate. Man ist daher einstweilen auf die verhältnismäßig geringen Mengen von Lymphe angewiesen, welche nach der künstlichen Infektion von Schweinen in den Blasen des Rüssels und der Klauen enthalten und Träger des Erregers sind. Man kann also eine größere Menge dieser Flüssigkeit, die für die aktive Immunisierung großer Tiere zum Zwecke der Gewinnung eines

hochwirksamen Serums unbedingt erforderlich ist, überhaupt nur sehr schwer, mühevoll und nur unter Aufwendung großer Kosten gewinnen. Wenn man bedenkt, wie leicht es beispielsweise bei der Diphtherie und dem Schweinerotlauf ist, ungemessene Mengen von Reinkulturen, bzw. Toxinen herzustellen, so wird dieser Übelstand bei der Maul- und Klauenseuche besonders eklatant. Und solange nicht virulentes Material in größerer Menge zur Verfügung steht, wird eine aussichtsvolle Immunisierung großer Tiere zum Zwecke der Lymphegewinnung ein frommer Wunsch bleiben.

3. Eine große Schwierigkeit besteht ferner darin, daß uns keine kleinen Versuchstiere zur Verfügung stehen, welche für die Infektion mit Maul- und Klauenseuche leicht empfänglich sind. Bisher sind nur Rinder und Schweine für die Versuche verwendbar, und alle Bemühungen, kleinere geeignete Versuchstiere aufzufinden, sind resultatlos geblieben. Der Mangel an kleinen Versuchstieren und die Notwendigkeit, zu einer jeden Prüfung, sei es von Serum oder von Lymphe, mehrere Rinder oder Schweine heranzuziehen, erschweren und verteuern die Versuche außerordentlich. Dazu kommt, daß sehr lästige und strenge Absperrungsmaßregeln getroffen werden müssen, damit nicht eine Verschleppung der Seuche durch die zu den Versuchen benutzten Tiere stattfindet. Bei der außerordentlich großen Ansteckungsgefahr ist eine solche Übertragung trotz peinlicher Vorsichtsmaßregeln nur zu leicht möglich, wie die Erfahrung gelehrt hat.

4. Außerordentlich störend bei den Versuchen, eine praktische Schutzimpfungsmethode auszuarbeiten, ist die schwankende Virulenz der Lymphe.

Je nach der Herkunft, der Art der Konservierung und je nach dem Alter ist dieselbe eine verschiedene. Wir kennen keine Methode, um die Virulenz der Lymphe auf einer konstanten Höhe zu erhalten, wir haben auch keinen rechten Maßstab, um den Grad der Virulenz genau festzustellen. Will man aber von den mit Lymphe vorbehandelten Tieren ein hochwirksames Serum erzielen, so muß die zur Verwendung kommende Lymphe eine möglichst hohe Virulenz besitzen, wie auch bei der Herstellung anderer Sera ein möglichst hoher Grad von Giftigkeit der Kulturen gewünscht wird. Da die Lymphe innerhalb kurzer Zeit bezüglich der Virulenz sich ändert, ist es sehr schwierig, eine rationelle, gleichmäßig ansteigende Immunisierung der serumliefernden Tiere durchzuführen.

Besonders verhängnisvoll ist diese Eigenschaft der Lymphe bei der Zusammenmischung mit Serum. Da das Serum allein, worüber kein Zweifel mehr bestehen kann, nur einen kurzen, ungenügenden Schutz verleiht, so wird die Immunisierung mit Serum allein niemals für die Praxis genügen. Das Bestreben wird also immer darauf hinausgehen müssen, eine passive Immunität durch Serum und eine aktive Immunität durch Lymphe herbeizuführen, ähnlich wie es bei der Rotlaufimpfung und Rinderpestimmunisierung der Fall ist. Man wird also Serum und Lymphe vorher zusammenmischen und das Gemisch einspritzen, oder man wird erst das Serum und getrennt für sich die Lymphe injizieren müssen. Hierbei macht sich die schwankende Virulenz der Lymphe außerordentlich fühlbar.

Löffler gibt selbst zu, daß bei den Einspritzungen von Serum-Lymphe-Gemischen die Serummenge in einem bestimmten Verhältnis zur Lymphe stehen muß, wenn eine sichere Immunität erzielt werden soll. Ist die Lymphe zu virulent, dann tritt nach der Einspritzung des

Serum-Lymphe-Gemisches statt der erhöhten Immunität Maul- und Klauenseuche ein, wie es nach der Anwendung des Seraphthins vielfach der Fall war; ist die Lymphe zu wenig virulent, zu sehr abgeschwächt, dann ist die Folge eine ungenügende oder ganz ausbleibende Immunität. Nun ist aber der Zeitpunkt, in welchem die Lymphe die wünschenswerte immunisierende Eigenschaft besitzt, ohne zu virulent zu sein, nach Löfflers eigenen Worten sehr schwer zu bestimmen. Er kann nur durch immer wiederholte Immunisierungsversuche ermittelt werden, und das ist bei dem Mangel geeigneter kleiner Versuchstiere mit wünschenswerter Genauigkeit überhaupt nicht ausführbar. Es kann also die Serummenge und die Lymphemenge nicht derart genau gegeneinander austitriert werden, daß die Lymphe zwar an ihrer krankmachenden Wirkung verhindert, aber doch nicht vollkommen unwirksam gemacht wird, d. h. also nur soweit abgeschwächt wird, daß sie noch eine zur Erzeugung der Immunität ausreichende Reaktion im Tierkörper auszulösen vermag.

Aber selbst wenn das gelingen sollte, wie will man dieses bestimmte Verhältnis dauernd aufrecht, konstant erhalten, da das Gemisch doch nicht unmittelbar nach der Herstellung zur Anwendung kommt, sondern erst nach Wochen oder Monaten. Die beiden Faktoren, das Serum und die Lymphe verhalten sich nicht gleichmäßig, sondern weichen bezüglich ihrer Haltbarkeit wesentlich voneinander ab; das Serum behält analog den anderen Serumarten bei zweckmäßiger Konservierung seinen Wirkungswert sicher Jahre lang nahezu konstant bei, während die Lymphe entschieden mit der Zeit an Virulenz abnimmt, ohne daß man im einzelnen Falle einen Maßstab dafür hat, in welchem Tempo die Abschwächung vor sich geht und mit welchem Zeitpunkt die Virulenz ganz aufhört. Wenn also das Gemisch, dessen Bestandteile heute in einem richtigen, für die Immunisierungszwecke geeigneten Verhältnisse zu einander stehen, eine Zeit lang sich überlassen bleibt, dann verschiebt sich dieses Verhältnis erheblich, die Lymphe verliert ihre Virulenz immer mehr und erzeugt nur eine schwache oder gar keine Immunität. Wir sind also nicht imstande, zu beurteilen, wie das Verhältnis zwischen Lymphe und Serum nach einer gewissen Zeit, im Momente der Impfung sich gestalten und wie das Resultat der Impfung ausfallen wird. Die schwankende, nicht genau bestimmbare Virulenz der Lymphe ist eine Klippe, an der auch das neueste Immunisierungsverfahren Löfflers scheitern muß, bei welchem er mit Größen wie 0,0033 ccm Lymphe rechnet, die festzulegen nach des Referenten Ansicht ganz unmöglich ist.

Die vorgenannten Schwierigkeiten sind es hauptsächlich, welche der Erzielung eines praktisch brauchbaren Schutzimpfungsverfahrens bei der Maul- und Klauenseuche hindernd im Wege stehen. Ich halte deshalb das Suchen nach einem Schutzimpfungsverfahren unter den obwaltenden Umständen für aussichtslos. Man wird, wie schon Nocard[25]) betont, erst dann ernstlich daran denken können, ein zuverlässiges Immunisierungsverfahren auszuarbeiten, wenn es gelungen sein wird, den Krankheitserreger künstlich zu züchten. Das Problem einer zuverlässigen allgemeinen Schutzimpfung gegen die Maul- und Klauenseuche des Rindes ist somit auch heute noch ungelöst.

Literatur.

1) Arbeiten zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche. Kaiserl. Gesundheitsamt Januar und Mai 1898; Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1898, pag. 37 und 292.
2) Behla, Zur Schutzimpfung bei Maul- und Klauenseuche. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1892, pag. 577.
3) Ders., Über Schnellimmunisierung bei Maul- und Klauenseuche. Ebenda 1898, pag. 171.
4) David, Blutseruminjektionen bei Maul- und Klauenseuche. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1893, pag. 114.
5) Ebertz, Die Ergebnisse der neueren Untersuchungen über Maul- und Klauenseuche und ihre praktische Anwendung. Archiv für wissensch. und prakt. Tierheilkunde 1900, Bd. XXVI, pag. 105.
6) Flatten, Schutzimpfung gegen Maul- und Klauenseuche. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1899, pag. 15.
7) Hecker, Immunisierung gegen die Maul- und Klauenseuche. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1897, pag. 469.
8) Ders., Summarischer Bericht über die Ergebnisse usw. Ebenda 1898, pag. 131.
9) Ders., Untersuchungen zur Bekämpfung der Maul- und Klauenseuche. Ebenda, pag. 407.
10) Ders., Impfversuche gegen die Maul- und Klauenseuche nach der Heckerschen Methode. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1900, pag. 21.
11) Ders., Bericht über den VII. internationalen tierärztlichen Kongreß zu Budapest 1905, Bd. III, pag. 134.
12) Jonen, Schutzimpfung gegen Maul- und Klauenseuche mit Seraphthin. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1899, pag. 27.
13) Kitt, Sammelreferat. Monatshefte für Tierheilkunde 1894, Bd. V, pag. 319.
14) Ders., Ebenda 1899, Bd. X, pag. 39.
15) Kitt und Hermann, Wochenschr. für Tierheilkunde 1898, Nr. 51.
16) Löffler und Frosch, Summarischer Bericht über die Ergebnisse der Untersuchungen der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche. Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 617.
17) Dies., 1.—3. Bericht der Kommission. Ebenda 1898, pag. 80.
18) Löffler, 4. Bericht der Kommission. Ebenda, pag. 562.
19) Ders., Schutzimpfung gegen Maul- und Klauenseuche. Deutsche tierärztliche Wochenschr. 1899, pag. 317.
20) Löffler und Uhlenhuth, Über die Schutzimpfung gegen Maul- und Klauenseuche. Deutsche med. Wochenschr. 1901, pag. 7.
21) Dies., Bericht der Kommission über die Untersuchungen in den Etatsjahren 1901 und 1902. Ebenda 1903, pag. 670 und 685.
22) Löffler, Die Schutzimpfung gegen die Maul- und Klauenseuche. Ebenda 1905, pag. 1913.
23) Ders., Bericht des Medizinischen Kongresses zu Lissabon 1906.
24) Malkmus, Schutzimpfung gegen Maul- und Klauenseuche. Deutsche tierärztliche Wochenschr. 1901, pag. 16.
25) Nocard, La sérothérapie anti-aphtheuse. Revue générale de méd. vétér. 1903, Tome I, pag. 369.
26) Nosotti, Sulla genesi e natura dell'Afta epizootica. La clinica veterineria 1885, pag. 101.
27) Schindelka, Tierärztl. Centralbl. 1899, Nr. 2.
28) Schmidt, Schutzimpfung gegen Maul- und Klauenseuche. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1898, pag. 616.
29) Ders., Mißerfolg mit Seraphthin. Ebenda 1899, pag. 28.
30) Schrader, Mißerfolg des Seraphthin. Ebenda, pag. 16.
31) Schütz, Impfversuche zum Schutze gegen die Maul- und Klauenseuche. Archiv für Tierheilkunde 1894, Bd. XX, pag. 1.
32) Siegel, Über Immunisierungsversuche gegen Maul- und Klauenseuche. Deutsche med. Wochenschr. 1898, pag. 749.
33) Winkler, Über Immunisierung gegen Maul- und Klauenseuche durch Milch. Tierärztl. Central-Anz. 1901, Bd. VII, pag. 121.
34) Winter, Impfversuche mit Seraphthin. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1899, pag. 38.

XXXIII.

Über Immunisierung gegen Protozoen-krankheiten.

Von

Dr. Claus Schilling

in Berlin.

Einleitung.

Wenn man den Parasitismus als eine im Sinne der Erhaltung der Art zweckmäßige Einrichtung zu betrachten geneigt ist, so bietet unter den verschiedenen Formen parasitärer Lebensweise die Symbiose die günstigsten Aussichten für das Fortbestehen der parasitierenden Art. Denn wenn ein Parasit im Organismus des Wirtes nur eine schwache Reaktion erzeugt und sich außerdem den Abwehrmaßregeln des Zellstaates anzupassen vermag, so wird seiner Existenz und Vermehrung nur geringe Gefahr drohen. Dieses Endresultat sehen wir denn auch bei den parasitischen Protozoen in vielen Fällen erreicht.

Dem stehen aber eine Reihe von Faktoren hemmend entgegen: manche parasitische Protozoen sind in ihrer Vermehrung an bestimmte Zahlenverhältnisse gebunden, die in der Kernstruktur begründet sind, und deshalb kann ihre Vermehrung keine so schrankenlose sein, wie bei den Bakterien. Ferner ist der Entwicklungszyklus mancher Protisten (Malariaplasmodien) in seinem zeitlichen Ablauf sehr exakt begrenzt. Hierzu kommen noch die Gefahren, welche in dem bei den Protozoen sehr verbreiteten Wirtswechsel und der engen Anpassung der Organismen an diesen liegen. Diese für den Parasiten ungünstigen Umstände werden bei einer Reihe von Protozoenkrankheiten dadurch wenigstens teilweise kompensiert, daß die Einwirkung auf den Wirt entweder an sich eine sehr schwache ist, (sie äußert sich in einem chronischen Verlauf der Krankheit) oder daß solche Einwirkungen periodisch verlaufen und von Abschnitten normalen Befindens unterbrochen werden. Wir kennen nur wenige Protozoenkrankheiten akutester Natur mit hoher Mortalität, z. B. das ostafrikanische Küstenfieber.

Die Einwirkung des Parasiten auf seinen Wirt müssen wir uns als durch Gifte vermittelt vorstellen. Denn einen mechanischen Effekt können nur gewisse Parasiten (z. B. Trypanosomen) erzielen, wenn sie durch massenhafte Vermehrung die Kapillaren verstopfen. — Eine Entziehung von Nährstoffen dürfte wohl kaum in Frage kommen. — Daß

die pathogenen Protozoen Gifte bilden, welche in bestimmtem Sinne sehr energisch wirken können, dafür liefern die heftigen Fieberreaktionen z. B. bei Malaria, einen Beweis. Aber sie scheinen nur periodisch, synchron mit lebhaften Teilungsvorgängen der Parasiten, aufzutreten. Das Pigment, welches von gewissen endoglobulären Blutparasiten produziert wird und bei der Teilung in den Kreislauf des Wirtes gelangt, ist für sich allein nicht toxisch. Die Entstehung und Wirkung dieser Toxine ist bei den einzelnen Parasitenarten verschieden und wird deshalb besser bei den einzelnen Krankheiten erwähnt. Ihr Nachweis ist mit den bisherigen Methoden nicht möglich gewesen, auch nicht mit der Komplementbindungsmethode von Bordet und Gengou. Am charakteristischsten sind die Reaktionen des Körpers auf die Gifte bei der Malaria, am schwersten bei den Piroplasmosen, bei denen die Tiere häufig dem ersten Anfall erliegen. Wird jedoch der Anfall überstanden, so erfolgt bei keiner Protozoenkrankheit eine sofortige Vernichtung der Parasiten. Wohl verschwinden sie unter Umständen fast gänzlich aus dem zirkulierenden Blute, um aber in den inneren Organen dauernd weiter zu existieren und sich bei einigen Krankheiten exakt periodisch, bei anderen in unregelmäßigen Zwischenräumen neuerdings zu vermehren und die charakteristischen Rezidive zu veranlassen. Wenn überhaupt parasitizide Substanzen sich bilden, so sind sie in keinem Falle genügend, um die Eindringlinge sofort und überall im Körper zu vernichten. Und auch da, wo sich nach dem Anfall Immunkörper entwickeln (Piroplasmosen), sind sie nur in geringer Menge nachweisbar.

Hat sich nun nach einem oder mehreren Anfällen ein Gleichgewichtszustand zwischen Wirt und Parasit ausgebildet, und ist dieses Verhältnis ein stabiles — bei der Hämoglobinurie der Rinder z. B. kann ein solches viele Jahre hindurch beobachtet werden — so kann man es als Symbiose bezeichnen; kommen dagegen auch nach langer Zeit noch Rezidive vor (Malaria), so hat sich ein Zustand „labiler Infektion“ oder im Sinne des Wirtes gesprochen, der „Toleranz“, ausgebildet. Eine vollkommene Heilung durch gänzliches Aussterben der Parasiten erfolgt dann oft erst nach Jahren.

Voraussetzung für ein derartiges Gleichgewicht ist, daß der Wirtsorganismus nur ebensoviele seiner Abwehrkräfte (Alexine) dauernd mobil erhält, als genügen, um eine lebhafte Vermehrung der Parasiten, die mit einem Rezidiv gleichbedeutend wäre, zu verhindern. Andererseits aber müssen die Parasiten jenen Abwehrvorkehrungen die Wage halten, aber auch die Möglichkeit besitzen, auf eine gelegentliche Schwächung jener Schutzmittel mit einer Periode erneuter Aktivität zu antworten. Von den Malariaparasiten z. B. wissen wir, daß sie von einem Rezidiv zum anderen in der Form der Makrogameten (weiblichen Geschlechtsformen) persistieren, und sich kurz vor dem neuen Anfall, unter charakteristischen Reduktionsvorgängen am Kernapparat, wieder zu ungeschlechtlichen Vermehrungsformen (Schizonten) zurückdifferenzieren. Diese Formen widerstehen auch der Einwirkung des Chinins ganz besonders hartnäckig.

Diese Resistenzformen müssen in denjenigen Fällen, in welchen Schutzstoffe in dem immunen Körper zur Entwicklung gelangen, sogar auch diesen gegenüber widerstandsfähig sein. Ein gutes Beispiel hierfür bietet die Piroplasmose der Hunde: treibt man durch wiederholte Injektionen von Piroplasmenblut die aktive Immunität eines spontan geheilten Hundes in die Höhe, so enthält das Serum eines solchen Tieres therapeutisch und prophylaktisch wirksame Substanzen, allerdings nicht

in dem Maße, wie es bei bakteriellen Infektionen zu beobachten ist. Trotzdem vermag man mit dem Gesamtblute eines solchen Hundes andere tödlich zu infizieren. Für andere Tiere haben die Piroplasmen also von ihrer Virulenz nichts eingebüßt. Es kann sich hier nur darum handeln, daß die Parasiten (vielleicht sind es ganz bestimmte Stadien ihrer Entwicklung) parallel mit der Bildung der Immunkörper nun ihrerseits gegen diese immun werden.

Der Umstand, daß im peripheren Blute eines infizierten Tieres oder Menschen dauernd Parasiten, wenn auch in geringer Zahl, kreisen, ist von größter Bedeutung für das Weiterbestehen dieser Parasiten. Denn alle pathogenen Protozoen — mit Ausnahme der im Darm und dessen Anhängen schmarotzenden Amöben und Coccidien und der Ektoparasiten (der Fische) — müssen durch die Gewebe hindurch aus dem Körper des Wirtes herausgelangen, um auf einen zweiten übergehen zu können. Als Vermittler dienen hier fast ausschließlich blutsaugende Schmarotzer (Musciden, Culiciden, Ixodinen [Zecken], Acariden und bei den Fischen auch Hirudineen). Und bei einigen Protozoen entspricht diesem Wirtwechsel auch ein Generationswechsel, indem die geschlechtliche Vermehrung im Anschluß an die Konjugation innerhalb der Organe des betreffenden Insektes verläuft. Es ist klar, daß die Einstellung jenes Gleichgewichts zwischen dem Wirbeltiere als Wirt und dem Parasiten eine wichtige Kompensation bedeutet gegenüber den Gefahren, welchen die Parasiten innerhalb des freilebenden Insektes ausgesetzt sind. Erwähnt mag hier werden, daß das Übertreten der Parasiten in die Eier des Insektes bei mehreren Protozoen vorkommt, so eine Weiterexistenz der Art gewährleistend; außerhalb des Wirtes aber, z. B. im Blut aus einer Wunde, gehen diese genau dem Organismus angepaßten Zellen schnell zu Grunde, und auch der Tod des Wirtes bedeutet für die Parasiten sichere Vernichtung. (Gerade in diesen beiden Fällen wird der Unterschied zwischen Protozoen und Bakterien sehr klar.)

Zusammenfassend kann man heute sagen:

Die pathogenen endoparasitären Protozoen sind an den Parasitismus genau angepaßt. Die von ihnen gebildeten Gifte erzeugen stets Fieber. Der Verlauf der Krankheit ist nicht immer akut tödlich, sondern meist ausgesprochen chronisch. Das Überstehen eines Anfalles aber ist von der Bildung so geringer Mengen von parasitiziden Substanzen gefolgt, daß bei keiner Protozoenkrankheit die Parasiten sofort mit dem Aufhören des akuten Stadiums abgetötet werden. Auch tritt dann keine oder nur eine geringgradige Immunität ein. Bei vielen dieser Krankheitsformen aber kommt es entweder zu einer Symbiose, oder zu einer labilen Infektion (Toleranz), welche mit dem Aussterben der Parasiten enden kann.

Diese letztgenannte Beobachtung ist für die Bestrebungen, gegen Protozoenkrankheiten künstlich zu immunisieren, von ausschlaggebender Bedeutung. Eine echte sterilisierende Immunität (Ehrlich) kommt wahrscheinlich bei den Protozoen überhaupt nicht zur Ausbildung. Und da unsere bisherigen Immunisierungsmethoden darauf beruhen, das durch die Natur praktisch vorgezeigte Verfahren nachzuahmen, so haben wir bisher keine Aussicht, jenes Ziel einer sterilen Immunität bei Protozoen überhaupt zu erreichen. Die Natur hat bei einzelnen Protozoenkrankheiten schon Versuche im großen angestellt, um in ganzen Ländergebieten diese Krankheiten zu praktischer Bedeutungslosigkeit herabzudrücken. Die Südstaaten Amerikas sind mit Texasfieber so durchseucht, daß die leichten Erkrankungen der Rinder, namentlich der Kälber den

Viehbesitzern garnicht auffallen. Ähnlich liegt es bei dem Küstenfieber Ostafrikas. Und die Malaria verursacht zwar in den Tropen unter den Kindern eine hohe Sterblichkeit, die erwachsenen Eingeborenen dagegen erfreuen sich einer fast gänzlichen oder absoluten Unempfindlichkeit. Solange wir also noch nicht über zuverlässige Heilmittel gegen Protozoenkrankheiten verfügen, solange wir die Parasitenträger nicht mit Bestimmtheit ermitteln und unschädlich machen können und solange wir die Überträger, die blutsaugenden Insekten noch nicht mit Sicherheit auszurotten vermögen, — solange ist der Versuch, das Individuum durch die Impfung mit einer schwachvirulenten Form der Parasiten, also durch eine leichte und ungefährliche Erkrankung und durch die darauf folgende Toleranz gegen die Folgen der Infektion, nicht gegen diese selbst zu schützen, mindestens ebenso gerechtfertigt, wie die von anderen Erwägungen ausgehenden.

Koch wendet gegen dieses Prinzip ein, daß man auf diese Weise Parasitenträger künstlich schaffe und so die Krankheit dauernd unterhalte. Dagegen läßt sich erwidern, daß da, wo alle Individuen tolerante Parasitenträger sind, keines für das andere mehr eine Gefahr bedeutet. Voraussetzung ist, daß die Impfung ungefährlich ist, daß sie allgemein durchgeführt wird und auch bei Neugeborenen anwendbar ist. Wie weit diese Bedingungen erfüllbar sind, wie weit also der Kochsche Einwand Gültigkeit hat, kann erst bei den einzelnen Krankheiten besprochen werden.

Immunität bei Malaria.

Die Temperatursteigerung zu Beginn eines Anfalls fällt mit der Schizogonie (ungeschlechtlichen Teilung) der Plasmodien zusammen, die Erscheinungen des Anfalls werden also auf Stoffe, die hierbei in den Kreislauf kommen, zurückgeführt werden müssen.

Solche Toxine sind aber bei der Malariainfektion bisher noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen. Mannaberg erzielte zwar durch 0,7 ccm Blutserum eines Kranken, im Anfall entnommen, bei einem Gesunden eine Temperatursteigerung von 1,1° innerhalb 15 Minuten. Bei Cellis Versuchen wurde nicht frisches Serum verwendet; sie hatten negatives Resultat.

In den Tropen verläuft und endet die unbehandelte Malaria der Eingeborenen wesentlich anders als unter den gleichen Voraussetzungen in unseren Breiten. Koch und Dempwolff haben in Neuguinea (Bogadjim-Dörfer bei Stephansort) bei 100 Proz. der Kinder unter zwei Jahren Parasiten im Blute und bei vielen Milzschwellung konstatiert, die Erwachsenen dagegen ausnahmslos parasitenfrei und ohne Milztumor, blühend und kräftig gefunden. Ähnlich, wenn auch nicht so extrem liegen die Verhältnisse in den meisten Malariagebieten der Tropen. So sind nach A. Plehn in Kamerun 50 Proz. der Erwachsenen (an Ort und Stelle geboren) Parasitenträger. Durchgehend aber wird man finden, daß die Tropenbewohner etwa vom 10. Lebensjahre ab unter Malariafiebern entweder gar nicht oder nur so selten leiden, daß die Malaria, abgesehen von der hohen Kindersterblichkeit, als Krankheit der Erwachsenen keine wesentliche Rolle spielt.

Ob es sich bei jenen Neuguinea-Leuten um eine echte Immunität handelte, ist meines Wissens nicht durch Nachimpfungen und durch Milzpunktionen oder durch langdauernde Beobachtung derselben Personen geprüft worden. Ziemann konnte bei 3 unter 7 westafrikanischen Negern durch Einspritzung von Malariablut Anfälle erzeugen. Und von A. Plehn wird ein typischer Tertiana-Anfall bei einem erwachsenen Kamerunneger beschrieben.

Es ist also wahrscheinlich, daß nur bei einem Teil der in tropischen Malariagebieten aufgewachsenen Farbigen ein Zustand sich ausbildet, bei welchem die primäre Infektion vollkommen ausgeheilt ist und Neuinfektionen zu keiner Entwickelung der Parasiten mehr führen; bei einem anderen Teil der Tropenbewohner hat sich, so muß man annehmen, der ursprünglich pathogene Parasit in einen harmlosen Symbionten umgewandelt, den man gelegentlich im Blute findet und gewiß bei Milzpunktionen noch viel häufiger finden würde. Treten nun aber bei solchen Parasitenträgern Malariaanfälle auf, so handelt es sich nicht mehr um Symbiose, sondern um eine „labile Infektion". Eine solche schließt nun zwar eine Neuinfektion nicht aus, aber trotzdem muß gleichzeitig mit dem Vorhandensein virulenter Parasiten eine gewisse Unempfindlichkeit des Organismus gegen neu eingeimpfte Keime bestehen; denn sonst wäre eben jene hochgradige Unempfänglichkeit der erwachsenen Bewohner von tropischen Malariagegenden gegen die doch jedenfalls sehr häufigen Neuinfektionen nicht verständlich. Über die interessante Frage, wie eine solche Toleranz zustande kommt, liegen noch keine exakten Versuche vor. Sicher spielt der bald ständig, bald nur periodisch wiederholte Reiz durch die Neuinfektionen (die „Saisonmalaria" Dempwolffs), außerdem auch eine spezifisch immunisierende Wirkung der durch den Mückenstich eingeimpften Sporozoiten eine wesentliche Rolle.

Während nun die Tropenbewohner eine Immunität oder eine mehr oder weniger hochgradige Toleranz erwerben, führt die unbehandelte Malariainfektion in den gemäßigten Breiten nur ganz ausnahmsweise zur Immunität (Celli), viel häufiger folgt jedoch Kachexie und tödlicher Ausgang. Worin dieser Unterschied begründet ist, kann, da Versuche hierüber so gut wie ausgeschlossen sein dürften, nur vermutet werden. Ich messe dem Umstand, daß die Malaria in verschiedenen Malariagegenden auch von verschiedenen Mosquitoarten übertragen wird, großes Gewicht bei. Denn es ist wohl klar, daß dem Anopheles als Wirt ein ebenso wesentlicher Einfluß auf den Parasiten zukommen muß, wie ihn der menschliche Organismus auf diesen ausübt.

Nach alledem ist die Aussicht auf eine künstliche Immunisierung gegen Malaria sehr gering, und die bisherigen Versuche (z. B. Cellis) sind mißlungen. Gelänge es, in kurzer Zeit und ohne wesentliche Gefahr den Zustand der Toleranz, dessen sich ein großer Teil der farbigen Tropenbewohner erfreut, zu erzielen, so wäre für den Europäer, der nach den Tropen geht, vielleicht sogar auch für die Bevölkerung der Malarialänder in den gemäßigten Breiten schon viel gewonnen. Soviel mir bekannt, ist es noch nicht versucht worden, welche Wirkung die direkte Übertragung des Blutes eines gesunden Parasitenträgers aus tropischer Malariagegend bei Europäern hat: die Vermutung, daß diese Parasiten eine gewisse Abschwächung ihrer Virulenz erlitten haben, liegt nahe. Aus dem oben Entwickelten würde sich ferner der Versuch motivieren lassen, daß ein Europäer sich lange Zeit hindurch in den Tropen den Stichen infizierter Mosquitos aussetzt — allerdings ein etwas peinliches Experiment! — aber den Ausbruch der Infektion nach Ablauf der Inkubationszeit jedesmal durch Chinin unterbricht, was nach unseren Erfahrungen fast absolut sicher gelingt.

Die Chininprophylaxe in ihren verschiedenen Formen (Koch, Plehn Ziemann) erstrebt keine Immunität, sondern kupiert die Infektion innerhalb der Inkubationszeit.

Immunität bei Piroplasmosen.

Die Infektion mit Piroplasmen endet entweder tödlich oder mit dem Zustande der labilen Infektion. Das vollkommene Absterben der Parasiten im infizierten Organismus dauert Monate und Jahre lang. Innerhalb dieser Zeit können Störungen des Allgemeinbefindens der Tiere Anlaß zu erneutem Aufflammen der Infektion geben. Auch hier finden wir also den für die Protozoeninfektionen so charakteristischen rezidivierenden Verlauf wieder.

Immunisierung bei der Hämoglobinurie der Rinder.

Das Serum von Rindern, welche einen Anfall von Hämoglobinurie überstanden haben, kat keine passiv immunisierenden Eigenschaften; auch dann nicht, wenn solchen Tieren wiederholt große Mengen von piroplasmenhaltigem Blut einverleibt werden.

Eine aktive Immunisierung ist vielfach versucht worden auf Grund der Tatsache, daß das Überstehen eines Anfalles Immunität nicht bloß gegen eine künstliche Infektion durch piroplasmenhaltiges Blut, sondern auch gegen die natürliche Infektion durch den Stich infizierter Zecken verleihe. Diese Regel ist allerdings nicht ohne Ausnahme; deshalb werden auch nach der künstlichen Immunisierung, wenn die vorbehandelten Rinder auf infizierte Weiden gebracht wurden, Erkrankungen und Todesfälle beobachtet. Es hängt dies wahrscheinlich damit zusammen, daß die Parasiten von den Zecken in einem andern Stadium ihres Entwicklungsganges übertragen werden als bei der Impfung mit Blut, das die Birnformen der Piroplasmen enthält.

Ausgedehnte Erfahrungen sind z. B. in Queensland (Australien) gewonnen worden. Dort wurden ca. 35000 Stück Vieh mit je 5 ccm von sogen. „recovered blood“ von natürlich durchseuchten Rindern (oder Kälbern) geimpft. 3,6—4% der Rinder fielen infolge der Impfung (gegen 60—70% Mortalität ohne Vorbehandlung). Schütz hat beobachtet, daß das Blut erwachsener Rinder, die einen Anfall von Hämoglobinurie überstanden hatten, also „gesalzen“ waren, bei der Verimpfung auf empfindliche erwachsene Rinder sehr ungleich wirke; von 20 so behandelten Tieren erkrankten 8 an Hämoglobinurie, eines ging daran ein. Kälber dagegen erkranken nach solcher Impfung nur ganz leicht und ihr Blut liefert nach einiger Zeit einen ungefährlichen Impfstoff. Das pathologische Institut der tierärztlichen Hochschule in Berlin gibt solchen Impfstoff an Tierärzte ab. Die bisherigen Erfahrungen, die in der norddeutschen Tiefebene in enzootisch durchseuchten Bezirken gewonnen wurden, sind sehr günstige.

Die so erzeugte Immunität ist keine absolute, auch nimmt sie erfahrungsgemäß mit dem Alter ab. Zu berücksichtigen ist bei dieser und ähnlichen Methoden, daß die vorbehandelten Tiere Parasitenträger sind und damit den Zecken dauernd Gelegenheit geben, den Krankheitskeim aufzunehmen. Die Impfungen sollen, wenn möglich, in der kühlen Jahreszeit vorgenommen werden, die geimpften Tiere bedürfen sorgfältiger Pflege.

Lignières verwendet zu seinen Impfungen gegen „Tristeza“ in Argentinien „Kulturen“ der Piroplasmen im defibrinierten Blut kranker Rinder und schwächt sie auf eine noch nicht veröffentlichte Weise ab. Er macht 2—3 Impfungen mit Vaccin von steigender Virulenz; auch rechnet er hierbei mit der Existenz zweier verschiedener Typen der

Rinderpiroplasmose in Argentinien und gibt an, 60—80 % der Rinder durch seine Impfung zu retten, während die Immunisation mit recovered blood in seinen Händen schlechte Resultate gebe.

Immunisierung bei Küstenfieber (Rhodesia redwater) der Rinder.

Koch hat das „Rhodesia redwater" von dem Texasfieber („redwater") auf Grund des Parasitenbefundes und wesentlicher Verschiedenheiten in Ätiologie und Pathologie beider Krankheiten getrennt. Der Erreger, Piroplasma parvum Laveran, war von Koch schon 1897 beschrieben worden. Der von Theiler als Piroplasma mutans beschriebene Parasit hat damit nichts zu tun.

Die natürliche Infektion durch Zecken (nach Koch Rhipicephalus decoloratus und appendiculatus, nach Lounsbury und Theiler auch Rhipicephalus simus und capensis) endet in ca. 95 % der Fälle tödlich. Übersteht ein Rind die Krankheit, so ist es „gesalzen", beherbergt aber noch sehr lange die Piroplasmen im Blute. Doch kann man nach Theilers Angaben mit Zecken, die an solchen Rindern gesogen haben, die Krankheit nicht mehr übertragen. Die Tatsache, daß die Küstengebiete von Ostafrika mit Küstenfieber durchseucht sind, und trotzdem Vieh dort gedeiht, erklärt er so, daß dort die neugeborenen Kälber mit einer gewissen ererbten Unempfindlichkeit ausgerüstet sind, aber sobald sie erkranken, den Zecken das Infektionsmaterial liefern, das diese nun auf neueingeführte, empfängliche Rinder übertragen können. Eine solche angeborene partielle Immunität tritt noch nicht in der ersten Generation der Kälber ein, was auch Gray und Robertson beobachteten, sondern offenbar erst nach langer Durchseuchung der Bestände.

Rezidive (? Neuinfektionen bezw. Mischinfektionen mit Texasfieber) kommen nach Gray und Robertson vor, während Koch keine solchen sah.

Das Küstenfieber hat die merkwürdige Eigenschaft, daß man auch mit großen Mengen Blutes, das Parasiten in Menge enthält, die Krankheit nicht unmittelbar erzeugen kann. Erst wenn die Impfung wiederholt wird, so treten Parasiten im Blute des Impflings auf, und es folgt eine etwa 2tägige Temperatursteigerung. Einmalige Impfung erzeugt aber auch keine Immunität gegenüber der natürlichen Ansteckung auf der infizierten Weide, der sogenannten „Veldt"-Infektion. Wenn aber die Injektionen 3—4mal wiederholt und in steigenden Dosen (bis 2000 ccm) in etwa 14—21tägigen Zwischenräumen vorgenommen werden, so konnte Koch einen hohen Grad von Immunität erzeugen, den er dadurch prüfte, daß er die vorbehandelten Tiere auf eine infektiöse Weide bringen ließ. Solche wiederholte Impfungen mit großen Blutmengen sind aber in der Praxis nicht durchführbar, Koch empfahl deshalb mindestens 6 (bis zu 13) Injektionen mit je 10 ccm Blutes von einem durchseuchten Rind in 14tägigen Zwischenräumen zu machen. Die Immunität setzt erst nach Ablauf von etwa 8 Wochen ein und erreicht ihre volle Höhe in 4 bis 5 Monaten. Auf diese Weise gelang es, auf Weiden, auf denen noch kein Fall von Küstenfieber vorgekommen war, 3115 Rinder ohne Impfverlust zu behandeln, in infizierten Herden aber die Verluste auf 10,3 % herunter zu drücken. Diese von Koch empfohlene Methode rechnet natürlich damit, daß die geimpften Tiere Parasitenträger werden. Außerdem empfahl Koch die Besprengung der geimpften Tiere mit Flüssigkeiten, die die Zecken vernichten, die Einzäunung und zeitweise Dislokation der Herden. Theiler steht diesen Versuchen Kochs sehr skep-

tisch gegenüber und ein Bericht des chief veterinary surgeon von Pretoria 1905 sagt, daß die Versuche, die Methode Kochs auf ihren Wert zu prüfen, unbefriedigend ausgefallen seien und beruft sich auf Gray und Stockmann, bringt aber keine Beweise bei, die dieses Urteil rechtfertigen. Die von ihm selbst gemachten Vorschläge gründen sich auf die im Laufe der Epizootie gemachte Beobachtung, daß vorher infektiöse Weiden nach ca. 15 Monaten von empfänglichen Rindern ohne Schaden begangen werden können, und daß gesalzene Rinder nach eben dieser Zeit ohne Gefahr mit den frischen Herden zusammen auf die Weide gebracht werden dürfen.

Es scheint zur Erhaltung der Immunität wesentlich, daß die gesalzenen Rinder dauernd auf einer infizierten Weide bleiben, wo sie immer wieder durch infizierte Zecken gestochen werden können. Über die Dauer der erworbenen Immunität bzw. Toleranz ist noch nichts bekannt.

Wenn man Rinder durch wiederholte Injektion großer Mengen parasitenreichen Blutes immunisiert, so ist das Serum solcher Tiere auf normale Rinder ohne Wirkung (Koch). Spritzt man 50 ccm solchen Serums aber kranken Tieren ein, so vermindern sich die Parasiten wesentlich und können sogar gänzlich aus dem Blute verschwinden. Gleichzeitig aber wirkt das Serum auf die offenbar stark geschädigten Blutkörperchen so intensiv lösend, daß die Tiere kollabieren und unter den Erscheinungen von Ikterus und Hämoglobinurie zugrunde gehen. Aber auch dann, wenn kleinere Serumdosen zwar die Parasiten zum Verschwinden brachten, aber nicht isolysierend wirkten, gingen die Tiere trotzdem an Küstenfieber zugrunde. Während des Inkubationsstadiums angewandt, vermochte solches Serum einige der infizierten Tiere zu retten. Eine präventive Wirkung mehrerer Serumeinspritzungen äußerte sich darin, daß die auf der infizierten Weide erworbene Erkrankung in ca. 50 Proz. der Fälle mit Genesung endete. Auch Dshunkowsky und Luhs haben bei der von ihnen als „tropische" bezeichneten Piroplasmose der Rinder in Südrußland, die dem Küstenfieber jedenfalls sehr nahe steht, mit Immunserum keine positiven Impfresultate erzielt. Sehr störend wirkte bei Kochs Versuchen das häufige Vorhandensein einer labilen Infektion mit Texasfieber (Piroplasma bigeminum) bei den Versuchstieren, die durch die vorgenommenen Injektionen wieder manifest wurde und die Rinder tötete.

Seit Kochs grundlegenden Studien über das Küstenfieber sind keine weiteren Fortschritte in der Lehre über die Immunisierung gegen diese Krankheit veröffentlicht worden.

Immunisierung bei der Piroplasmose der Hunde.

Die Piroplasmose der Hunde stimmt in der Ätiologie und Pathologie in den meisten Punkten mit den Piroplasmosen der Rinder überein. Das Blut „gesalzener" Hunde bleibt sehr lange virulent, eine Abschwächung tritt nicht ein; die Virulenz kann durch Passagen gesteigert werden. Junge Hunde sind bedeutend empfindlicher als ältere. Es gibt verschieden virulente Stämme von Piroplasmen, die sich auch in ihrer immunisierenden Kraft unterscheiden: starke Reaktionen erzeugen eine kräftigere Immunität gegen Reinfektionen als schwache.

Das Blutserum gesalzener Hunde wirkt parasitizid und in größeren Dosen auch präventiv. Diese Eigenschaften lassen sich durch wiederholte Einspritzungen parasitenreichen Blutes noch wesentlich steigern, so daß Blut und Serum, zu gleichen Teilen gemischt, keine Erkrankung, aber auch keine Immunität erzeugen. Trotzdem aber kann man mit dem

Blute hochimmunisierter Tiere die Piroplasmose erzeugen; es existieren also in dem mit parasitiziden Stoffen ausgerüsteten Serum aktive, offenbar „serum-immune“ Piroplasmen. Die schützende Kraft des Serums hält etwa 24 Stunden nach der Einspritzung an; die Heilwirkung tritt bei größeren Dosen (20 ccm) noch nach 42 Stunden ein und verhindert zwar nicht das Auftreten von Parasiten, aber jede Krankheitserscheinung.

Kleine konstatierte eine angeborene, aber vorübergehende Immunität bei dem Wurf infizierter Hündinnen.

Die vorzüglichen Untersuchungen Nocards wurden von Theiler bestätigt.

Immunisierung gegen die Piroplasmose der Pferde und Esel.

Theiler hatte, solange er mit Pferden, die in Südafrika gezogen wurden, experimentierte, die „Malaria“ der Pferde nicht übertragen können. Erst als er frisch importierte argentinische Pferde verwendete, gelang die künstliche Infektion. Die geheilten Tiere sind „gesalzen“, ihr Blut ist aber noch infektiös. Maultiere sind sehr wenig empfindlich und ihr „recovered blood“ ist für Pferde sehr hochgradig, für Esel dagegen nur schwach virulent; das Blut von gesalzenen Eseln giebt bei Pferden starke, aber nicht tödliche Reaktion und könnte also zur Immunisierung eingeführter Pferde Verwendung finden; bei Maultieren ruft es nur leichte Erkrankung hervor und ist deshalb zur Immunisierung geeignet.

Immunisierung bei Piroplasmose der Schafe

ist bisher noch nicht versucht worden. Da aber eine Immunität nach Überstehen der in den Donauländern sehr häufigen Krankheit eintritt, so dürfte eine solche Möglichkeit wohl bestehen.

Immunität gegen Trypanosomen.

Immunisierung gegen Trypanosoma Lewisi.

Unter den grauen Ratten (Mus decumans und M. rattus) findet sich immer ein gewisser Prozentsatz mit Trypanosoma Lewisi infiziert (6–90 $^0/_0$); ob die nicht parasitenhaltigen Ratten immun sind, und ob sich mit dem Gesamtblut eines solchen Tieres noch Infektion erzielen läßt, ist noch nicht untersucht; jedenfalls halten sich die Trypanosomen monatelang im Blute wilder Ratten.

Dagegen geht die Infektion weißer und bunter Ratten fast stets in Heilung aus; aber auch hier fehlen Untersuchungen, ob nicht bloß eine Toleranz eintrat und das Trypanosoma in ganz geringer Zahl im Organismus weiter lebt.

Die Infektion mit Rattentrypanosomen ist deshalb interessant, weil in diesem Falle nachweisbare Mengen von Antikörpern sich im Blute bilden. Weiße oder bunte Ratten, aus deren peripherem Blute die Trypanosomen verschwunden waren, konnten entweder gar nicht mehr oder nur mit verschwindenden Ausnahmen durch eine zweite Injektion infiziert werden. Wiederholt man dann diese Einspritzungen, so gewinnt das Blutserum (nicht die Organextrakte) solcher Tiere die Eigenschaft, sowohl zu gleichen Teilen mit trypanosomenhaltigem Blute gemischt, als auch 24 Stunden vor und 24 Stunden nach der Trypanosomeneinspritzung einverleibt, die Infektion zu verhindern. Gegen die Trypanosomen selbst aber ist es in vitro wie im infizierten Tierkörper unwirksam. Es liegen also wahrscheinlich kompliziertere Verhältnisse vor, als bisher angenommen wurde.

Immunisierung bei Nagana.

Die natürliche Infektion mit Nagana durch den Stich von Tsetsefliegen endet bei den meisten Säugetieren tödlich; sehr widerstandsfähig sind Ziegen und Schafe. Unter Umständen kommt es aber auch bei sonst hochempfindlichen Tieren zu einer gewissen Toleranz, z. B. bei Pferden. Eine latente Infektion konnte Koch bei einem Rinde noch sechs Jahre nach der Einspritzung der Trypanosomen konstatieren.

Bei der experimentellen Übertragung kommt es hinsichtlich des Endresultats sehr auf die Provenienz des Stammes an. Am schönsten kommt dies in den Versuchen Martinis zum Ausdruck: sein Stamm „Togohengst“ tötete einen Hund in 24 Tagen, sein Stamm „Togostute“ von 6 Hunden nur einen innerhalb 102 Tagen. Bei einem mit diesem Stamme infizierten Pferde ließen sich ca. $1^1/_2$ Jahre nach der Injektion keine Parasiten auch in größeren Blutmengen mehr nachweisen, die Infektion war also erloschen.

Daß aber die Toleranz eines Pferdes gegen einen Tsetsestamm nicht gleichbedeutend ist mit Avirulenz dieses Stammes bei anderen Tieren, konnte ich in einem Falle in Togo beobachten. Ja selbst der Zustand der Toleranz gegen einen Stamm bedingt nicht Toleranz gegen einen anderen, virulenteren Stamm: die Togostute Martinis ging infolge der Impfung mit dem Stamm Togohengst zugrunde.

Dieser avirulente Stamm „Togostute“ konnte nun durch Hundepassagen so sehr in seiner Virulenz gesteigert werden, daß er nach 6 bezw. 22 Hundepassagen die schon einmal mit dem Blute von der Togostute geimpften Hunde tötete. Andererseits aber war Martini auch imstande, den ursprünglichen hochvirulenten Stamm „Togohengst“ durch fortgesetzte Passagen durch weiße Mäuse so sehr abzuschwächen, daß Esel 9—13 Monate und länger der Infektion mit solchem Material widerstanden.

Dieser am meisten aussichtsvolle Weg, hochempfindliche Tiere (Pferde, Esel) gegen Tsetsekrankheit vorzubehandeln, ist mit Erfolg von Koch, Verfasser, Martini und Nocard zum Zweck der Immunisierung von Rindern beschritten worden. Die Rinder erkranken nach der natürlichen Infektion in ausgesprochen chronischer Weise; ein Ausheilen der natürlichen Infektion ist bisher noch nicht beobachtet, wohl aber der künstlich erzeugten Erkrankung. Wiederholte Impfungen mit für Rinder hochvirulentem Blute wurden von den von Koch*) vorbehandelten Rindern (Passagen: Rind — Ratte — Hund — Rind) ohne Schaden ertragen. Martinis Versuchstiere reagierten mehrmals auf Impfung beträchtlicher Blutmengen mit Fieber und positivem Parasitenbefund.

Versuche an Rindern in Togo 1904—1907 haben ergeben, daß in Tsetsegebieten Infektionen durch den Stich der Glossinen vorkommen, welche sich in bezug auf den Verlauf ganz verschieden verhalten (s. o.).

*) Koch hat mit Recht betont, daß durch ein Verfahren, das nur eine Toleranz gegen Nagana zum Endziele hat, Parasitenträger geschaffen werden, die dann den blutsaugenden Insekten neues Infektionsmaterial liefern können. Diesem an sich richtigen Einwand ist entgegenzuhalten, daß bei Versuchen des Verfs. manchmal mit 2 ccm Blut eine Infektion von Ratten oder Hunden nicht gelang und erst etwa 10—20 ccm hierzu notwendig waren. Eine Tsetsefliege saugt aber nur Bruchteile eines Kubikzentimeters. Ferner kommen die für afrikanische Verhältnisse vorzubehandelnden Transporttiere an Zahl nicht in Betracht gegenüber den zahlreichen Parasitenträgern des „Buschs“, Antilopen u. a. Wenn eben alle Nutztiere nach solchem Verfahren vorbehandelt werden, so ist die Gefahr vorüber.

Während einerseits Rinder, welche auf der Hauptstraße Sokodé-Anecho verschiedene „Tsetsegürtel" passiert hatten, erst nach mehreren Monaten der Nagana zum Opfer fielen, verendeten eine Anzahl Rinder, die von der Küste nach der Zollstation Tokpli gebracht wurden, schon innerhalb 12—53 Tagen. Dementsprechend waren auch die Schutzwirkung einer Vorbehandlung mit einem Trypanosomenstamm, der durch 14—17 Hundepassagen in seiner Virulenz abgeschwächt war: von den vorbehandelten Rindern, die auf dem erstgenannten Wege die Küste erreicht hatten, waren 52% (an Nagana?) eingegangen, jene dagegen, welche nach Tokpli gebracht worden waren, sind, gleich den Kontrollen, sämtlich an Trypanosomiasis zugrunde gegangen.

Mit diesen Feststellungen ist die Frage nach einer Immunisierungsmethode, die allen möglichen Anforderungen der Praxis genügen würde, wieder in weitere Ferne gerückt.

Das Blutserum von einzelnen Rindern, die vom Verf. mit Nagana vorbehandelt waren, tötete, obwohl es noch Parasiten enthielt, eingebrachte Trypanosomen nach einiger Zeit ab (in ausgesprochenen Fällen in 20—30 Minuten), nachdem sie vorher zu großen Klumpen agglomeriert worden waren. Weshalb diese Eigenschaft des Serums nur bei einzelnen Tieren auftrat, konnte nicht ermittelt werden. Solches Serum wirkte weder heilend noch schützend.

Dagegen hat Martini im Blute von 2 Kälbern und 3 Eseln nach Impfung mit Nagana Antikörper auftreten sehen, welche Mäuse und Hunde gegen die Folgen einer gleichzeitigen oder nach 24 Stunden folgenden Impfung mit Naganaparasiten schützten (Dosis: 0,5 ccm Serum). Es ist zu bemerken, daß die Antikörper sich bei Tieren entwickelten, die auf die Einverleibung von Naganaparasiten nur wenig reagiert hatten, und daß sie am wirksamsten waren gegenüber Parasiten, die schon in einer Reihe von Passagen in der gleichen Tierart, wie die zur Serumprüfung verwendet wurde, weiter gezüchtet worden waren (Mäuse bezw. Hunde)*).

Diesing stellte durch Kontrollimpfungen fest, daß die Esel aus Adamaua (Hinterland von Kamerun) eine aktive Immunität gegen Nagana erwerben können. Das Serum solcher Esel verminderte, in Dosen von 50 ccm eingespritzt, die Zahl der Parasiten im Blute eines naganakranken Pferdes. Diesing unternahm es nun, Rinder mit solchem Serum passiv zu immunisieren, um sie durch den Tsetsegürtel des Urwaldes von Kamerun durchzubringen. Die Versuche fielen günstig aus, indem 10 Kontrolltiere eingingen, und von 18 Rindern sich nachträglich nur 2 infiziert erwiesen (Kontrolle nur nach dem mikroskopischen Blutbefund?). Weitere Nachrichten über diesen Versuch fehlen vorläufig.

Der Nachweis einer Eselrasse, die wirklich aktiv immunisierbar wäre, könnte für Afrika von großer Bedeutung werden.

Das Blutserum des Menschen, der gegen Nagana immun ist, verhindert, mit Naganablut im Verhältnis von 4:1 gemischt die Infektion; aber solche Tiere sind nicht immun, da das Serum parasitizid wirkt. Bei Nagana-infizierten Mäusen und Ratten verschwinden nach Injektion

---

*) Laveran u. Mesnil haben mit Ziegen experimentiert; ihre Schlußfolgerungen können aber nicht als einwandfrei gelten, da Ziegen gegen gewisse Stämme ungleich empfindlich sind und da Laveran u. Mesnils Impfmaterial nicht von spontan infizierten Tieren herrührte, sondern bereits durch zahlreiche Tierpassagen modifiziert war und endlich deshalb, weil die zur Prüfung der Heilung entnommene Menge Blutes (3 ccm) zu gering ist.

von 0,1—2 ccm menschlichen Blutserums die Trypanosomen vorübergehend aus dem Blute, und man kann durch wiederholte Serumeinspritzungen das Leben der Tiere wesentlich verlängern. Heilungen sind Laveran und Mesnil nur in 4 Fällen nach 1—2 Injektionen gelungen. Für größere Tiere ist diese Methode natürlich nicht verwendbar.

Die Versuche von Brauer basieren auf so mangelhafter experimenteller Grundlage, daß aus ihnen nur die eine Notiz hier erwähnt zu werden braucht, daß gewisse Jägerstämme am Ruahafluß (und die Barotseneger in Westafrika, wie Gleim mitteilte) ihre tragenden Hündinnen der Tsetseinfektion absichtlich aussetzen, und daß dann der Wurf solcher (kranker oder immuner?) Hündinnen immun sei.

Immunität gegen Surra.

Während Pferde an Surra so gut wie sicher zugrunde gehen, war die künstliche Übertragung bei Rindern niemals tödlich, wenn auch die Tiere fieberten und hochgradig abmagerten. Büffel sind wesentlich empfindlicher und fallen der Krankheit zum Opfer. Während der Epizootie auf Mauritius wurde unter den Rindern eine Mortalität von 25—30 Proz. beobachtet.

Über erfolgreiche Immunisierungsversuche ist bei Surra nichts bekannt geworden.

Mal de Caderas.

Bei Pferden verläuft die Krankheit stets tödlich; ebenso bei den gewöhnlichen Laboratoriumstieren. Schwein, Schaf, Ziege und Rind erkranken und ihr Blut bleibt Monate lang infektiös, aber die Krankheit endet in Heilung und die Trypanosomen sind auch in größeren Blutmengen (z. B. 8 ccm) nicht mehr nachweisbar.

Bei einigen dieser Tiere konnten Laveran und Mesnil eine praeventive Eigenschaft des Blutserums konstatieren, wenn man es in Dosen von 0,5—2 ccm mit virulentem Blute mischte. Doch verschwand die Schutzkraft des Serums mit dem Abklingen der Infektion wieder gänzlich. Voges gelang es bei einem Rinde nicht, diese Serumwirkung durch viele Impfungen so sehr zu steigern, daß das Serum als Heilmittel verwertbar gewesen wäre.

Die Wirkung des menschlichen Serums ist ähnlich der bei Nagana (s. o.)

Das Trypanrot Ehrlichs und Shigas bewirkt, in 1prozentiger Lösung in Dosen von 0,3 ccm infizierten Mäusen eingespritzt, ein plötzliches Verschwinden der Trypanosomen aus dem Blute und in vielen Fällen Heilung, während in anderen Rückfälle mit verzögertem tödlichen Ausgang eintreten. Bemerkenswert ist, daß die so behandelten Tiere eine deutliche Widerstandskraft gegenüber einer erneuten Infektion besitzen: die Inkubationszeit kann sich alsdann bis auf 60 Tage verlängern. Da das Trypanrot nur im Tierkörper, nicht aber im Reagenzglase die Trypanosomen löst, so muß man annehmen, daß das Trypanrot nur den Reiz darstellt, der parasitizide Körper im Organismus zur Entwicklung bringt.

Es ist dies das erste Beispiel, daß ein parasitizid wirkendes Medikament auch gleichzeitig zur Bildung spezifischer Schutzstoffe anregt, und die weitere Verfolgung dieses Problems wäre von hohem Interesse.

Dourine.

Nach den Untersuchungen von ROUGET einerseits, NOCARD, BUFFARD und SCHNEIDER andererseits zeigen einzelne Stämme des Trypanosoma equiperdum der Dourine eine wesentlich verschiedene Tierpathogenität, namentlich für Mäuse und Meerschweinchen. Die Wiederkäuer sind sämtlich refraktär.

NOCARD sah bei einigen Hunden nach schwerer Krankheit Heilung eintreten. Diese Tiere hatten eine dauernde Immunität erworben.

Versuche mit Blutserum, z. B. jener immunen Hunde NOCARDS, scheinen nicht angestellt worden zu sein.

Immunität bei der Galziekte der Rinder.

THEILER, nach dem der Erreger dieser Krankheit von LAVERAN „Trypanosoma Theileri“ benannt wurde, hat bei 40 Rindern 5 Todesfälle gesehen; die übrigen Rinder erwiesen sich als immun. Über eine Immunisierung ist nichts bekannt.

Immunität bei der Trypanosomose des Menschen (Schlafkrankheit).

Während das Trypanosoma gambiense, der Erreger der Schlafkrankheit, auf die meisten Säugetiere übertragen werden kann, sind die Affen des Genus Cynocephalus bisher stets als refraktär befunden worden. Auch bei Macacus und Cercopithecus kommen Heilungen vor, die aber nicht immer Immunität verleihen (Toleranz?). LAVERAN und MESNIL versprechen sich wenig von einer Serumtherapie, die aber noch nicht versucht wurde.

Die oft jahrelange Latenzperiode der Schlafkrankheit beim Menschen, während deren nur der Trypanosomenbefund im Blut und im aspirierten Saft der vergrößerten Lymphdrüsen die Diagnose rechtfertigt, ist sehr charakteristisch für diese Erkrankung. Bei ausgesprochenen Symptomen des Trypanosomenfiebers und der Schlafkrankheit sind bisher Heilungen noch nicht beobachtet worden.

Bemerkenswert ist, daß die Schlafkrankheit an verschiedenen Orten eine ganz ungleiche Tendenz zur epidemischen Verbreitung zeigt: in Togo z. B. kommen dauernd vereinzelte Fälle vor, ohne daß die Krankheit solch furchtbare Verbreitung findet, wie sie jetzt Uganda und das Hinterland des Kongostaates entvölkert. —

Bei den übrigen Krankheiten, deren Erreger Trypanosomen sind, liegen keine weiteren Mitteilungen über Immunität und Wirkung von Immunserum vor.

Die Amöben-Dysenterie ist eine exquisit chronische Krankheit; bei Rückfällen findet sich noch lange Zeit nach der Infektion die Amöba histolytica in den Fäces. KARTULIS ist geneigt, den Umstand, daß von Dysenterie dauernd Geheilte nicht wieder daran zu erkranken pflegen, als aktive Immunität aufzufassen. Doch bemerkt er selbst, daß die Latenz zwischen den Rückfällen, während der die Amöben wahrscheinlich im Wurmfortsatz sich halten, sehr lange dauern kann. Dysenteriekranke pflegen ferner gelernt zu haben, in bezug auf ihre Diät, nament-

lich auf das Trinkwasser sehr vorsichtig zu sein, so daß die Chancen zu Neuinfektionen sehr geringe sind. Die Verhältnisse liegen, wie Kartulis sagt, noch sehr im Dunklen; es könne sich ja auch nur um eine lokale Immunität des Dickdarms handeln.

Die Coccidiose des Rindes (rote Ruhr) hinterläßt offenbar keine Immunität, da nach Schneidemühl Rezidive nicht selten sind.

Literatur.

Brauer, Über eine Methode zur Aufzucht surrafester Tiere. Berl. tierärztl. Wochenschrift 1904. (Entgegnung Schmidts hierauf: ebenda 1904.)

Diesing, Ein Immunisierungs-Versuch gegen die Tsetsekrankheit der Rinder in Kamerun. Arch. für Schiffs- u. Tropenhygiene 1905, Bd. IX.

Gray and Robertson, Veterinary Journal 1904, Vol. VII.

Koch, Vier Berichte über Küstenfieber. Archiv für wissensch. und prakt. Tierheilkunde 1904, Bd. XXX.

Kossel, Die Hämoglobinurie der Rinder (mit Literatur) in Kolle-Wassermanns Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd. I.

Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiases (mit Literatur). Paris 1904. Masson et Co.

Lignières, Les maladies tropicales des animaux domestiques. Vortrag auf dem achten tierärztlichen Kongreß in Budapest 1905. In: Receuil de méd. vétér. 1905.

Martini, Untersuchungen über die Tsetsekrankheit. Zeitschr. für Hygiene 1905, Bd. L.

Nocard et Leclainche, Les maladies microbiennes des animaux, Paris, Tome II. Masson et Co.

Nocht und Mayer, Trypanosomen in Kolle-Wassermanns Handbuch, Ergänzungsband. Heft 1.

Plehn, A., Weiteres über Malaria-Immunität. Jena 1901.

Ders., Die Malaria der afrikanischen Negerbevölkerung. Jena 1902.

Ders., Über Malaria-Immunität. Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1906, Bd. X, pag. 37.

Ruge, Malariakrankheiten (mit reichem Literaturverzeichnis). Jena 1906. Fischer.

Schilling, Versuche zur Immunisierung gegen Tsetsekrankheit. Zeitsckr. f. Hyg. 1906, Bd. LII.

Ders., Piroplasmosen (mit Literatur) in Kolle-Wassermanns Handbuch, Ergänzungsband.

Ders., Versuche zur Immunisierung von Rindern gegen Tsetsekrankheit in Togo. Deutsches Kolonialblatt 1907, 15. November.

Schütz, Die Hämoglobinurie der Rinder und das Impfverfahren gegen die Krankheit. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1904.

Ders., Über die Pyrosomenkrankheit der Rinder. Arch. für wissensch. und prakt. Tierheilkunde 1905.

Theiler, Über Küstenfieber. Journal of comparat. Pathology. Vol. XVII.

Ders., Tierseuchenbekämpfung in Transvaal. Deutsche tierärztliche Wochenschrift, 14. Jahrgang, Nr. 46, 48 und 50.

Report of the chief veterinary surgeon (Pretoria?): Eradication of African coast fever. Veterinary journal 1905.

Darstellung und Verwendung von Bakterienpräparaten zu diagnostischen Zwecken.

XXXIV.

Tuberkulin zu diagnostischen Zwecken beim Menschen.

Von

Dr. med. E. Löwenstein,

Beelitz-Heilstätten bei Berlin.

Die Anwendung des Tuberkulins zu diagnostischen Zwecken fußt auf der Entdeckung von Robert Koch, daß sich tuberkulöse Meerschweinchen gegenüber einer zweiten Infektion mit Tuberkelbazillen anders verhalten als gesunde Meerschweinchen. Robert Koch ging dabei von der Beobachtung aus, „daß abgetötete Reinkulturen von Tuberkelbazillen, nachdem sie verrieben und in Wasser aufgeschwemmt sind, bei gesunden Meerschweinchen in großer Menge unter die Haut gespritzt werden können, ohne daß etwas anderes als eine lokale Eiterung entsteht. Tuberkulöse Meerschweinchen werden dagegen schon durch die Injektion von sehr geringen Mengen solcher aufgeschwemmter Kulturen getötet und zwar je nach der angewandten Dosis im Verlaufe von 6—48 Stunden. Eine Dosis, welche eben nicht mehr ausreicht, das Tier zu töten, kann eine ausgedehnte Nekrose der Haut im Bereiche der Injektionsstelle bewirken“.

Die ersten Wiederholungen dieser Versuche ergaben kein übereinstimmendes Resultat, da man das zeitliche Moment, das Koch besonders hervorgehoben, gänzlich außer acht gelassen hatte. Erst nach fast 10 Jahren berichteten Arloing[18]) Deutsch[198]) und Bail[43]) in einer großen Reihe von Arbeiten, denen diese Entdeckung Kochs zugrunde lag, übereinstimmend dieselben Versuchsresultate.

Wir verdanken also Robert Koch auch die Entdeckung, daß ein Organismus, der schon mit Tuberkulose infiziert ist, sich viel empfindlicher gegenüber einer Reinfektion erweist, als ein gesunder.

Dafür, daß der tuberkulöse Mensch viel leichter auf Tuberkulin reagiert als der gesunde, erbrachte der im Auftrage des preußischen Ministeriums erstattete Bericht von Prof. Guttstadt[328]) genügende Be-

weise, denn in der kurzen Zeit von zwei Monaten konnte über ein außerordentlich wertvolles Material von 1070 diagnostisch injizierten Fällen berichtet werden. Während sich die Internisten in der Mehrzahl sehr zurückhaltend äußerten, haben Forscher, die ihre Beobachtungen an Fällen äußerer Tuberkulose machten, sich begeistert dafür ausgesprochen, „daß das Kochsche Mittel sehr wertvoll für die Unterscheidung einer tuberkulösen Krankheit ist". (v. Bergmann[90]). Noch entschiedener nahmen Mikulicz[600]), Neisser[634]), Bardeleben[972]), Helferich[347]), Esmarch[237]) Partei, nur König und Hildebrand[467]) veranschlagen den diagnostischen Wert nicht hoch. Erst im Jahre 1899 gelangte wieder ein derart reichhaltiges Material zur Veröffentlichung durch Beck[81]), der die Protokolle des Kochschen Institutes über die Jahre 1892—1899 publizierte. Unter den 2137 diagnostisch injizierten Patienten befanden sich 388, welche auf Grund der klinischen Untersuchung der Phthise verdächtig waren; diese reagierten in 85% der Fälle, die anderen 1749 Patienten waren als nicht tuberkulös angesehen worden, sie boten in 45% eine positive Reaktion.

Ganz besonders wertvoll sind jene Angaben in der Literatur, in denen die durch Tuberkulin erhaltenen Resultate durch die Obduktion kontrolliert wurden. Freilich kann das hier zu Gebote stehende Material nicht an wissenschaftlicher Brauchbarkeit mit dem Material der Veterinärmedizin verglichen werden, denn so günstige Bedingungen, daß auf die Tuberkulinjektion bald die Schlachtung und Autopsie erfolgt, sind beim Menschen nicht möglich. Immerhin existieren einige Arbeiten mit derartigen Beobachtungen, die noch dadurch an Wert gewinnen, daß sie in der überwiegenden Mehrheit an Kindern erhoben sind. So berichtet Mettetal[604]) aus Combys Klinik über 60 Kinder unter einem Jahre, welche mit Tuberkulin diagnostisch injiziert worden waren. In 18 Fällen war eine Autopsie möglich, welche durchaus die Resultate der Tuberkulinimpfung bestätigte; 12 Fälle, welche positiv reagiert hatten, erwiesen sich bei der Sektion tuberkulös, sechs Fälle, welche nicht reagiert hatten, tuberkulosefrei. Binswanger[105]) kam in einer sehr eingehenden Studie über den Wert der diagnostischen Tuberkulininjektion zu folgendem Urteil: „das summarische Resultat sämtlicher Injektionen zeigt unter 261 injizierten Kindern 35 positiv reagierende. Unter den injizierten Patienten kamen 42 im Säuglingsheim (Dresden) zur Obduktion. Von diesen 42 hatten intra vitam 16 positive Reaktion gezeigt, während 26 nicht reagiert hatten. Bei der Obduktion erwiesen sich sämtliche 16 positiv reagierende als tuberkulös, während unter den 26 intra vitam nicht reagierenden Kindern 25 sich als tuberkulosefrei, eines dagegen sich als tuberkulös erwies." Dieser eine Fall fand seine einfache Erklärung; in dem Alter von fünf Wochen wurde die Injektion vorgenommen, im Alter von 12 Wochen starb es an einer katarrhalischen Pneumonie; aus den übrigen Versuchsprotokollen Binswangers ging nämlich hervor, daß der jüngste Fall einer sicheren Tuberkulose mit positiver Reaktion bereits acht Wochen alt war, andererseits hat Wassermann (cit. nach Binswanger) darauf hingewiesen, wie rasch sich mitunter große Tuberkelherde im kindlichen Organismus entwickeln können.

Bei Erwachsenen existieren meines Wissens leider nicht so ausgedehnte, wertvolle Untersuchungen. Mikulicz[602]) kontrollierte bei 26 Patienten den Erfolg der diagnostischen Tuberkulininjektion. „Von 26 Fällen wurden 16 als sicher nicht tuberkulös erkrankt entweder durch die Operation resp. die mikroskopische Untersuchung exzidierter Gewebs-

stücke, durch die Beobachtung des weiteren Verlaufes oder endlich durch die Autopsie bezeichnet, während sich die 10 anderen Fälle als zweifellos tuberkulös erkrankt erwiesen, oder wenigstens die Erkrankung an Tuberkulose im höchsten Grade wahrscheinlich war. In keinem der ersten 16 Fälle trat auf eine Dosis von 1—10 mg eine allgemeine oder lokale Reaktion auf, dagegen zeigten die 10 folgenden Fälle die typische Reaktion.“ Ein völlig einwandfreies Material wurde von France[1042]) erbracht. Dieser Autor injizierte 55 Geisteskranke diagnostisch mit dem Erfolge, daß 45 davon reagierten. Davon erwiesen sich 29 bei der Obduktion als tuberkulös; von den 10 Patienten, die nicht reagiert hatten, kamen fünf zur Obduktion; keiner von diesen war tuberkulös. Von klinischer Seite wurde das Tuberkulin von Fränkel[267]) und Hammer[339]) einer erneuten Prüfung unterzogen. Fränkel macht folgende Angaben: Von den 200 Patienten reagierten in Summa mit Temperaturerhöhung 167 = 83,5 %, negativ war das Impfergebnis bei 33 = 16,5 %. Zu den reagierenden gehörten sämtliche wahrscheinlichen Phthisen[56]). Von den 76 suspekten zeigten 60 = 92,1 %, von den unverdächtigen 37 = 56,1 %, die charakteristische Temperatursteigerung.“

Dank der unermüdlichen Arbeit treuer Tuberkulinanhänger wie in erster Linie Petruschky[696, 697]), Möller[607]), Kremser[492]), Bandelier[48]), Götsch[305]) hat die Anwendung des Tuberkulin zu diagnostischen Zwecken wieder eine größere Verbreitung gewonnen. Besonders in der Praxis der Tuberkuloseheilstätten fand die diagnostische Tuberkulinimpfung immer mehr Anerkennung. Wie aus den Veröffentlichungen von Bandelier[55]), Löwenstein und Rappoport[551]), Kremser[492]) hervorgeht, ist ein erdrückendes Material erbracht, das die Einwände von Köhler[461]), Smith, Mathes[584]), Schrader[819]) über die Brauchbarkeit der Reaktion als unbegründet erscheinen läßt.

Das Tuberkulin als Gift.

Es ist von vornherein naheliegend, das Tuberkulin nicht als ein einheitlich gebautes Gift zu betrachten, denn noch viel mehr als beim Diphtheriegift drängt sich hier der Gedanke auf, daß das Tuberkulin aus mehreren Komponenten besteht, zum mindesten aus zweien (wenn man die Spezifität als Einteilungsgrund wählt), einen spezifischen Anteil, der von den Bazillen der Tuberkulose stammt, und einem nicht spezifischen Anteil, der bei der Herstellung des Tuberkulins, über die an anderer Stelle berichtet wird, nicht zu umgehen ist. Daß die Albumosen und Peptone der Bouillon Fieber erzeugen können, wurde von Matthes[583, 584]), in einer Reihe von Arbeiten angegeben; dieser Autor ging soweit, die Tuberkulinreaktion als eine „Albumosenreaktion“ anzusehen. Diese Ansicht wurde aber angesichts der großen Dosen von Deuteroalbumosen, welche zur Hervorrufung einer Reaktion bei Lupösen notwendig waren, von Zupnick[970]) als irrig erwiesen. Auch Kasparek[432]) (cit. nach Zupnick) hatte schon darauf aufmerksam gemacht, daß der Verlauf einer Albumosenreaktion sich von dem einer Tuberkulinreaktion wesentlich unterscheide. Kurz nach der Publikation Kochs hatte Hueppe[381]) bereits den Verdacht ausgesprochen, daß das Fieber erregende Moment im Tuberkulin keine spezifische Eigenschaft der Tuberkelbazillen sei, sondern daß Proteine der verschiedensten Herkunft bei tuberkulösen Tieren ebenfalls eine Tuberkulinreaktion hervorrufen könnten, eine Annahme, die auch Buchner[133]), Römer[756]) und Klemperer[442]) teilten. Hier sei

auch die Angabe Liebreichs erwähnt über die Wirkung der cantharidinsauren Salze, welche mit der Wirkung des Tuberkulins große Ähnlichkeit besitzen soll.

Wirkung auf den gesunden Menschen.

Die Wirkung auf den gesunden Menschen hat Koch an sich selbst geschildert: „Die Symptome, welche nach der Injektion von 250 mg beim Menschen entstehen, habe ich an mir selbst nach einer am Oberarme ausgeführten Injektion erfahren; sie waren in Kürze folgende: Drei bis vier Stunden nach der Injektion Ziehen in den Gliedern, Mattigkeit, Neigung zum Husten, Atembeschwerden, welche sich schnell steigerten; in der fünften Stunde trat ein ungewöhnlich heftiger Schüttelfrost ein, welcher fast eine Stunde andauerte; zugleich Übelkeit, Erbrechen, Ansteigen der Körpertemperatur bis zu 39°; nach etwa 12 Stunden ließen sämtliche Beschwerden nach, die Temperatur sank und erreichte bis zum nächsten Tage wieder die normale Höhe; Schwere in den Gliedern und Mattigkeit hielten noch einige Tage an; ebensolange Zeit blieb die Injektionsstelle ein wenig schmerzhaft und gerötet."

Diese außerordentlich schweren Erscheinungen erklären sich durch die große Tuberkulindosis, welche plötzlich den unvorbereiteten Körper getroffen hat.

Alle Beobachter, welche diagnostische Injektionen an gesunden Menschen gemacht haben, betonen ausdrücklich, daß sie niemals eine Schädlichkeit für den Patienten erwachsen sahen. So berichtet Schreiber[1156]) im Supplementband des klinischen Jahrbuches 1891 über 40 Säuglinge, die er zur Entscheidung der Frage der direkten Keimübertragung diagnostisch mit Tuberkulin injiziert hatte. Er erhielt das überraschende Resultat, daß man bei ihnen mit 0,001—0,005 selbst mit 0,01 (1 cg) beginnen, in raschem Tempo um 1—2 cg steigen und so mit der dritten bis vierten Spritze 5 cg injizieren konnte, ohne daß selbst nach einer so großen einmaligen Dosis auch nur eine Andeutung einer Reaktion erfolgte.

„Neugeborene verhalten sich demnach gegenüber dem Kochschen Mittel, wahrscheinlich infolge ihres lebhaften Stoffwechsels, ganz anders als ältere Kinder und Erwachsene*)."

Diese Angaben Schreibers wurden 1900 von Behrends[84]) im vollen Umfange bestätigt. Von sämtlichen 96 Säuglingen der ersten und zweiten Lebenswoche reagierte nicht ein einziger, trotzdem bis auf 10 mg gestiegen worden war. Welcher große Unterschied zwischen dem Verhalten der Säuglinge und älteren Kindern und Erwachsenen besteht, erhellt aus den Untersuchungen des österreichischen Stabsarztes Franz[276]) Unter 400 anscheinend gesunden Soldaten des ersten Dienstjahres boten 61 % eine positive Reaktion, obwohl die höchsten in Verwendung gezogenen Dosen nur 3 mg und in wenigen Fällen 5 mg betrugen. Später wiederholte er den Versuch an einem Regiment, das nicht aus einem derartig Tuberkulose durchseuchten Bezirke stammte, und fand 38 % positive Reaktionen (zitiert nach Binswanger).

Diese Zahl stimmt auch mit dem von Binswanger[104]) an 76 gesunden Ammen ermittelten Prozentsatz ungefähr überein, nämlich 33 % der stillenden Ammen wurden durch die positive Reaktion als tuberkulös bezeichnet.

*) Siehe v. Pirquet.

Die Erklärung für diese Erscheinung dürfte vielleicht in zwei Momenten zu suchen sein. Vor allem sind unter den Säuglingen schon nach den Untersuchungen von Nägeli[625], Harbitz[1061]) wirklich nur sehr wenige, welche tuberkulös infiziert sind — sei es intrauterin, wie es durch die Untersuchungen von Schmorl und Geipel[809]) als ein nicht seltener Vorgang wahrscheinlich gemacht worden ist, sei es in der kurzen Zeit ihres extrauterinen Lebens durch Inhalation oder Digestion. Zweitens genügt es nicht zur Erzeugung einer positiven Reaktion, daß der betreffende Organismus mit Tuberkulose infiziert ist, sondern es muß eine gewisse Zeit verstrichen sein zwischen dem Moment der Infektion und der probatorischen Impfung. Es genügt nicht etwa die bloße Anwesenheit von Tuberkelbazillen, wie Marmorek[580]), Preisich[725]) und Heim[346]) anzunehmen scheinen, sondern der „sensibilisierende Reiz" muß längere Zeit zurückliegen.

Darauf hat Koch in seinen ersten Mitteilungen schon ein besonderes Gewicht gelegt, die von Zupnick[970]), Löwenstein und Rappaport[551]), Bail[46]) und Deutsch[198]) durch entsprechende Meerschweinchenversuche noch ergänzt wurden. Als mindeste Frist bei Meerschweinchen wird von den obigen Autoren 12—14 Tage angegeben.

Wie lange die Zeit beim Menschen ist, darüber läßt sich wohl kaum eine Vermutung aussprechen, da wir die Momente, welche die Umstimmung des Organismus bewirken, nicht kennen. Hier wird jedenfalls dem Infektionsmodus eine ganz besondere Bedeutung zukommen.

Jedenfalls geht aus den Protokollen von Mettetal[604]) und Binswanger[105]), Schreiber[822]), Behrends[84]) hervor, daß in keinem einzigen Falle eine Reaktion der Säuglinge unter 8 Wochen zur Beobachtung kam. Diese Zeit muß also als mindeste Inkubationsdauer derjenigen Veränderungen im Säuglingsorganismus aufgefaßt werden, welche für das Zustandekommen der Tuberkulinreaktion Voraussetzung sind.

Die Art der Einverleibung.

Die Art der Einverleibung des Tuberkulins ist gewiß nicht gleichgültig; man hat versucht das Tuberkulin per os zu verabreichen, subkutan und intravenös zu injizieren — schließlich auch perkutan (Spengler[872])) durch Einreiben in die Haut in den Körper zu bringen.

Koch selbst hat wiederholt geäußert, daß die spezifische Substanz im Tuberkulin durch die Pepsinwirkung des Magensaftes zerstört werde. In der letzten Zeit hat diese Methode, für die besonders Freymuth[283]) eingetreten ist, dadurch an Interesse gewonnen, daß Calmette und Breton[152]) Versuche an Meerschweinchen veröffentlichten, welche eine Wirksamkeit des Tuberkulins per os vermuten ließen. Diese Autoren schrieben dem per os verabreichten Tuberkulin eine hohe Giftwirkung für gesunde Tiere zu, ganz besonders empfindlich erwiesen sich junge Meerschweinchen. Bei der Autopsie ergibt sich bloß eine fettige Entartung der Leber, subseröse und intestinale Blutungen.

Bei tuberkulösen Meerschweinchen sahen diese Autoren auch bei dieser Applikation eine typische Reaktion auftreten. Auch sollen kranke Tiere schon auf Dosen reagieren, bei denen gesunde Tiere nicht reagieren; kurz, Calmette und Breton halten dafür, daß die Applikation per os der subkutanen völlig gleichwertig sei, eine Ansicht, die mit in derselben Arbeit niedergelegten Beobachtungen dieser Autoren nicht übereinstimmt. Denn ganz besonders haben Calmette und Breton hervorgehoben, daß

eine Immunisierung per os nicht möglich ist. Versuche am Menschen hat Freymuth[283]) angestellt und diese Methode zum allgemeinen Gebrauche empfohlen.

Verfasser hat, um die Angaben der obigen Autoren zu prüfen, folgende Versuche gemacht. Zwei gesunde Herren, J. Sp. und Dr. L., sowie drei offene Tuberkulosen, Dr. B., Dr. Z., Herr Sch. nahmen 100 mg Alt-Tuberkulin in ungefähr 100 ccm Bouillon zu sich; nur Dr. L. hatte sich früher zweimal 10 mg Alt-Tuberkulin injiziert, sämtliche andere Herren waren nie spezifisch behandelt worden; trotzdem trat bei keiner einzigen Versuchsperson auch nur das geringste Zeichen einer Reaktion auf; bei keinem erhob sich die Temperatur über 36,9. Nach 14 Tagen wurde die diagnostische Impfung vorgenommen; der erste Fall offener Tuberkulose reagierte bereits auf die erste Injektion von $^2/_{10}$ mg mit einer Temperaturerhöhung von 37,8 ^{0} und sehr starken subjektiven Beschwerden; der zweite reagierte auf die dritte Injektion von $^2/_{10}$ mg mit einer Temperatursteigerung auf 38,4 ^{0} und starker Allgemein- und Lokalreaktion.

Als der Versuch mit vier anderen Fällen offener Tuberkulose wiederholt wurde, mit der einzigen Modifikation, daß zwei der Fälle 200 mg Tuberkulin zu sich nahmen, ergab sich dasselbe Resultat. Jedenfalls geht aus diesem Versuche hervor, daß das Alt-Tuberkulin subkutan einverleibt mindestens tausendmal giftiger wirkt als bei stomachaler Einverleibung; auch zu diagnostischen Zwecken kann man also nicht empfehlen, es per os zu verabreichen. Auch Huys und Köhler konnten dieses Ergebnis bestätigen. (Beiträge zur Klinik der Tuberkulose 1906).

Gegen die „perkutane" Applikation, welche kürzlich von C. Spengler[865]) empfohlen wurde, muß man ganz besonders den Einwand erheben, daß von einer Dosierung bei diesem Verfahren keine Rede sein kann; deshalb ist es wohl auch nicht zur probatorischen Impfung verwendbar.

An dieser Stelle seien auch die Versuche von Kapralik und v. Schrötter[482]) erwähnt, welche auf eine Resorption des Tuberkulins von der Lunge das größte Gewicht legten. Diese Autoren verwendeten den Thermovariator nach Bulling, um größere Mengen von Tuberkulin zur Inhalation zu bringen.

Da hier das Tuberkulin in sehr fein verteiltem Zustande zur Resorption kommt, sind die Aussichten jedenfalls besser als bei dem aus mehrfachen Gründen gescheiterten „Lungeninfusionsverfahren" Jakobs; Kapralik und von Schrötter fanden 30 mg zur Erzielung einer Reaktion bei aktiver Lungentuberkulose notwendig, „bei Nichttuberkulösen im klinischen Sinne, bei tuberkulösen Herden, die an anderen Körperstellen folgen, beträgt die zur Erzielung einer Reaktion notwendige Tuberkulinmenge 250 mg". Selbstverständlich ist hier ein quantitatives Arbeiten nicht gut möglich; „nach orientierenden Messungen in der Inhalationskammer dürfte etwa der hundertste Teil der in den Respirationsapparat gelangenden Flüssigkeit resorbiert werden" (cit. nach Bandelier). Bandelier[56]) hat diese Methode einer Nachprüfung unterworfen und die dabei erzielten Resultate durch die Injektion kontrollieren können; die zur Hervorrufung einer Reaktion nötigen Dosen schwankten zwischen 20 und 150 mg Tuberkulin; innerhalb dieser Grenzen deckte sich der Ausfall mit den Resultaten der Injektion. Bei Fortsetzung dieser Versuche wird auch die interessante Frage vielleicht Berücksichtigung finden, ob es möglich ist, auf diesem Wege eine Gewöhnung an das Tuberkulin

zu erzielen. Sowohl KAPRALIK und VON SCHRÖTTER als BANDELIER haben eine eigenartige und merkwürdige dyspnoeische Wirkung der Tuberkulininhalationen beschrieben, welche von den ersteren Autoren auf eine direkt toxische Wirkung des Tuberkulins auf die peripheren Vagusendigungen in der Bronchialschleimhaut zurückgeführt wird.

Die rektale Einverleibung des Tuberkulins zu therapeutischen Zwecken, wurde von RUHEMANN[1260]) und LISSAUER[1261]) empfohlen. Ersterer verwendete hohe Eingießungen, während LISSAUER die Einfüllungen in Glyzerinsuppositorien zweckmäßiger findet. Nun ist es möglich, ja sogar wahrscheinlich, daß das Tuberkulin auch vom Mastdarm aus resorbiert wird, aber es ist sehr fraglich, ob bei dieser Art der Einverleibung Immunitätsvorgänge ausgelöst werden; jedenfalls liegen darüber noch keine Arbeiten vor.

Gegen alle diese Methoden gilt der Einwand zu Recht, daß sie jede experimentelle Basis vermissen lassen und insbesondere nur auf sehr wenige Einzelbeobachtungen gegründet sind; solange nicht ausgedehnte systematische Versuche vorliegen, kann solchen Vorschlägen nur ein kasuistischer Wert beigemessen werden.

Die Technik der Injektion.

KOCH gibt nach seinen jüngsten Erfahrungen folgende Vorschrift für die diagnostische Tuberkulininjektion: „Wenn der Kranke als geeignet befunden ist, dann erhält er vormittags unter die Haut des Rückens eine Injektion von 0,1—1,0 mg Tuberkulin, bei schwächlichen Menschen fängt man mit 0,1 mg an, bei kräftigen Personen mit voraussichtlich sehr geringen Veränderungen kann man mit 1,0 mg beginnen. Erfolgt auf diese erste Einspritzung gar keine Temperatursteigerung, dann steigt man auf die doppelte Dosis, aber nicht schon am nächsten, sondern erst am darauf folgenden Tage. Tritt eine Temperaturerhöhung, sei es auch nur um ein viertel Grad, ein, dann wird mit der Dosis nicht gestiegen, sondern, nachdem die Temperatur wieder zur Norm zurückgekehrt ist, dieselbe Dosis noch einmal gegeben. Sehr oft zeigt sich dann, daß die nunmehr eintretende zweite Reaktion, obwohl die Dosis die nämliche geblieben ist, doch stärker ausfällt als die erste. Es ist dies eine für die Tuberkulinwirkung ganz besonders charakteristische Erscheinung und kann als ein untrügliches Zeichen von Tuberkulose gelten“ (Fig. 1).

An dieser Methodik hält die Mehrzahl der Autoren fest, wenigstens soweit sie durch Publikationen vertreten ist, siehe die zahlreichen Arbeiten von PETRUSCHKY, BANDELIER, MÖLLER, SPENGLER, HAMMER, KREMSER, RÖPKE, KRAUSE, MAX WOLF, BECK, FREYMUTH, ADLER, KRAEMER.

BANDELIER und RÖPKE empfehlen folgende Steigerung der diagnostischen Tuberkulindosen: „von $^2/_{10}$ auf 1 mg als zweite Dosis, auf 5 mg als dritte Dosis und schließlich auf 10 mg als vierte und Enddosis. Dabei bleibt aber auf das genaueste zu beobachten, daß die folgende Dosis nur dann gesteigert werden darf, wenn die vorhergegangene Injektion keine Temperatursteigerung hervorgerufen hat. Ist die Temperatur auch nur um 3 Zehntelgrade gestiegen, so wird die Dosis nicht gesteigert, sondern in gleicher Höhe noch einmal gegeben, nachdem die Temperatur wieder zur Norm zurückgekehrt ist.“

KOCH hat als Grenzdosis, bis zu welcher eine Reaktion noch als spezifisch angesehen werden kann, 10 mg festgesetzt. Manche Autoren, wie GÖTSCH[304]), sind darüber hinausgegangen; GÖTSCH will die Diagnose

Tuberkulose erst dann ausgeschlossen wissen, wenn auf 50 mg keine Reaktion erfolgt. Die Mehrzahl der oben genannten Autoren nimmt aber 10 mg als äußerste Grenze an und bezeichnet die Reaktion, die durch Dosen über 10 mg erzwungen ist, als nicht mehr charakteristisch für Tuberkulose. Andere Autoren behaupten, daß durch Dosen von 10 mg auch völlig abgeheilte, inaktive Formen zu einer Reaktion veranlaßt werden und schlagen deshalb vor, die Grenzdosis niedriger zu fixieren.

Um sich nun zu überzeugen, ob wirklich die Dosis von 10 mg zu hoch gegriffen sei, hat Verfasser folgenden Versuch gemacht, von der

Fig. 1. Kräftige Reaktion einer chronischen Erkrankung. Kochsche Methodik.

Ansicht ausgehend, daß bei dem alten Modus der Injektion die Reaktion weniger durch die Steigerung der Dosis als durch die Wiederholung desselben Reizes verursacht sei.

Deshalb wurde folgender Versuch gemacht: Statt nach der üblichen Technik die Dosis zu steigern, wurde der umgekehrte Weg eingeschlagen. Zehn Patienten geschlossener Tuberkulose erhielten als erste Injektion 10,0 mg. Von diesen reagierten acht, und zwar hielt sich die Temperatur bei sieben Fällen zwischen 39,1—39,8°, und der achte Fall erreichte eine Temperatur von 37,8° mit stärkeren subjektiven Beschwerden als dieser geringen Temperatursteigerung entsprach. Der neunte Fall reagierte auf 2 mg (fünfte Injektion) und der zehnte Fall bot auch auf 50 mg (achte Injektion) keine Reaktion dar. Der Versuch war in der Hoffnung unter-

nommen, daß auf die erste Injektion überhaupt keine Reaktion erfolgen werde, sondern daß erst auf die zweite, dritte oder vierte Injektion von $^{2}/_{10}$ mg die charakteristische Reaktion zustande komme. Leider war das nicht der Fall, da die Dosis von 10 mg eben doch eine zu starke war.

Doch kann daraus absolut nicht der Schluß gezogen werden, daß die Dosis von 10 mg zu hoch gewählt sei, um noch der Reaktion den spezifischen Charakter zu erhalten, sondern es besteht eben die Möglichkeit, daß einer **einmaligen** Injektion von 10 bzw. 5 mg bereits ein hoher diagnostischer Wert zugesprochen werden muß.

Gewiß ist die Wirkung von 10 mg als erste Injektion bei weitem nicht so intensiv wie als vierte Injektion. Denn wir sehen, daß durch eine Injektion von $^{2}/_{10}$ (dem 50. Teil dieser Dosis) zum viertenmal verabreicht, eine Reaktion zustande kommen kann, welche an Intensität oft der durch 10 mg hervorgerufenen nur wenig nachsteht. Reagiert also jemand auf die vierte Injektion nach der alten Methodik (10 mg), so summiert sich hier die Steigerung der Dosis mit einer rund um das 50-fache gesteigerten Empfänglichkeit des Organismus. Es kommt also in einem solchen Falle zu einer überaus heftigen Reaktion (häufig 40°).

Deshalb hat Guttmann 3,0 mg, Pickert 2,5 mg bei seinen diagnostischen Injektionen nicht überschritten, tatsächlich besteht ein Bestreben, die Verabreichung so großer Dosen zu umgehen. Besonders Pickert hat die Ansicht vertreten, eine Reaktion gewinne an diagnostischem Wert, wenn sie durch geringe Dosen hervorgerufen sei. Auch Neisser und Pollack[1121]), Schlüter[806]), Kaminer[982]) haben eine ähnliche Meinung geäußert. Unter den Umständen, welche der Aufstellung einer einheitlichen Methodik der diagnostischen Tuberkulininjektion sich hindernd erweisen, ist gewiß dem Momente eine Bedeutung zuzusprechen, daß die Empfänglichkeit oder besser die Widerstandsfähigkeit auch bei den Tuberkulösen großen Schwankungen unterliegt.

Wiederholt hat man sich bemüht, einen Zusammenhang zu konstruieren zwischen der geringsten Dosis, welche die spezifische Reaktion auszulösen imstande ist und der Schwere des Erkrankungsprozesses; doch ist hier nur ein Aufschluß zu erwarten, wenn bei einem großen Material von Leicht- und Schwerkranken dieselbe Dosierung innegehalten wird, eine Bedingung, die nur selten erfüllt werden kann.

Auch der Versuch, die Schwere der Reaktionserscheinungen von der Ausdehnung des spezifischen Prozesses abhängig zu machen, hat zu keinem brauchbaren Ergebnis geführt; doch haben sich in der letzten Zeit die Stimmen gemehrt, welche im Anschluß an Angaben Turbans, Möllers, Möllers und Kayserlings dafür eintreten, daß frische Erkrankungen auf kleine Dosen ($^{2}/_{10}$—2,0 mg) heftig zu reagieren pflegen, während andererseits ausgesprochen chronische Erkrankungen erst auf größere Dosen mit geringen Fieberbewegungen antworten.

Nun hat Löwenstein in der wiederholt zitierten Arbeit die Behauptung aufgestellt, daß es in der Mehrzahl der Fälle überhaupt gar nicht notwendig sei, die Tuberkulindosis zu steigern; es genüge dieselbe Dosis z. B. $^{2}/_{10}$ mg, viermal innerhalb eines Zeitraums von 12—16 Tagen zu verabreichen; in der bei weitem überwiegenden Mehrzahl der Fälle komme es bei der dritten oder vierten Injektion zu einer typischen Reaktion. Die Dosis von $^{2}/_{10}$ mg wurde nur deshalb gewählt, weil sie die geringste Tuberkulindosis ist, die zu diagnostischen Zwecken verwendet wurde.

Möller, Löwenstein und Ostrowski[614]) haben auf dem Pariser Tuberkulosekongress 1905 ihre Erfahrungen, welche aus einem Material von 180 derartig diagnostisch injizierten Patienten gewonnen worden waren, veröffentlicht, und diese Methode als eine „einheitliche“ empfohlen.

Ihren Vorschlag begründeten diese Autoren mit folgenden Erwägungen: I. Es ist sicher gestellt, daß Reaktionen, welche durch derartig kleine Dosen hervorgerufen werden, ein höherer diagnostischer Wert zukommt, als den durch große Tuberkulin-Dosen erzwungenen. Gerade die frischen Fälle, bei denen die physikalische Untersuchung Zweifel über die Natur der Erkrankung aufkommen lassen kann, pflegen auf die dritte oder vierte Injektion von $^{2}/_{10}$ mg lebhaft zu reagieren. (Siehe Temperatur-Tabellen, Fig. 2.)

II. Das Reaktionsbild ist reiner und insofern spezifischer, als die Lokalreaktion mehr in den Vordergrund tritt, während die Allgemeinreaktion nicht so intensiv ist und rascher abklingt.

III. Andererseits ist die Dosis von 10 mg doch eine willkürlich angenommene, in deren Gefolge oft ernstere Allgemeinsymtome auftreten (Fieber über 40°, Erbrechen, Herzklopfen, starke Kopfschmerzen).

Fig. 2. Starke Reaktion eines frischen Falles auf die dritte Injektion von $^{2}/_{10}$ mg Alt-Tuberkulin.

Es kommt durch die viermalige Injektion **derselben** Dosis, mag dieselbe nun $^{2}/_{10}$, $^{5}/_{10}$ oder 1 mg betragen, der qualitative Charakter dieses biologischen Phänomens zum Ausdruck, der durch die fortgesetzte Steigerung des Reizes bis zum Eintreten einer Reaktion völlig verwischt war.

In der Heilstäte Belzig werden seit mehr als 3 Jahren alle in Betracht kommenden Fälle nach dieser Methode gespritzt, so daß bis

jetzt Erfahrungen über 300 Fälle vorliegen. Seitdem diese Methode in der Heilstätte Belzig in Anwendung ist, ist es nur in einem sehr geringen Prozentsatz der Fälle notwendig, über $^2/_{10}$ mg hinauszugehen. Manchmal treten dann auf 2,0 mg als fünfte oder 5,0 mg als sechste Dosis die Reaktionserscheinungen auf, doch boten die auf $^2/_{10}$ mg nicht reagierenden Fälle in der Regel auch klinisch nur wenig Anhaltspunkte dafür, daß eine sichere aktive Tuberkulose bestehe.

Die geringe Zahl der nach dieser Methode nicht reagierenden Fälle lassen sich in zwei Gruppen scheiden:

a) Scheinen ausgeheilte Prozesse gegenüber so kleinen Dosen ihre Reaktionsfähigkeit eingebüßt zu haben. Wir verfügen über eine kleine Reihe von Fällen, bei denen auf viermalige Injektion von $^2/_{10}$ mg innerhalb von 12 Tagen keine Reaktion auftrat; bei ungefähr 80 % ergab der weitere Verlauf, daß auch keine aktive Tuberkulose vorgelegen, sondern daß es sich tatsächlich um in der Ausheilung begriffene Fälle gehandelt hatte. Ein großer Teil derselben reagierte auch nicht auf die zweite Injektion von 10 mg, so daß man Bandelier nur darin beistimmen kann, wenn er im Steigen der Tuberkulinimmunität ein Zeichen dafür erblickt, daß der Heilungsprozess eingesetzt hat.

b) Besitzen chronische Tuberkulosen, welche seit mehreren Jahren bestehen, eine gewisse Immunität, die erst durch größere Dosen von 2,0, 5,0 bis 10,0 mg überwunden wird. Doch sind solche Fälle leicht an den ausgedehnten Zerstörungen, in der Lunge z. B., erkennbar, sie sind eigentlich auch unter die Fälle mit ausgesprochener Heilungstendenz einzuordnen.

Indikationen und Kontraindikationen.

Eine diagnostische Tuberkulininjektion kann in allen Fällen zu Rate gezogen werden, in denen die Diagnose zweifelhaft ist, aber auch bei sicheren Fällen ist sie besonders zur Einleitung der spezifischen Behandlung zu empfehlen. Ernste Störungen oder gar Todesfälle habe ich noch nicht auf die Tuberkulininjektion zurückführen können, obwohl ich über ein Material von ungefähr 20 000 Einzelinjektionen verfüge. Speziell nach der Technik von Löwenstein ist eine Schädlichkeit wohl auszuschließen.

Als direkte Kontraindikationen sind Larynxtuberkulose, Herzfehler, Diabetes, Nephritis und Gravidität angeführt worden.

Das Bild der Allgemeinreaktion.

Sicher ist, daß der Tuberkulindosis, welche die Reaktion auslöst, auch ein entscheidender Einfluß auf den Verlauf der Reaktion zukommt; schon zeitlich tritt das in Erscheinung, indem Dosen von 10 mg bereits nach 8 Stunden ihre Wirkung zu äußern pflegen, während geringere Dosen doch eine Zeit von 10—16 Stunden beanspruchen. Dann setzt ein mehr oder minder leichter Schüttelfrost ein, begleitet von Kopfschmerzn, Schmerzen und Ziehen in den Gliedern. Vorher schon, oft bereits 1—2 Stunden nach der Injektion, beginnt die Injektionsstelle sich zu röten, zu schwellen und schmerzhaft zu werden. Es bildet sich in ungefähr 10 Stunden ein ungefähr zweipfennig- bis talergroßes Infiltrat an der Einstichstelle, dessen Resorption 2—4—6 Tage in Anspruch nehmen kann.

Nach ungefähr 12—14 Stunden ist in der Regel bei Dosen um 10 mg der Gipfel der Reaktion erreicht, unter lebhaftem Schweißausbruch und Zurückgehen der subjektiven Beschwerden sinkt die Temperatur wieder zur Norm zurück, so daß in der Regel die ganz allgemeine Reaktion in 24—36 Stunden abgeklungen ist; höchstens bleibt noch durch zwei bis drei Tage eine leichte Müdigkeit und vermehrter Auswurf bei Lungenkranken zurück.

Nun existieren Beobachtungen, daß die Temperatursteigerung erst nach 24 oder 48 Stunden aufgetreten ist; das konnten wir dadurch erklären und auch willkürlich erzeugen. daß wir das Tuberkulin nicht subkutan, sondern kutan injizierten.

Recht häufig hingegen kommt ein Wiederansteigen der Körpertemperatur am zweitfolgenden Tage vor, diese „verschleppten oder pro-

Fig. 3. Verschleppte Reaktion bei einem frischen Fall.

trahierten Reaktionen“ sind aber dann am drittfolgenden Tage ebenfalls beendet. Für die Erklärung könnte noch in Betracht kommen, daß ein Teil des Tuberkulins in die Haut gegangen ist, deshalb später zur Resorption kommt und eine zweite Reaktion auslöst, möglich ist aber auch, daß die Ursache wo anders zu suchen ist (Fig. 3).

Die lokale Reaktion.

„Die örtliche Reaktion kann am besten an solchen Kranken beobachtet werden, deren tuberkulöse Affektion sichtbar zu Tage liegt, also z. B. bei Lupuskranken. Bei diesen treten Veränderungen ein, welche die spezifische antituberkulöse Wirkung des Mittels in ganz überraschender Weise erkennen lassen. Einige Stunden, nachdem die Injektion unter die Rückenhaut, also an einem von den erkrankten Hautteilen im Gesicht usw. ganz entfernten Punkt gemacht ist, fangen die lupösen Stellen und zwar gewöhnlich schon vor Beginn des Frostanfalles an zu schwellen und sich zu röten. Während des Fiebers nimmt Schwellung und Rötung immer mehr zu und kann schließlich einen ganz bedeutenden Grad erreichen, sodaß das Lupusgewebe stellenweise braunrot und nekrotisch wird. An schärfer abgegrenzten Lupusherden war öfters die stark geschwollene und braunrot gewordene Stelle von einem weißlichen, fast einen Zentimeter breiten Saum eingefaßt, der seinerseits wieder von einem lebhaft geröteten Hof umgeben war. Nach Abfall des Fiebers nimmt die Anschwellung der lupösen Stellen allmählich wieder ab, sodaß sie nach zwei bis drei Tagen wieder verschwunden sein kann. Die Lupusherde selbst haben sich mit Krusten von aussickerndem und an der Luft vertrocknetem Serum bedeckt, sie verwandeln sich in Borken, welche nach zwei bis drei Wochen abfallen.“

Die Schilderung Kochs wurde bald von allen Seiten bestätigt: Diesen grob sinnfälligen Veränderungen liegen folgende Veränderungen in der Gewebsstruktur zugrunde. Doutrelepont[212]) beschreibt sie folgendermaßen beim Lupus: „Am deutlichsten tritt als Erscheinung der akuten Entzündung ein teils seröses, teils serofibrinöses Exsudat und eine Durchsetzung der Kutis mit Rundzellen auf. Schon die Epidermis ist davon betroffen. Die Hornschicht ist häufig durch Anhäufung von serofibrinösem Exsudat und Leukocyten, in welchen ich zwar selten einzelne Tuberkelbazillen, einmal nur einen Haufen davon gefunden habe, von den tieferen Schichten abgehoben.

Das Rete Malpighi ist auch von Exsudat und Rundzellen durchsetzt, die Retezellen hyalin degeneriert und zerfallen, wodurch Hohlräume in dem Rete gebildet werden. Das Exsudat durchsetzt die ganze Kutis und dringt sogar zwischen den epitheloiden Zellen in die Tuberkelknötchen ein und drängt die Bestandteile derselben auseinander. Nach der Methode von Weigert[1188]) gefärbt, zeigen die Schnitte manchmal ein feines Netzwerk von Fibrinfäden, welches in dem Rete dann um die Tuberkelknötchen und selbst in dieselben bis zur Mitte vordringt; die Gefäße der Kutis sind erweitert und mit starker Ansammlung von Rundzellen umgeben. Diese Rundzellenansammlung begleitet die Haarfollikel und Schweißdrüsen. Die Lupusknötchen selbst sind besonders an ihrer Peripherie viel stärker als sonst mit Rundzellen, welche meistens einkernig sind, während die mehrkernigen in der Zahl sehr zurücktreten, infiltriert. Diese Zellinfiltration dringt jedoch auch in die Knötchen ein und bildet gleichsam Stränge, welche die einzelnen Knötchen in viele, mehr oder weniger runde Abschnitte teilen.“

Auch die histologischen Untersuchungen Zieglers[964]) und Kromeyers[495]) ergaben dasselbe Resultat.

Die lokale Reaktion in anderen Organen, die direkter Beobachtung nicht zugänglich sind, wird in erster Linie von ihrem Aufbau beherrscht. So

sehen wir auch bei tuberkulösen Lymphdrüsen Reaktionen auftreten, welche vorwiegend in Rötung, Schwellung und Schmerzhaftigkeit bestehen. Die örtliche Reaktion in den erkrankten Lungenpartien ist sehr häufig auskultatorisch nachzuweisen, denn infolge der vermehrten Saftströmung um die tuberkulösen Herde sind die Rasselgeräusche vermehrt, oft werden sie überhaupt erst nach der Injektion hörbar. Der Auswurf ist ganz wesentlich vermehrt und in einer ganzen Reihe von Fällen, bei denen vor der Tuberkulinreaktion keine Bazillen im Auswurf gefunden werden konnten, wurden nach derselben reichlich Bazillen aufgefunden (siehe Jahresbericht von Möller[608]), Kremser, Löwenstein und Kaufmann).

Auch anscheinend abgeheilte tuberkulöse Herde scheinen lokale Reaktionen darzubieten, auf größere Dosen können von tuberkulösen Prozessen herrührende Narben anschwellen und druckempfindlich werden. Fistelnarben können aufbrechen und sich wieder schließen. Lupusnarben schwellen stark an und röten sich lebhaft.

Angesichts dieser Wirkung auf tuberkulöse Prozesse kann man nur sich Forschern wie von Bergmann, Doutrelepont, Kaposi anschließen, wenn sie behaupten: „Die lokale Wirkung des Tuberkulin ist das, was es als ein Spezifikum, d. h. als ganz etwas Besonderes und Apartes kennzeichnet.“ (von Bergmann.)

Demgegenüber kann einzelnen in der Literatur verstreuten Angaben über die mangelnde Spezifität der Reaktion nur wenig mehr Gewicht als man gelegentlichen Beobachtungen beilegen darf, beigemessen werden. Denn genau, wie auch Gesunde auf große Dosen Tuberkulin reagieren, so tun es Kranke auch; und angesichts der Verbreitung der Tuberkulose ist es sehr schwierig, das Bestehen einer Tuberkulose auszuschließen, besonders wenn Krankheiten wie Lepra, Aktinomykose, Lues, Karzinom vorliegen. So haben Babes und Kalendero[35]), Josef[107]), Raposi[426]), Arning[26]), Goldschmied[306]) bei Lepra, Billroth und Eiselberg[999]) bei Aktinomykose, ebenso Woelfler[959]), bei Lues Neumann[644]) über positive Reaktion berichtet.

Andere Autoren haben wieder den Einwand erhoben, daß nicht alle Tuberkulösen reagieren, sondern direkt bei Tuberkulösen ein Versagen der Reaktion möglich sei. Solche Angaben haben Olshausen[665]), Gerhard[299]), Epstein[232]), Biermer[103]), Weber[939]), Brieger[1007]), Schöler[817]), Wegener[942]) gemacht. Es ist völlig unmöglich, auf diese einzelnen Fälle einzugehen, sie sind in einer so ungeheuren Minderzahl, daß ganz besondere Verhältnisse vorgelegen haben müssen. Köhler[461]) hat daraus den Schluß gezogen, daß eine Tuberkulinreaktion weder positive noch negative Stützpunkte für die Diagnose Tuberkulose bedeutet. Dieser Autor vergißt offenbar über den Ausnahmen die Regel.

Die Theorien über das Zustandekommen der spezifischen Reaktion.

Koch hat sich folgendermaßen über die Entstehungsweise der Reaktion geäußert:

Das Tuberkulin enthält eine gewisse Menge der nekrotisierenden Substanz, von welcher eine entsprechend große Dosis auch beim Gesunden gewisse Gewebselemente, vielleicht die weißen Blutkörperchen oder ihnen nahe stehende Zellen schädigt und damit Fieber und den ganzen eigen-

tümlichen Symptomenkomplex bewirkt. Beim Tuberkulösen genügt aber eine sehr viel geringere Menge, um an bestimmten Stellen, nämlich da, wo Tuberkelbazillen vegetieren und bereits ihre Umgebung mit denselben nekrotisierenden Stoffen imprägniert haben, mehr oder weniger ausgedehnte Nekrosen von Zellen nebst den damit verbundenen Folgeerscheinungen für den Gesamtorganismus zu veranlassen."

Babes[34]) und Matthes[584]) sehen die Ursache der Reaktion in einer Summation des im tuberkulösen Herde befindlichen und des injizierten Tuberkulins, Marmorek[580]), Preisich[725]) und Heim[346]) sind der Ansicht, daß das Tuberkulin die bereits im Körper befindlichen Tuberkelbazillen zu einer stärkeren Giftbildung anrege, eine Meinung, die die Reaktion von bazillenfreien Menschen nicht erklärt.

Löwenstein spricht von einer Giftüberempfindlichkeit, wie sie v. Behring zuerst beim Diphtherie- und Tetanusgift beobachtet hat. Später mehrten sich diese Befunde, indem Wolf[954]) bei endogenen Giften (Organeiweiß, Choleravibrionen und Typhusbakterien), Menzer[592]) und Ostrowsky[670]) bei Injektionen von Streptokokkenserum am Menschen, v. Pirquet und Schick[712]) beim Scharlachserum, Cole[1014]) bei Typhusbakterien angaben, daß die zweite, dritte oder vierte Injektion eine intensivere Wirkung entfalte als die erste.

In der Tat ließen sich dann die von v. Behring bei Diphtherie und Tetanus gefundenen Tatsachen beim Tuberkulin durch die oben geschilderte Methodik bestätigen. Die Erfahrungen bei anderen Mikroorganismen und anderen Antigenen sind imstande diese Auffassung zu stützen. Aber auch in der Physiologie sprechen sehr viele Tatsachen dafür, daß es eine jedem Organismus anhaftende Funktion gibt, die cum grano salis als Gedächtnis bezeichnet werden kann (siehe auch Hering). Ein Organismus, der also einmal mit Tuberkulose infiziert ist, wird deshalb leichter auf Tuberkulin reagieren, weil er schon unter dem Einflusse eines Tuberkelbazillengiftes, das im Organismus entstanden ist, sich befunden hat. Für diesen Autor ist die Tuberkulinreaktion nur ein „Spezialfall des Gesetzes von der Bahnung eines Reizes" (Exner).

Diese Vorstellung vermag auch in einheitlicher Weise das Entstehen der allgemeinen und der lokalen Reaktion zu erklären.

Durch die Ophthalmoreaktion ist bestätigt worden, daß auch **gesundes** Gewebe tuberkulinüberempfindlich wird, sobald der Organismus irgendwie die tuberkulöse spezifische Substanz resorbiert hat. Auf eine Tuberkulininjektion reagiert also auch nicht nur der tuberkulöse Herd, sondern der ganze Organismus bzw. eine Gewebsart, die im ganzen Körper verbreitet ist. Die lokale Reaktion kommt deshalb zustande, weil die Zellgebiete, welche einmal tuberkulöses Material resorbiert haben, eine höhere Resorptions- d. h. Reaktionsfähigkeit behalten. Sehr schön läßt sich das mittels der Ophthalmoreaktion demonstrieren: Träufelt man einem Gesunden nach 8—14 Tagen zum zweiten Male Tuberkulin in dasselbe Auge, so reagiert derselbe heftig, auch wenn er früher nicht reagiert hatte. Diese Reaktion tritt aber auch regelmäßig auf, wenn statt der zweiten Einträufelung die subkutane Injektion angewendet wird.

Diese von Cohn zuerst gemachte Beobachtung ist ein Beweis für die Berechtigung der obigen Anschauung.

Die Ehrlichsche[224]) Hypothese, welche durch eine Reihe eleganter Versuche von Wassermann und Bruck[937]) eine wesentliche Stütze erhalten hat, „nimmt zur Erläuterung der lokalen Reaktion an, daß ein tuberkulöser Herd gleichsam wie eine Zwiebel von mehreren Zellschichten umgeben sei. Die innerste dem Krankheitsherde zunächst gelegen, sei ganz mit Stoffwechselprodukten des Tuberkelbazillus durchtränkt, die mittlere eben durch diese Produkte geschädigt, und die äußere noch vollkommen unbeeinflußt und gesund.

Trifft nun das künstlich eingeführte Tuberkulin den erkrankten Herd, so wird weder die innere, schon ganz mit Tuberkulin durchtränkte, noch die äußere gesunde Schicht von jenem Reiz berührt werden, sondern die Reaktion wird durch die Wirkung des Tuberkulins auf die mittlere, bereits geschädigte Zellenlage ausgelöst werden."

Wassermann und Bruck[937]) präzisieren ihre Vorstellung dahin, „Die spezifische Reaktion des tuberkulösen Gewebes tritt ein, weil das Tuberkelbazillenpräparat durch seinen Antikörper (der nach Ehrlich in der mittleren Zellenlage zu suchen wäre) in das Gewebe hineingezogen wird und bei diesem Vorgange die gewebseinschmelzenden Kräfte des Organismus an dieser bestimmten Stelle konzentriert werden."

(Literatur siehe pag. 843—876.)

XXXV.

Kutane und konjunktivale Tuberkulinreaktion.

Von

Dr. C. v. Pirquet

in Wien.

Die Diagnostik der Infektionskrankheiten durch die Applikation bakterieller Extrakte auf Haut oder Schleimhaut des Erkrankten ist der jüngste Zweig der Immunitätslehre. Die folgende Darstellung der Reaktionen und ihrer Verwertung ist nicht das Ergebnis einer abgeklärten literarischen Auslese, sondern beruht vielfach auf meinen eigenen Erfahrungen. Sie ist demgemäß subjektiv gefärbt. Dafür habe ich mich verpflichtet gefühlt, die ganze bisher erschienene Literatur in chronologischer Reihenfolge zu referieren, um die von meinem Standpunkte abweichenden Befunde und Ansichten möglichst objektiv zur Kenntnis zu bringen.

In der Literatur habe ich alle älteren Arbeiten über Tuberkulin weggelassen, da dieselben in dem vorhergehenden Kapitel berücksichtigt wurden, dafür habe ich die neuesten Arbeiten über verwandte Reaktionen (bei Typhus und Rotz) miterwähnt, weil sie im engen Anschlusse an das Tuberkulin entstanden sind. Im Texte der Darstellung beschränke ich mich aber auf die kutane und konjunktivale Diagnose der menschlichen Tuberkulose.

Die kutane Tuberkulinreaktion (v. PIRQUET).

Ausführung der Probe: Die Innenseite des Unterarmes wird mit Äther gewaschen; aus einem Tropfgläschen werden in einer Distanz von ca. 10 cm zwei Tropfen Alttuberkulin aufgetropft. Hierauf wird mit einem Impfbohrer zuerst in der Mitte zwischen den beiden Tropfen, dann innerhalb jedes derselben eine bohrende Skarifikation ausgeführt; auf die Tropfen werden einige Fasern Watte aufgelegt, damit sie nicht abfließen. Nach 10 Minuten kann die Watte entfernt werden. Kein Verband. (Fig. 1 u. 2.)

Es ist vollkommen gleichgültig, an welcher Stelle der äußeren Haut die Impfung ausgeführt wird; die Innenseite des Unterarmes eignet sich dazu am besten wegen ihrer zarten, wenig behaarten Haut und der Bequemlichkeit der Inspektion.

Zur Desinfektion ist nur die Waschung mit Äther zu empfehlen; nach Anwendung wässeriger Desinfizientien oder von Alkohol zerfließt der Tuberkulintropfen.

Für den Geübten ist die Anlegung einer einzigen Impfstelle genügend; der Ungeübte wird aber aus dem gemeinsamen Unterschiede beider Impfstellen von der Kontrolle einen schärferen Schluß über die Reaktion ziehen können.

Als Tuberkulin verwende ich gegenwärtig gewöhnlich unverdünntes Kochsches Alttuberkulin. Ich hatte früher 25% angegeben, bin aber nach Anstellung quantitativer Untersuchungen auf unverdünntes übergegangen.

Das Tuberkulin kann statt im Tropfglase auch in Lymphröhrchen angewendet werden, die gerade zwei Tropfen fassen und zu einer Einzeluntersuchung reichen; wenn man, statt diese Tropfen abfließen zu lassen,

Fig. 1. Aufträufeln des Tuberkulins.

Fig. 2. Bohrung.

die Haut mit dem Ende des Röhrchens betupft, genügt ein Röhrchen für eine größere Zahl von Impfungen. Solche Röhrchen werden von der Firma Kremel in Wien XIV, Märzstraße in den Handel gebracht. Sie enthalten 4 verschiedene Tuberkulinlösungen: K I 25%, K II 100% für die kutane Probe, O I 1%, O II 5% Alttuberkulin für die konjunktivale Probe.

Der Impfbohrer, den ich angegeben habe und der vom Medizinischen Warenhaus A.-G. Berlin NW, Karlstraße 31 und von Dohnal & Co. Wien, Spitalg. 21, erzeugt wird, hat eine meißelförmige Spitze aus Platin Iridium. Der Bohrer bewirkt eine ganz gleichmäßige, unblutige runde Skarifikation der Epidermis. Je zarter die Haut ist, desto weniger Druck ist notwendig. Die Probe läßt sich natürlich auch ausführen, wenn man die Haut mit anderen Instrumenten oder anderen Schnittführungen verletzt[62, 63, 122]).

Das Bestehen einer Verletzung ist (bei kurzfristigen Applikationen des Tuberkulins) notwendig; wenn bei der Revision an der Impfstelle

kein Schorf zu sehen ist, so ist dies ein Zeichen, daß die Impfung zu oberflächlich ausgeführt war.

Man achte darauf, so wenig Watte aufzulegen, daß sie von dem Tropfen Tuberkulin noch ganz durchtränkt wird. Appliziert man mehr, so entzieht man das Tuberkulin der Wunde und vermindert den Effekt.

DETRES Differentialmethode[55, 102, 163]: Neben dem Tropfen Alttuberkulin wird je ein Tropfen unerhitzten Filtrates von humanen und bovinen Tuberkelbazillen aufgetropft; und dann viermal die Bohrung ausgeführt.

Beschreibung der Reaktion.

1. Traumatische Reaktion. Impf- und Kontrollstelle zeigen zunächst ein gleichartiges Verhalten: innerhalb weniger Minuten entsteht eine kleine Quaddel. Sie umgibt sich bald mit einem zarten rosa Hofe, welcher nach einigen Stunden wieder verschwindet. Es bleibt eine kleine, nur wenig erhabene Rötung zurück, in deren Mitte sich an der Verletzungsstelle des Epithels ein stecknadelknopfgroßer Schorf bildet. Die Rötung in der unmittelbaren Umgebung ist nach 24 Stunden meistens noch deutlich zu sehen, später sieht man nurmehr den kleinen braunen Schorf auf reaktionsloser Haut. Derselbe bleibt, je nach der Häufigkeit des Waschens, eine oder mehrere Wochen bestehen. Nach seinem Abfallen findet man eine stecknadelknopfgroße, helle Hautnarbe.

Die Intensität der traumatischen Reaktion ist abhängig von der Tiefe der Skarifikation und der Individualität der Haut. Bei gereizter Haut, wie z. B. bei Scharlachrekonvaleszenten, sieht man manchmal traumatische Reaktionen von 3—5 mm Durchmesser nach 24 Stunden. Sie verschwinden aber dann rasch.

2. Impfstellen mit negativer Reaktion verhalten sich wie die Kontrolle. Nur erscheinen sie in den ersten 24 Stunden gequollen, die traumatische Reaktion ist etwas intensiver. Unterscheidungen von minimalen spezifischen Reaktionen erfordern große Übung; für den Ungeübten empfiehlt es sich, Reaktionen unter 5 mm Durchmesser als zweifelhaft anzusehen und in einem solchen Falle die Impfung zu wiederholen, da sich bei der Wiederholung eine positive Reaktion verstärkt.

Bei Verunreinigung des Tuberkulins mit Saprophyten bilden sich an den Impfstellen Knötchen im Durchmesser von 2—3 mm, die unter dem Schorfe Andeutung von Eiterbildung zeigen, aber nach einigen Tagen ohne weitere Vergrößerung eintrocknen. Als ich anfangs das Tuberkulin mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnte, sah ich einmal eine Reihe solcher Pseudoreaktionen an durchaus unverdächtigen Kindern. Bei Anwendung von unverdünntem Alt-Tuberkulin oder Verwendung von 5% Karbolglyzerin als Verdünnungsflüssigkeit ist das Wachstum von Bakterien ausgeschlossen.

Wahrscheinlich sind die „kleinen aber deutlichen Papeln", die ENGEL und BAUER[65]) bei nicht tuberkulösen Säuglingen sahen, solchen Verunreinigungen des Tuberkulins zuzuschreiben. Dafür spricht der enorme Prozentsatz, den sie unter Säuglingen positiv fanden: 6 Kinder unter 48, während ich unter 441 nur 14 positive Reaktionen hatte.

Bei Kindern mit Impetigo habe ich es einige Male gesehen, daß an Kontroll- und Impfstellen gleichartige kleine Bläschen entstanden, wahrscheinlich durch Keime, welche sich auf der Haut befunden hatten. Manchmal gibt die Kontrollstelle eine typische positive Reaktion, aber nur neben positiv reagierenden Impfstellen, niemals bei negativen Fällen,

auch niemals bei gesonderter Anlegung der Kontrolle: Sichtlich wird hier die Reaktion durch das Überfließen des Tuberkulins auf die Kontrollstelle bedingt.

3. Die positive Reaktion. a) Latenzzeit. Die ersten Stunden vergehen ohne jede spezifische Wirkung des Tuberkulins, die durch traumatische Reaktion bedingte Rötung beginnt abzunehmen, bis ziemlich plötzlich ein neues Wachstum des roten Hofes beginnt. Die Dauer der Latenzzeit schwankt zwischen drei Stunden und mehreren Tagen. In den meisten Fällen ist die Reaktion nach 24 Stunden schon voll entwickelt. Reaktionen, deren Latenz mehr als 24 Stunden beträgt, nenne ich „torpid“. Diese Form kommt bei älteren Kindern häufiger vor als bei jüngeren und hauptsächlich bei klinisch unverdächtigen Fällen. Manifest tuberkulöse Kinder zeigen sie nur ausnahmsweise.

b) Wachstum. Die entzündliche Reaktion beginnt normaler Weise als eine leicht erhabene Rötung, die von der Skarifikation ausgeht und rasch an Ausdehnung und Höhe zunimmt. Der Durchmesser der Papel beträgt bis zu 30 mm, gewöhnlich etwa 10 mm. Je verdünnter das Tuberkulin, desto geringer ist bei demselben Individuum der Durchmesser der Effloreszenz (s. Taf. II, Fig. 1). Wie die Ausdehnung, so ist auch die Exsudation individuell sehr verschieden. Bei starker Prominenz ist das Zentrum gewöhnlich urtikariell abgeblaßt. In anderen Fällen bilden sich auf der Höhe der Papel kleinste seröse Bläschen, welche wahrscheinlich den Koriumpapillen entsprechen. Nur ausnahmsweise wird das Zentrum blasenförmig (niemals eitrig) erweicht. In der Farbe zeigen sich die verschiedensten Abstufungen. Im allgemeinen zeigen kräftige Menschen von gesunder Hautfarbe hochrote Papeln, anämische Individuen blaßrote Reaktionen. Manchmal fehlt die Hyperämie ganz, so daß die Papel nur durch den Tastsinn oder bei seitlicher Beleuchtung erkennbar ist. Farblose Papeln oder livide Flecken ohne Exsudation finden sich oft als Vorstadien des gänzlichen Versagens der Reaktionsfähigkeit im Verlaufe tödlicher Tuberkulose. („Kachektische Reaktion“).

Die Begrenzung der Papel ist bald kreisrund, bald zackig, ausnahmsweise sieht man längere Ausläufer in der Richtung der Lymphgefäße. Oft ist der Rand der Papel von kleinen, höckerigen Follikelschwellungen gebildet und dadurch unscharf, (s. Taf. II, Fig. 1). Wenn auch in der nächsten Umgebung solche Knötchen auftreten, so bezeichne ich die Reaktion als eine „skrofulöse“, weil sich diese Form hauptsächlich bei skrofulösen Kindern findet und an Lichen skrofulosorum erinnert (s. Taf. III, Fig. 3).

Die Hyperämie geht gewöhnlich nicht über den Rand der Exsudation hinaus, bei intensiven Reaktionen findet sich aber manchmal ein flacher rosaroter Hof außerhalb der Papel, der an die vaccinale Area erinnert (s. Taf. III, Fig. 2). Im übrigen ist die Tuberkulinreaktion von einer Vaccinepustel leicht zu unterscheiden: sie hat kein zentrales Bläschen und hat einen mehr violetten Grundton. Die Farbenunterschiede verhalten sich ungefähr wie zwischen Ekzem und Skrofuloderma. Nur in dem zeitlichen Eintreten und in den prinzipiellen Entstehungsbedingungen zeigen die Frühreaktionen von Vaccine und Tuberkulin große Ähnlichkeit.

c) Rückbildung. Das Maximum der Flächen- und Höhenausdehnung wird gewöhnlich 48 Stunden nach der Impfung erreicht. Danach nimmt die Exsudation ab, die Rötung spielt ins violette und gelbliche und geht allmählich in Pigmentierung über. Die Tastbarkeit

v. PIRQUET, Kutane und konjunktivale Tuberkulinreaktion.

Tafel II.

Alttuberkulin unverdünnt

Verdünnung 1 : 4

Verdünnung 1 : 16

Verdünnung 1 : 64

Kontrollstelle

Fig. 1. Quantitativ abgestufte Kutanreaktion. (Klinik Escherich, Franz S., 6 Jahre.) Skrofulose. Nach einer 48 Stunden nach der Impfung durch Dr. Henning aufgenommenen Moulage. 15. X. 07.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

v. Pirquet, Kutane und konjunktivale Tuberkulinreaktion.

Tafel III.

Fig. 2. Starke Kutanreaktion mit Arealbildung. (Klinik Escherisch, Franz K., 3 Jahre.) 48 Stunden nach Impfung mit 25% Alttuberkulin (2 Impfstellen, in der Mitte die Kontrollstelle).

Fig. 3. Skrofulöse Reaktion. (Klinik Escherisch, Stefanie H., 4½ Jahre.) Skrofulose; Impfung wie oben. Nach Moulagen von Dr. Henning-Wien IX, Allg. Krankenhaus.

geht in 5—8 Tagen verloren, die Pigmentierung kann wochenlang sichtbar bleiben. Es folgt dann eine leichte Abschuppung der Epidermis[62]).

Je jünger die Kinder sind, desto rascher resorbieren sie die entzündlichen Reste; bei Säuglingen kommt es vor, daß die Reaktion am dritten Tage schon undeutlich wird. Der günstigste Zeitpunkt für eine einmalige Revision der Impfung ist nach 48 Stunden.

d) Die sekundäre Reaktion. Bei Wiederholung der Impfung nach einigen Tagen entsteht häufig bei solchen Fällen positive Reaktion, welche bei der ersten Impfung negativ gewesen waren. Dabei tritt dann manchmal auch gleichzeitig an früheren Impfstellen eine verspätete Reaktion ein. Die sekundäre Reaktion findet sich, wie die torpide Reaktion, hauptsächlich bei klinisch nicht Tuberkulösen und ihr Prozentsatz wächst mit dem Lebensalter.

Entfernte und schädliche Wirkungen der kutanen Reaktion.

1. Bei meiner Methode der Bohrung, welche nur die oberflächlichste Epidermis wegnimmt, kommt Fieber nur ganz ausnahmsweise vor. Etwas häufiger scheint es aufzutreten, wenn man Schnittführung anwendet. Wahrscheinlich gelangt dadurch das Tuberkulin in tiefere Schichten der Haut, und von dort aus in den Kreislauf. Die Temperatursteigerung entsteht gleichzeitig mit der Entwicklung der Papel und erreicht niemals hohe Werte oder längere Dauer.

2. Dasselbe gilt von der Mitreaktion tuberkulöser Gewebe. (Herdreaktion.) SIEGERT[63]), welcher Schnitte anwendete, sah einmal die Mitrötung von Teilen der Gesichtshaut, wo früher ein skrofulöses Exzem gesessen hatte; ich selbst konnte niemals eine ganz einwandfreie Herdreaktion konstatieren.

3. Trotzdem hat die Impfung sicher einen gewissen Einfluß auf den Allgemeinorganismus, weil sie sehr häufig die allgemeine Tuberkulinempfindlichkeit beeinflußt. („Sekundäre Reaktion".)

4. MORO und DOGANOFF[39, 46]) sahen bei drei tuberkulösen Kindern das Auftreten von Erscheinungen der Skrofulose (Phlyktaenen, Schnupfen, allgemeinen Lichen skrofulosorum) 6—15 Tage nach der Tuberkulinprobe. Ich habe an einem viel größeren Materiale eine solche Beziehung nicht konstatieren können. Auch hat keiner der anderen Autoren etwas ähnliches beschrieben.

5. Der Übergang der Impfstelle in ein chronisches Geschwür, wie es OPPENHEIM[49]) bei einem Erwachsenen mit tuberkulösen Hautaffektionen sah, ist mir bei Kindern nicht vorgekommen. Der am torpidesten verlaufene Fall betraf ein zweijähriges Kind mit hochgradiger Überempfindlichkeit. Eine Impfstelle mit unverdünntem Tuberkulin öffnete sich zentral und verheilte erst nach drei Wochen unter Hinterlassung eines violetten skrofulodermartigen Infiltrates, ähnlich wie es PFAUNDLER[9]) beschrieben hat. Nach weiteren 3 Wochen verschwand auch das Infiltrat und hinterließ eine zart violette, schuppende Hautstelle.

Histologische Befunde.

BANDLER und KREIBICH[60]) geben folgende Beschreibung von dem mikroskopischen Bilde der kutanen Reaktion:

„Die Veränderungen spielen sich in Form von Entzündungsherden in der Kutis und Subkutis ab und reichen bis in das Fettgewebe. Die

Herde, welche meist aus einkernigen Infiltrationszellen bestehen, sind klein, bisweilen rund, meist follikulär um die Haarfollikel und um die Schweißdrüsen gelagert. Einzelne Herde, mehr länglich, sind im Fettgewebe, und diese enthalten epitheloide Zellen und einige Riesenzellen oder Ansätze zu Riesenzellen, die sich aber vom Langhansschen Typus unterscheiden. Echte Tuberkel mit zentraler Verkäsung sind nicht vorhanden. Das Epithel erleidet nur geringe Veränderungen. Über der Epidermis stellenweise parakeratotische Veränderungen in Form geringer Schuppenbildung. Das Bindegewebe ist im papulären Teile ödematös, sonst intakt bis auf geringe Kernvermehrung."

In ähnlicher Weise sprechen sich Ferrand und Lemaire[69]) aus, die jedoch keine Riesenzellen sahen und das Hauptgewicht auf die weitreichenden entzündlichen Erscheinungen legen, welche längs der Gefäße ausstrahlen und hauptsächlich aus kleinen Rundzellen bestehen.

Die konjunktivale (Wolff-Eisner) oder Ophthalmoreaktion (Calmette).

Angeregt durch meine Angabe über die kutane Tuberkulinreaktion[1, 2]) kamen Wolff-Eisner in Berlin und Calmette in Lille unabhängig von einander auf den Gedanken, die Wirkung des Tuberkulins auf der Bindehaut zu versuchen. Wolff-Eisner[4]) berichtete am 15. Mai über Experimente, welche er an Erwachsenen mit 10 % Alttuberkulin ausgeführt hatte, hat aber die Methode bisher nicht weiter ausgebildet.

Calmettes erste Mitteilung[12]) erfolgte am 17. Juni. Er bestrebte sich von Anfang an, die konjunktivale Probe, welcher er den Namen Ophthalmoreaktion gab, technisch auszubilden, und sie an Stelle der kutanen Probe, die er auf Grund der Angaben einiger französischer Autoren für unverläßlich hielt, in die breite Praxis einzuführen. In der Absicht, die Reizwirkung des im Alttuberkulin vorhandenen Glyzerins zu vermeiden, stellte er Alkoholfällungen von Tuberkulin dar, und verwendete sie zuerst in 1 %iger steriler Lösung, später, auf den Vorschlag Combys[27]), in $^1/_2$ %iger Lösung. Diese Lösung wird von dem Institut Pasteur in Lille durch die Firma Poulenc frères in Paris als Tuberkulin-Test in den Handel gebracht. Glasphiolen mit spitz-

Fig. 3. Tuberkulin-Test.

zulaufenden eingeritzten Enden enthalten 2—3 Tropfen der Lösung. Die Enden werden abgebrochen, und mittels einer beiliegenden Kautschuckkappe wird die Phiole selbst als Tropfgläschen benützt. Die $^1/_2$ $^0/_0$ige Lösung CALMETTES entspricht an Tuberkulingehalt einer 5 $^0/_0$igen Lösung von KOCHschem Alttuberkulin. Da der geringe Glyzeringehalt des letzteren, wie EPPENSTEIN[59]) nachwies, auf die Konjunktiva nicht reizend wirkt, kann man ebensogut dieses Präparat verwenden. (Fig. 3.)

Darstellung des Tuberkulin-Test nach CALMETTE[115]):

„Eine ungefähr 6 Wochen alte Kultur von bovinen Tuberkelbazillen wird durch 20 Minuten im Autoklaven auf 110^0 erhitzt, um die Bazillen abzutöten. Hierauf wird im Wasserbade ungefähr auf $^1/_{10}$ des Volumens eingeengt und filtrirt. Das Filtrat wird mit 95 $^0/_0$ Alkohol versetzt. Wenn der Niederschlag sich nicht gleich bildet, so setzt man eine Spur Kochsalz zu. Man filtriert und sammelt den Niederschlag von Tuberkulin auf dem Filter, kratzt ihn ab, trocknet ihn im Brutofen oder besser im Vakuum, dann wird der Niederschlag wieder in Wasser gelöst und der ganze Vorgang zweimal wiederholt, um das Produkt vollkommen zu reinigen. Man erhält dann ein weißliches Pulver, welches man fein zerreibt; damit ist es gebrauchsfertig."

Ausführung der Probe: Ein bis zwei Tropfen Tuberkulinlösung werden möglichst in der Nähe des inneren Augenwinkels auf die Bindehaut eines Auges fallen gelassen. Danach hält man für kurze Zeit die Augenlider auseinander. Das andere Auge dient als Kontrolle.

Traumatische Reaktion: infolge der Instillation entsteht beim Gesunden höchstens eine geringe Rötung, welche nach 6 Stunden nicht mehr sichtbar ist. Positive Reaktion: 3—6 Stunden, seltener 12—24 Stunden nach der Einträufelung tritt eine Hyperämie der Bindehaut ein, welche hauptsächlich das untere Lid, die unteren Teile des Bulbus und in charakteristischer Weise die Karunkel und die halbmondförmige Falte betrifft. Die Rötung ist gewöhnlich von leichter Schwellung und Sekretion begleitet. Bei intensiveren Reaktionen wird schleimig fibrinöses Exsudat abgesondert. Nach CITRON[37]) lassen sich drei Grade der Intensität unterscheiden:

1. Rötung nur an der Karunkel und an der Innenseite des unteren Lides,
2. außerdem auch am Augapfel,
3. eitrige Konjunktivitis und anderweitige stärkere Grade der Reaktion.

Das Maximum der Reaktion wird schon nach 10—12 Stunden erreicht, danach erfolgt in der Regel allmähliches Abklingen der Erscheinungen.

Temperatursteigerung oder Mitreaktionen tuberkulöser Herde werden nicht beobachtet.

Nur DUMAREST und ARLOING[79]) berichten über einige Fälle, in welchen die Reaktion von Fieber bis 38,7 begleitet war. Sie beschrieben als Nebenerscheinungen Kopfschmerzen der betreffenden Stirnseite und Erweiterung der Pupille.

Schädliche Nebenwirkungen außerhalb des Auges sind nicht erwähnt worden. Jedoch sind die örtlichen Erscheinungen manchmal durch ihre Heftigkeit und längere Dauer sehr unangenehm. EPPENSTEIN[59]) erwähnt mehrere Fälle, in denen phlyktaenenartige Entzündungserscheinungen auftraten. Ich selbst sah eine sehr heftige Konjunctivitis lymphatica, die nach einem Monate noch als leichte körnige Schwellung der Bindehaut

nachzuweisen war. In ähnlicher Weise berichten Schenck und Seiffert[114, auch 110, 111]) über phlyktaenuläre Eruptionen mit ziliarer Injektion sowie über Fälle, in denen beträchtliche Schwellung und Rötung der Lider tagelang anhielt. Am schärfsten warnen Wiens und Günther[121]) vor der Ausführung der Probe bei chronischem Bindehautkatarrh.

Um so intensive Reaktionen zu vermeiden, führt Eppenstein[59]) die Probe sukzessive mit ansteigender Dosis durch. Er beginnt bei Kindern mit $\frac{1}{2}\,^0/_0$, beim Erwachsenen mit $1\,^0/_0$ Alttuberkulin. Wenn die Reaktion negativ ausgefallen war, gibt er $2\,^0/_0$, bei nochmaligen negativem Ausfalle $4\,^0/_0$. Er verwendet dazu abwechselnd beide Augen.

Diese Vorsicht ist nötig, weil bei nochmaliger Einträufelung in dasselbe Auge sehr heftige „sekundäre" Reaktionen entstehen können. Sie haben auch nur einen sehr zweifelhaften diagnostischen Wert (Kohn[116]), Klieneberger[120]).

Reaktionen auf der äußeren Haut ohne Verletzung.

Moro und Doganoff[46]) wiesen nach, daß bei Skrofulösen auch ohne Verletzung der Epidermis durch das Einreiben mit Tuberkulinsalbe (Tuberkulin Lanolinum anhydricum āā.) eine spezifische Reaktion entsteht: 24—48 Stunden nach der Einreibung erscheinen zahlreiche miliare und größere teils einzelstehende teils konfluierende Knötchen auf geröteter Basis, ähnlich dem Lichen scrofulosorum und bleiben durch einige Tage sichtbar. Bandler und Kreibich[60]) konnten diese Befunde bestätigen. Als diagnostisches Mittel ist diese Art der Reaktion nicht gut verwertbar. Ich stellte sie bei einer Reihe von Kindern an, fand sie aber nur in einem Falle von hochgradiger Überempfindlichkeit.

Ähnliche Befunde hatten Lignières und Berger[90]) bei Tieren; sie schlagen für diese Art der Reaktion den Ausdruck „Dermoreaktion" vor.

Spezifizität der Reaktionen.

Die Tatsache, daß tuberkulöse Personen an beliebigen Stellen der Haut und an der konjunktivalen Schleimhaut entzündliche Erscheinungen geben, wenn man sie mit Tuberkulin in Berührung bringt, ist gar nicht zu bezweifeln. Es fragt sich aber, inwieweit diese Reaktionen für die Tuberkulose spezifisch sind, inwieweit ihr Auftreten mit der Anwesenheit des Tuberkelbazillus, bezw. dessen charakteristischen pathologischen Folgezuständen zusammenfällt. Zur Klärung dieser Frage sind vor allem die Sektionsbefunde berufen, welche an mit Tuberkulin geprüften Personen erhoben werden. Nicht so sicher ist die Übereinstimmung mit dem klinischen Befunde, soweit derselbe nicht ausgesprochene tuberkulöse Veränderungen aufweist, oder durch den Bazillennachweis unterstützt ist. Eine Kontrolle der Proben durch die subkutane Tuberkulininjektion, durch den Nachweis der Agglutination[26, 64, 79]) oder Komplementablenkung hat nur bedingten Wert, da der Ausfall aller dieser Proben auf ähnlichen Vorgängen im Organismus beruhen dürfte.

1. Sektionsbefunde. Ich verfüge bisher (Mitte November) über 124 Obduktionsprotokolle von Kindern, welche der kutanen Probe unterzogen worden waren.

1. 64 Fälle, bei denen keine Tuberkulose gefunden wurde; alle probatorisch negativ. Acht von ihnen waren mehrmals, die übrigen einmal geprüft worden. Die Todesursachen waren sehr ver-

schieden; 23 starben an Bronchitis und Pneumonie, darunter zwei Kinder mit hereditärer Lues, 16 an Meningitis epidemica, 13 an Magen- und Darmkatarrh, 4 an Diphtherie, 3 an Sepsis, je eines an Scharlach, Frühgeburt, Lebercirrhose, Encephalitis, Anämia gravis.

2. 14 Fälle mit Tuberkulose als Nebenbefund. Positive Reaktion bei 10 Fällen, negative bei 4 Fällen. Todesursachen: bei den positiven Fällen dreimal Pneumonie und Bronchitis, darunter ein Kind mit hereditärer Lues, viermal Meningitis epidemica, zweimal Empyem, einmal Encephalitis. Die negativen Fälle starben alle an Lobulärpneumonie.

3. 45 Fälle mit Tuberkulose als Todesursache; positive Reaktion in 31, negative in 14 Fällen. Alle negativen Fälle dieser Gruppe waren erst innerhalb der letzten 12 Tage vor dem Tode geprüft worden.

Unter den positiven, mehrmals untersuchten Fällen fanden sich vier, bei denen die sukzessive Abnahme der Reaktionsfähigkeit vor dem Tode verfolgt wurde. Die letzte positive Reaktion wurde 21, 11, 10, 7 Tage vor dem Tode ausgeführt, der erste negative Ausfall fand sich 12, 7, 8 und 2 Tage ante mortem.

Bis hierher läßt sich folgende Zusammenfassung geben: Positive Hautreaktion findet sich niemals ohne pathologisch-anatomische Tuberkulose. Negative Reaktion bedeutet im allgemeinen das Freisein von Tuberkulose, die Reaktion versagt aber auch häufig im letzten Stadium tödlicher Tuberkulose, seltener bei Tuberkulose als Nebenbefund.

4. Nur ein Fall paßt nicht in die Einteilung: ein $5\frac{1}{2}$jähriges Kind, das am 5. April mit 25 % Tuberkulin geprüft wurde. Nur eine Impfstelle reagierte. Tod am 15. Mai, Sektionsbefund: Chronischer Hydrocephalus nach Meningitis epidemica, Adhäsion der linken Lunge, Status Lymphaticus, keine Tuberkulose. Es war dies einer der ersten Fälle, welche ich untersuchte und ich möchte meinem damaligen Befunde nicht absoluten Wert beimessen. Seither fand sich bei zwei Kindern, welche probatorisch negativ gewesen waren, bei der Sektion „Status lymphaticus". Auch Aronade [119]), welcher 17 probatorisch negative Kinder am Sektionstische tuberkulosefrei fand, berichtet über einen Fall, in dem vergrößerte mesenteriale und thorakale Drüsen gefunden werden. Die Injektion des Drüsenmateriales ergab beim Meerschweinchen keine Tuberkulose.

Mosers 28 Fälle [8]) sind in meine Statistik einbezogen. Von anderen Beobachtern wurden bisher nur wenige Sektionsresultate mitgeteilt; so berichtet Comby [70]) über 10 Fälle, Petit [115]) über 8 Fälle, deren Ergebnis mit dem der Ophthalmoreaktion immer stimmte. Engel und Bauer [65]) beschreiben einen Fall, in welchem eine schwache positive Reaktion vorhanden war, bei der Obduktion aber keine Tuberkulose gefunden wurde. Dieses Ergebnis ist nach meiner Ansicht durch eine Pseudoreaktion infolge unreinen Tuberkulins zu erklären. In welcher Weise der analoge Fall von Flesch [105]) zustande kam, kann ich nach der Kürze der mir darüber zur Verfügung stehenden Mitteilung nicht beurteilen. Ich erinnere nur daran, daß auch bezüglich der Tuberkulininjektion anfangs eine Reihe von solchen Fällen mitgeteilt wurde, daß dieselben sich später bei verbesserter Methodik der vitalen und postmortalen Untersuchung aber als Irrtümer herausstellten (s. Cornet).

Übereinstimmung der Reaktionen mit dem klinischen Befunde.

Unter 757 Kindern, welche ich bis 1. September auf der Klinik Escherich und der Abteilung Moser kutan (fast durchweg mit 25 $^0/_0$ Alttuberkulin) prüfte, waren

Häufigkeit der Tuberkulose unter allen 988 Fällen nach dem Lebensalter.

Altersgruppen	0—3	3—6	6—12	1—2	2—4	4—6	6—10	10—14	über 14
	Monate			Jahre					
%	0	5%	16%	24%	37%	53%	57%	68%	90%

Fig. 7.

klinisch tuberkulös . .	130,	davon gaben positive Reaktion	113
Frei von Tuberkulose	512,	„ „ „ „	104
Zweifelhaft	115,	„ „ „ „	56

Von den klinisch tuberkulösen reagierten somit 87 $^0/_0$, von den klinisch tuberkulosefreien 20 $^0/_0$. Die nicht reagierenden manifest Tuberkulösen waren fast durchwegs kachektisch, oder im letzten Stadium der Miliartuberkulose. Über die wenigen Ausnahmen, welche ohne Kachexie die Reaktion vermissen ließen, werde ich später sprechen.

Die Reaktionsfähigkeit von 20 $^0/_0$ unter den klinisch nicht Tuberkulösen ist nicht gleichmäßig auf alle Altersklassen verteilt, sondern steigt von 0 $^0/_0$ im ersten Halbjahre auf 55 $^0/_0$ in der Altersgruppe von 10—14 Jahren (Fig. 8).

Die konjunktivale Probe ergibt nach Angabe der meisten Autoren eine noch bessere Übereinstimmung mit dem klinischen Befunde. Nach der Sammelforschung von PETIT[115]), welche sich auf 2974 Beobachtungen bezieht, fanden sich

unter	740	klinisch Tuberkulösen	698	positiv,
„	938	Tuberkulosefreien	173	„
„	185	Zweifelhaften	114	„

Häufigkeit der latenten Tuberkulose nach dem Lebensalter.

Altersgruppen: 1—3, 3—6, 6—12 Monate; 1—2, 2—4, 4—6, 6—10, 10—14, über 14 Jahre

% 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 0

3%, 2%, 13%, 17%, 35%, 55%, 70%

Fig. 8.

Von den klinisch Tuberkulösen reagierten also 94,3 %, von den klinisch Tuberkulosefreien 18,4 %; dabei ist zu bemerken, daß das hier verarbeitete Material größtenteils Erwachsene betrifft.

Übereinstimmung der prozentuellen Tuberkulosehäufigkeit nach Sektionsbefund und Reaktion.

Ich habe 988 kutane Untersuchungen nach dem Lebensalter in denselben Altersgruppen zusammengestellt, wie sie von MÜLLER, HAM-

burger und Sluka zur Darstellung der Sektionsresultate von Kindern gewählt waren (Fig. 7).

Es ergibt sich hier ein nahezu gleichmäßiger Anstieg bis zu 90%; diese Zahlen sind mit dem Sektionsmateriale Hamburgers*) zu vergleichen, welches aus 848 Fällen ähnlicher Provenienz besteht. Wir finden einen parallelen Anstieg; daß die Zahlen bei Hamburger durchweg größer sind, erklärt sich daraus, daß die tuberkulösen Kinder derselben Altersklasse häufiger zur Sektion kommen als die Nichttuberkulösen, da ja die Tuberkulose als Todesursache eine sehr bedeutende Rolle spielt. (Fig. 9, die beiden oberen Linien.)

Noch mehr Bedeutung messe ich den unteren Linien auf Fig. 9 zu, welche das Obduktionsresultat von Tuberkulose als Nebenbefund mit den Fällen von Reaktion ohne nachweisbare Tuberkulose vergleichen.

Häufigkeit der Tuberkulose.

Vergleich der aus den Sektionsergebnissen gewonnenen Prozentzahlen Hamburgers mit meiner aus der Tuberkulinprobe aufgestellten Statistik.

Fig. 9.

✳—✳ Hamburger, ● — ● Pirquet: Prozentzahl d. Tuberkulösen unter allen Fällen; +—+ Hamburger, ○—○ Pirquet: lat. Tuberkulose.

Das wichtigste Ergebnis des Vergleiches ist, daß die Tuberkulose in Sektion und Reaktion im ersten halben Jahre zu den Ausnahmen gehört.

Von 147 Kindern der ersten drei Lebensmonate reagierte keines, von 64 Kindern des dritten bis sechsten Monates drei.

Seither sind mir noch durch Sperk 159 Untersuchungen von Kindern des ersten Vierteljahres mitgeteilt worden, die sämtlich negativ

*) F. Hamburger, Wiener klin. Wochenschr. 1907, 36.

ausfielen. — Einen ähnlichen Prozentsatz fanden FEER[18]), RIETSCHEL[64]), ARONADE[119]). FALUDI[107]) untersuchte 195 Neugeborene, die alle negativ waren, während von den Müttern 126 positiv reagierten. Nur die Angaben von ENGEL und BAUER[65]) sind abweichend.

Der Anstieg der latenten Tuberkulose erfolgt wieder bei den Sektionsfällen etwas rascher — gegen Ende des Kindesalters stimmen aber die Zahlen auffällig überein.

Übereinstimmung der kutanen und konjunktivalen Reaktion mit der Fieberreaktion nach Injektion von Tuberkulin und unter einander.

Aus dem hohen Prozentsatz latenter Tuberkulose bei Erwachsenen (NÄGELI) ist a priori zu sagen, daß eine qualitative Reaktion auf den Bestand von Tuberkulose nicht viel praktische Bedeutung haben wird, es wäre denn, daß die Empfindlichkeit der Reaktion in einem bestimmten Verhältnis zur Ausdehnung oder Frische der Herderkrankung stünde, so daß man auf die Größe oder die Akuität der tuberkulösen Affektion einen Schluß ziehen konnte.

Dies wird seitens der CALMETTEschen Schule von der Ophthalmoreaktion bei Erwachsenen angenommen. Aus der Statistik PETITS[115]) ist zu entnehmen, daß klinisch gesunde Erwachsene in einem viel geringeren Prozentsatz auf die erste konjunktivale Einträufelung reagieren, als auf die kutane oder Injektionsprobe. MAININIS[122]) Vermutung, daß die Conjunctiva die Reaktionsstoffe bei ihrem rascheren Stoffwechsel nicht so lange behält und daß somit die konjunktivale Reaktion nur aktive Herde anzeigt, die beiden anderen Proben auch inaktive, muß erst an einem größeren Sektionsmateriale bewiesen werden.

Bei Kindern besteht nach meinen Untersuchungen kein prinzipieller Gegensatz zwischen kutaner und konjunktivaler Reaktionsfähigkeit.

Eine Reihe von Autoren hat schon den Versuch unternommen, Nachprüfungen der kutanen durch die Injektionsprobe oder Vergleiche zwischen den drei Proben anzustellen. Hierbei hat sich fast durchweg ergeben, daß die Fieberprobe bei positiver Haut- oder Schleimhautreaktion ebenfalls positiv ausfällt. Das früher eingeträufelte Auge reagiert dann gewöhnlich mit, gelegentlich auch kutane Insertionsstellen.

Dabei bestehen aber zwei Schwierigkeiten. 1. Die erste Tuberkulindarreichung erhöht die Reaktionsfähigkeit des Körpers, ihr Ausfall darf nicht mit einer späteren Erprobung einer anderen Methode verglichen werden.

Man muß also die Proben gleichzeitig ausführen, um gleiche Verhältnisse und eine gleiche Empfindlichkeit anzutreffen.

So ist z. B. der Schluß von LEMAIRE unrichtig, daß das Tuberkulin des Institutes Pasteur in Paris kräftiger wirke als das von CALMETTE, weil eine Anzahl Personen, die vorher mit dem CALMETTEschen Präparat geprüft worden waren, später mit dem PASTEURschen einen größeren Prozentsatz von Reaktionen ergaben.

2. Kutane, konjunktivale und febrile Reaktionsfähigkeit sind nicht absolute Begriffe, sondern sind wesentlich von der Konzentration der angewendeten Tuberkulinlösung abhängig. Wenn man die kutane Reaktion mit einer Reihe progressiver Verdünnungen ausführt, so erscheint nur ausnahmsweise eine positive Reaktion bei der Verdünnung 1 : 1000, selten bei 1 : 100, die meisten Fälle reagieren nur bis 1 : 10, einzelne nur

bei konzentriertem Tuberkulin. Ganz ähnlich verhält es sich mit den beiden anderen Proben, nur können wir hier die Verhältnisse nicht so klar übersehen, weil wir die Verdünnungen nicht nebeneinander ausprobieren können und bei zeitlicher Aufeinanderfolge, wie wir früher gesehen haben, die Reaktionsfähigkeit sich ändert. Die von vielen Autoren angegebenen Differenzen entstehen vielfach dadurch, daß zu den verschiedenen Methoden Lösungen verwendet wurden, welche quantitativ nicht äquivalent sind.

Die Untersuchungen von Ferrand und Lemaire[69]), welche alle drei Methoden umfassen, wurden mit Injektion von 0,2 mg Tuberkulin und nicht genau angegebener Dosierung der kutanen und konjunktivalen Lösungen ausgeführt.

17 kutan negative Fälle konjunktival geprüft: 13 negativ, 3 positiv
32 „ positive „ „ „ 16 „ 16 „

9 kutan negative Fälle mit Injektion geprüft: alle negativ. 31 kutan positive Fälle injiziert: 25 positiv, 5 negativ, einer zweifelhaft.

Alle drei Proben wurden an 32 Kindern ausgeführt: 20mal stimmten alle überein, 11mal nur kutane und Fieberreaktion bei abweichender konjunktivaler Reaktion.

Die Autoren ziehen daraus den Schluß auf eine Identität zwischen kutaner und Fieberreaktion, den ich unter Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse für richtig halte.

Statistische Vergleiche zwischen der prozentuellen Häufigkeit der kutanen und der Fieberreaktion sind bisher nur für Erwachsene aufzustellen.

Meine Werte von 90% für alle Spitalkranken und von 70% für die klinisch nicht tuberkulösen Spitalbewohner stimmen sehr gut mit den Erfahrungen, welche bei Injektion von Tuberkulin gewonnen werden. Franz sah unter 400 Soldaten eines bosnischen Infanterieregimentes 61% positiver Erfolge (Wiener mediz. Wochenschrift 1902, 36), bei weiteren 400 Rekruten desselben Regimentes 68%, bei Rekruten eines ungarischen Regimentes, in dem Tuberkulose nur selten vorkommt, 38% Reaktionen. (Briefliche Mitteilung).

Die meisten Tuberkulösen haben eine derartige Empfindlichkeit gegen Tuberkulin, daß sie auf unverdünntes Tuberkulin bei kutaner Anwendung reagieren; es gibt aber unterempfindliche Individuen. Diese können bei kutaner Prüfung negativ sein, bei Injektion relativ höherer Dosen aber reagieren.

Um auch diese schon beim erstenmal zur Reaktion zu bringen, müßte man das Tuberkulin in konzentrierterer Form anwenden. Hier begrenzt sich die Leistungsfähigkeit der kutanen Probe gegenüber den beiden anderen Untersuchungsarten.

Eine Injektion mit unverdünntem Tuberkulin würde wahrscheinlich alle Tuberkulösen mit Ausnahme der systematisch behandelten Fälle auf das erstemal zur Reaktion bringen — die Dosis ist aber deshalb nicht anwendbar, weil sie für die meisten Untersuchten schwere Folgen nach sich ziehen würde. Um dies zu vermeiden, müssen wir eine Anfangsdosis wählen, die unter dem Niveau der kutanen Äquivalenz liegt. Dasselbe gilt von der konjunktivalen Applikation. Einträuflung von konzentriertem Tuberkulin würde eine Reihe von Fällen schon das erstemal als tuberkulös entlarven, aber dafür bei vielen anderen schwerste Konjunktivitis verursachen.

Zur Orientierung über die Empfindlichkeit dient uns also weitaus am besten die kutane Anwendung. Als zweiter Probe können wir uns einer der beiden anderen Methoden bedienen. Da aber unterdessen die Empfindlichkeit zu steigen pflegt, so kommen wir gewöhnlich mit einer nach einigen Tagen wiederholten Kutanimpfung aus.

Für die Anwendung bei Tieren ist die Sachlage eine andere: hier brauchen wir die Konjunktivitis nicht zu scheuen und werden mit Einträuflung konzentrierten Tuberkulins ins Auge bequemer und rascher zur Diagnose gelangen, als mit kutaner Impfung.

Besprechung einer Reihe offener Fragen.

Durch den Nachweis, daß das Tuberkulin auf der gesunden Hautstelle eines tuberkulösen Menschen entzündliche Reaktion verursacht, die mit der Fieberreaktion analog ist, sind alle Theorien hinfällig geworden, welche den tuberkulösen Herd als Ausgangspunkt und Ursache der Tuberkulinreaktion annahmen. Schick und ich haben schon vor fünf Jahren aus der Analogie der Tuberkulinreaktion mit der sofortigen Reaktion bei Serumkrankheit und Vaccine den Schluß gezogen, daß alle diese Reaktionen und speziell die Tuberkulinreaktion auf dem Vorhandensein von Antikörpern beruht, welche in Verbindung mit dem neueingeführten Gifte entzündliche Erscheinungen geben.

Wir beschränkten uns auf die Feststellung, daß das Zusammentreffen von Toxin und antikörperhaltigen Produkten des Organismus die krankhaften Erscheinungen hervorrufen, ohne auf eine nähere Erklärung des Vorganges einzugehen.

Eine große Reihe von ungelösten Fragen tritt uns hier entgegen. Sind diese Reaktionsprodukte an die Zelle gebunden? Oder in den Säften gelöst? Oder in den Leukozyten enthalten? Inwieweit haben die Komplemente Einfluß? Wann ist der exakte Zeitpunkt ihres Auftretens nach der Infektion?

Inwieweit ist die positive Reaktion an den makroskopischen oder histologischen Befund von Tuberkulose geknüpft? Bei der Allergie gegen Serum, finden wir gar kein anatomisches Substrat, bei der Vaccine sind die Hautnarben wahrscheinlich ganz unwichtige Reste. Auch bei der Tuberkulose wäre es möglich, daß die Überempfindlichkeit durch Gifte ohne lokale Erkrankung zustande kommen könnte.

Praktisch am wichtigsten ist hier die Frage, ob die Tuberkulinprobe an sich Empfindlichkeit gegen eine spätere Tuberkulindarreichung hervorruft, ob die „sekundäre Reaktion" auch ohne tuberkulöse Erkrankung des Organismus zustande kommen kann. Diesbezüglich liegen wohl schon eine Anzahl von Beobachtungen und Anschauungen[78, 116, 120, 122]) vor, spruchreif ist die Sache aber noch nicht.

Wird die Allergie bei der natürlichen Infektion durch die Aufnahme der Bazillen bewirkt, ohne daß diese pathologisch-anatomische Reaktionen hervorgerufen haben oder geht die histologische Reaktion mit der kutanen Reaktionsfähigkeit Hand in Hand? Auf Grundlage der Vaccine glaube ich das letztere. Ich konnte dort zeigen, daß „schlafende Keime" ohne makroskopische Weiterbildung und ohne allergisierende Wirkung in der Haut verweilen können; bei der Tuberkulose wäre Gelegenheit geboten, die Sache auch histologisch zu verfolgen. Das wäre besonders für die Theorien v. Behrings und Baumgartens die einzige Lösung, da sich im Säuglingsalter weder histologisch noch durch die Reaktion Tuberkulose

kundgibt. Eine weitere Frage betrifft das lymphoide Stadium Bartels: ist es von Allergie begleitet?

Wovon ist die Intensität der Reaktion abhängig? Im allgemeinen scheinen frische Tuberkulosen stärker zu reagieren. Die Intensität ist aber auch von lokalen Verhältnissen beeinflußt. Quantitative Versuche an mir selbst ergaben, daß die Haut meines linken Unterarmes, die vielfach zu Experimenten benützt worden war, bei 1000facher Tuberkulinverdünnung noch reagierte, während am rechten Unterarme die Verdünnung 1 : 100 schon negativ war. Hierher ist auch die lokale Überempfindlichkeit des eingeträufelten Auges zu rechnen, die viel rascher steigt als die des anderen Auges (Kohn[116]). Eine Beeinflussung der Reaktionen durch Vermischung des Tuberkulins mit dem Serum eines reagierenden Menschen gelang nicht[67]). Negative und positive Fälle verhielten sich ganz gleich, ob nun das Tuberkulin mit Kochsalzlösung, aktivem oder inaktiviertem Serum verdünnt war. Unklar sind auch noch die Bedingungen der Abnahme der Reaktionsfähigkeit. Tatsache ist, daß die Reaktionen im Laufe der Miliartuberkulose in eigentümlicher Weise abnehmen. Der Durchmesser nimmt nämlich weniger ab als die Hyperämie und Exsudation. Man sieht farblose Papeln oder flache schwache Rötungen, später oft nur einen lividen Fleck; endlich bleibt jede Reaktion aus. Ist dieses Erlöschen ein Mangel oder ein Überschuß an Antikörpern? Bei dem Fehlen der kutanen Reaktion nach Injektion großer Dosen von Tuberkulin[5, 25]) ist die Annahme einer Absorption der Antikörper die naheliegendste. Andererseits gibt es wahre Tuberkulinimmunität: nach konsequenter Injektion von Tuberkulin mit ansteigenden Dosen erreichte Unempfindlichkeit gegen Tuberkulininjektion bedingt auch eine negative Kutanreaktion[93, 112, 119]).

Sehr eigentümliche Verhältnisse, auf die ich wie auf die übrigen hier nur lose aufgerollten Fragen in einer ausführlichen Arbeit zurückkommen werde, finden sich im Verlaufe der Masern. Hier sah ich mehrmals das Erlöschen der Reaktionsfähigkeit während der Prodromalzeit. Einige Tage nach Ausbruch des Exanthems trat sie wieder ein. Die Beobachtung von Preisich[109]), daß tuberkulöse Masernkranke die Reaktion vermissen lassen, gehört wohl in dieses Kapitel.

Andererseits ist im Verlaufe des Typhus die Ophthalmoreaktion auffallend häufig positiv[100, 116]).

Soviel ist sicher, daß auf diesem Gebiete noch eine unendliche Reihe von Fragestellungen für den Kliniker und für den Laboratorumsarbeiter zu finden sind.

Indikationen der verschiedenen Methoden. Soll man jeden Patienten auf sein Verhältnis zur Tuberkulose prüfen? Ich glaube daß in der Praxis die Probe nur dann ausgefürt werden sollte, wenn von ihrem Ausfalle irgend eine praktische therapeutische oder soziale Maßnahme abhängig gemacht werden kann, oder wenn die Aufstellung einer exakten Prognose wünschenswert erscheint.

Etwas anderes ist es mit der Ausführung der Probe in der Klinik. Hier ist die wissenschaftliche, möglichst genaue Erkenntnis des Status präsens maßgebend; ich glaube, daß die Tuberkulinprobe in einigen Jahren in den Kinderspitälern ebenso zu dem feststehenden Formulare gehören wird, wie jetzt die Harnuntersuchung.

Ebensoviel halte ich von der hygienischen Anwendung der Tuberkulinprobe in geschlossenen Lehranstalten. Die Ausschaltung aller Tuberkulösen unter den Erwachsenen ist sozial unmöglich, unter den

Kindern aber um so besser durchführbar, je früher die Trennung beginnt. Unter den positiv Reagierenden sind wohl sicher auch Individuen mitbetroffen, welche tatsächlich nicht infektiös sind; aber eine Abtrennung der sicher Infektiösen durch Lungenbefund und Sputumuntersuchung ist noch viel willkürlicher. Die Gefahr, daß schwer tuberkulöse Fälle durch den Mangel an Reaktionsfähigkeit unter den Gesunden bleiben, ist gering, da man diese ja schon anderweitig als tuberkulös erkennt. Eine Schwierigkeit liegt bisher hauptsächlich in der Stellung der sekundär Reagierenden.

Engere Wahl zwischen konjunktivaler und kutaner Probe.

Kontrainjiziert ist die Augenreaktion bei allen Personen mit geröteter Bindehaut, die Hautprobe nur bei Erwachsenen mit torpiden tuberkuloseverdächtigen Hauterkrankungen. Hier kann man, um keinen neuen Herd zu setzen, das Tuberkulin nach dem Vorgange NAGELSCHMIDTS[76]) auf dem fraglichen Krankheitsherde selbst versuchen.

Für Kinder halte ich die kutane Probe unbedingt für besser: das Kind erträgt die Impfung viel ruhiger als die Instillation in die Konjunktiva. Der Arm läßt sich auch bei ungebärdigen Kindern leicht durch einige Minuten festhalten, während im Auge das Zusammenpressen der Lider und der Tränenfluß die Sicherheit der Reaktion stört. Außerdem kommt bei Kindern hohe Empfindlichkeit häufig vor, welche im Auge auch bei der Anwendung sehr verdünnten Tuberkulins unangenehme Lokalerscheinungen gibt, während sie auf der Haut sich nur in einer starken Ausdehnung der Papel äußert.

Bei Erwachsenen ist die konjunktivale Reaktion sicher bequemer auszuführen. Zu empfehlen ist sie für das Tierexperiment, wo man eine starke Konjunktivitis nicht zu scheuen hat und stärkere Lösungen verwenden kann.

Schlußsätze.

Entzündliche Erscheinungen an Haut oder Schleimhaut nach Applikation von Tuberkulin bedeuten, daß der Organismus schon mit Tuberkulose in Berührung gekommen ist: positive Frühreaktion nach der ersten kutanen oder konjunktivalen Probe beweist eine vorausgeganene Infektion.

Negative Reaktion bedeutet im allgemeinen, daß der Organismus noch keine Infektion erlitten hat; sie kann aber auch durch relative Unempfindlichkeit auf die angewandte Dosis oder durch andere Umstände bedingt sein.

Die Bedeutung der positiven Reaktionen, welche erst spät oder nach wiederholter Ausführung der Proben auftreten (torpide und sekundäre Reaktionen) ist noch nicht völlig geklärt; nach meiner Meinung sind sie durch die Anregung einer früher bestandeuen Reaktionsfähigkeit, also in letzter Linie auch wieder durch eine vor längerer Zeit vorausgegangene Infektion bedingt.

Literatur.

Bei den nicht im Original benützten Artikeln ist die Quelle der Einsichtnahme vermerkt. „Ref. Petit" bezieht sich auf die zusammenfassende Arbeit Léon Petits[115]) über die Ophthalmoreaktion.

1) Pirquet, v., Klinische Studien über Vaccination und vaccinale Allergie. Wien, Deuticke. April 1907.
Nur der schon früher einmal Vaccinierte gibt bei Impfung Reaktion innerhalb 24 Stunden; diese Fähigkeit zur Frühreaktion beginnt während des Vaccinefiebers und hält mehrere Jahre an. In analoger Weise reagiert der Tuberkulöse auf kutane Einimpfung von Tuberkulin mit Bildung einer Papel von 5—20 mm Durchmesser. „Die Allergie in Form der auf kutane Einimpfung folgenden Frühreaktion ist bei Vaccine, Variola, Tuberkulose und wahrscheinlich auch bei einer Reihe anderer Infektionskrankheiten diagnostisch zu verwerten."

2) Ders., Tuberkulindiagnose durch kutane Impfung. (Sitzung der Berliner med. Gesellschaft vom 8. Mai.) Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 20 und 22.
Fast alle Fälle von klinischer Tuberkulose bei Kindern reagieren auf Tuberkulin mit Papelbildung an der Impfstelle. Negativ sind die Kachektischen und die Fälle von Miliartuberkulose und Meningitis im letzten Stadium. Diagnostischen Wert hat die Probe hauptsächlich im ersten Lebensalter, da mit der Zunahme des Alters die Reaktion immer häufiger wird, dadurch, daß die meisten Menschen im Laufe des Lebens mit Tuberkulose infiziert werden.
15. V. Demonstration und Bericht über 23 Sektionen und 360 genau registrierte Fälle. Methode: Bohrung am Arme, 25% Alttuberkulin.

3) Baginsky, Ebendaselbst, 15. Mai. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 22.
Demonstriert mehrere Kinder mit Hautreaktionen, bestätigt im allgemeinen die Angaben v. Pirquets, glaubt aber auf Grund eines Falles, daß die Tuberkulininjektion schärfere Resultate gibt.

4) Wolff-Eisner, Ebendaselbst, 15. Mai. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 22.
Hat auf Anregung v. Pirquets dessen Angaben nachgeprüft, welche er im wesentlichen bestätigt, und außerdem zahlreiche verschiedenartige Versuche angestellt. Die kutane Reaktion läßt sich mit einer Anzahl von Tuberkulinpräparaten erreichen; am schwächsten wirkt Neutuberkulin. Er hat neben kutaner und Injektionsprobe auch konjunktivale Einverleibung von 10% Tuberkulin angewandt, auf welche er durch seine Heufieberversuche gelenkt war. Die drei Methoden geben nicht ganz identische Resultate. Bei Erwachsenen hat die kutane Reaktion wenig diagnostischen Wert, weil viele Gesunde sie geben, fast sämtliche Phthisiker im dritten Stadium sie aber vermissen lassen; dafür ergibt sich jedoch die Möglichkeit, sie zur Prognose zu benutzen.

5) Vallée, Acad. des sciences 1907, 3 Juni.
Auch bei tuberkulösen Rindern, Pferden, Meerschweinchen ruft das Tuberkulin nach Skarifikation der Haut typische Reaktion hervor, für die er den Namen Cutireaktion vorschlägt. Sie wird bei gleichzeitiger Injektion von Tuberkulin undeutlich, ebenso bei längerer Fortsetzung der Einimpfung. Analog gibt das Malleïn bei rotzigen Pferden typische Hautreaktionen.

6) Pirquet, v., Die Allergieprobe zur Diagnose der Tuberkulose im Kindesalter. (Sitzung der päd. Sektion der Gesellschaft für innere Medizin und Kinderheilkunde in Wien vom 6. Juni 1907.) Wiener med. Wochenschr. 1907, Nr. 28.
Prinzipielle Analogie der Frühreaktion bei der Serumkrankheit, der Vaccination und der Tuberkulose. Arten der Tuberkulinreaktion: Herd, Fieber und Einstichreaktion, zu welcher jetzt als neues, paralleles Glied die kutane Reaktion bei Impfung tritt. Fehlen der Allgemeinerscheinungen. Beschreibung von Methode und Reaktionsformen. Frühzeitige und torpide Reaktion. Bei 79 Fällen von sicherer Tuberkulose fehlte die Reaktion nur prämortal. Tabelle über die Häufigkeit der primären Reaktion nach dem Lebensalter und Vergleich mit Sektionsergebnissen. Anregung zur Ausschaltung der Tuberkulösen aus Kinderspitälern und Schulen, zur Erkenntnis des primären Stadiums der Tuberkulose mittels der kutanen Probe.

7) Escherich, Diskussion zum Vortrage v. Pirquets. Ebendaselbst.
Er weist auf die ähnliche Bedeutung der Einstichreaktion bei subkutaner Injektion hin, auf welche Epstein und er zuerst die Aufmerksamkeit gelenkt hatten.

8) Moser, Diskussionsbemerkung. Ebendaselbst. Berichtet über 120 kutane Proben, das Ergebnis der Untersuchungen und insbesondere 28 Sektionsresultate stimmen vollständig mit den Angaben v. Pirquets. Er macht den Vorschlag, die Probe zur Beurteilung der Frage zu verwenden, ob Müttern oder hauptsächlich Ammen das Stillen erlaubt werden soll.

9) Pfaundler, Münchener Gesellschaft für Kinderheilkunde, 14. Juni. Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 26.
Demonstration von Hautreaktionen. Bei einem Kinde entstand nach der Impfung eine skrofulodermähnliche Hautveränderung. Ein anderes Kind zeigte nach der Impfung eine Conjunctivitis phlyktaenulosa. Er schließt daran theoretische Erörterungen über das Wesen der Skrofulose, deren Erscheinungen durch eine aquirierte Überempfindlichkeit gegen das Tuberkulosegift zu erklären sei.

10) Moro, Ebendaselbst.
Die Phlyktaenenbildung sei eine selbständige Nebenreaktion der Hautimpfung. Sobald die lädierte Epidermis irgendwo mit dem Tuberkulosegift in Berührung tritt, können auch ferngelegene Bezirke (Haut, Conjunctiva) bei lokaler Überempfindlichkeit mit reagieren.

11) Sicard, Soc. méd. des Hop. in Paris, 14. Juni.
Hat im Verein mit Descomps die Cutireaktion bei 27 Kranken versucht. Frische Tuberkulosen reagierten mit Ausnahme von 2 Fällen stark positiv, Kavernen fast oder ganz negativ.

12) Calmette, Sur on nouveau procédé de diagnostic de la tuberculose chez l'homme par l'ophthalmoréaction à la tuberculine. Acad. des sciences, 17. Juni.
Bei 25 Patienten, von denen 16 tuberkulös waren, hat er die Einträufelung einer $1^0/_0$igen Lösung eines alkoholischen, glyzerinfreien Präzipitates von Tuberkulin in den Bindehautsack angewendet und die Reaktion näher studiert. Er empfiehlt sie unter dem Namen Ophthalmoreaktion. Sie habe vor der Cutireaktion hauptsächlich diesen Vorteil, daß sie schon nach ungefähr 18 Stunden das Maximum erreiche.

13) Vallée, H., Ebendaselbst, 17. Juni.
Konjunktivale Reaktion mit $10^0/_0$ Rohtuberkulin bei tuberkulösen Tieren ist leichter auszuführen als die Hautreaktion, hat aber den Nachteil, daß sie rascher verschwindet und durch andere Maßnahmen vorgetäuscht werden kann.

14) Dufour, Soc. méd. des Hop., 21. u. 28. Juni.
Die kutane Reaktion bei 28 Kindern ergab nur sehr mangelhafte Übereinstimmung mit dem klinischen Befunde.

15) Burnet, Soc. de Biol., 22. Juni.
Demonstriert kutane Reaktionen an seinem Arme und histologische Präparate von Meerschweinchen. Unter dem Schorfe fänden sich viele polynukleäre Leukocyten; das Tuberkulin übe also positive Chemotaxis aus.

16) Arloing, F., Soc. de Biolog., 22. und 29. Juni.
Hat bei tuberkulösen Tieren die Cutireaktion mit verschiedenen Tuberkulinen und mit dem Serum eines tuberkulösen Menschen versucht, aber keine irgendwie verwertbaren Resultate erreicht.

17) Letulle, Soc. de Biolog., 22. Juni.
Bei 66 Tuberkulösen fiel die nach Calmette mit $1^0/_0$igen Tuberkulin angestellte Ophthalmoreaktion 66 mal positiv aus. Er unterscheidet drei Grade der Intensität, welche mit der Ausdehnung der Lungenaffektion nicht übereinstimmt. Mehrmals fanden sich sehr starke, aber immerhin rasch vorübergehende Symptome.

18) Feer, Naturhistorisch-medizinischer Verein München, 25. Juni. Münchener med. Wochenschr., 24. Sept. 1907.
Kutane Probe bei 46 Kindern; alle Fälle mit Tuberkulose waren positiv.

19) Letulle, Soc. med. des Hop., 28. Juni.
Bei 75 Tuberkulösen ergab die Methode Calmettes 72 positive Resultate, von 50 nicht Tuberkulösen waren 31 negativ.

20) Sicard und Descomps, Soc. med. des Hop., 28. Juni.
Sukzessive Anstellung von Injektion, kutaner und konjunktivaler Probe ergab widersprechende Resultate; nur die letztere sei klinisch verwertbar.

21) Chaillous, Soc. d'ophthalmothérapie de Paris, Juli (Ref. Petit).
Ein Fall von Differentialdiagnose durch konjunktivale Probe.

22) Brunetière, Gaz. hebdom. des sc. méd., Bordeaux, Juli (Ref. Petit).
Drei okulistische Fälle mit Ophth.-R. untersucht.

23) Sabrazès et Dupérié, Ebendaselbst (Ref. Petit).
Im Sekrete bei Ophth.-R. findet sich Schleim und polynukleäre Leukozyten, niemals Bakterien.

24) Vallée, Soc. de Biolog., 6. Juli.
Arloing habe deshalb keine Reaktionen gesehen, weil er die Haut zu oberflächlich geritzt habe.

25) Mainini, Ärztl. Verein in München, 10. Juli. Berliner klin. Wochenschr., 7. Okt.
Bei 39 Patienten verlief die Hautreaktion ungefähr entsprechend den Angaben von Pirquets; allgemeine Reaktionen wurden nicht beobachtet. Eine vorhergehende Tuberkulininjektion schwächt die kutane Reaktion ab.

26) Noeggerath, Gesellschaft der Charité-Ärzte, 11. Juli.
Hat 100 Fälle kutan untersucht; die kutane Reaktion stimmt mit klinischem Befunde, Fieberreaktion und Agglutination nicht genügend überein, um zur Diagnose verwertbar zu sein.

27) Comby, Soc. méd. des Hop., 12., 19., 26. Juli.
Die Ophthalmoreaktion mit 1 %iger Lösung des präzipitierten Tuberkulins macht manchmal sehr unangehme Symptome. Mit ½ %iger sei die Probe ungefährlich und doch vollkommen sicher.

28) Abrami et Burnet, Soc. de Biol., 13. Juli.
Kutane Reaktion bei 47 Erwachsenen ergab keine klaren Resultate.

29) Calmette, Breton, Painblan et Petit, Presse médicale, 13. Juli.
321 Beobachtungen mit Ophthalmoreaktion; alle klinischen Tuberkulosen positiv. Manchmal tritt die Reaktion verspätet auf, nach 12—24 Stunden.

30) Grasset et Reinbaud, Province médicale, 13. Juli.
Ophthalmoreaktion bei 31 Fällen.

31) Derscheid, Journal med. de Bruxelles 1907, Nr. 29. 17. Juli.
Ophthalmoreaktion mit 1 % gefälltem Tuberkulin. Positiv bei 9 Tuberkulösen, negativ bei 11 Nichttuberkulösen. Keine Nebenerscheinungen.

32) Guérin et Delattre, Bull. de la Soc. de Med. vét., 18. Juli. (Ref. Petit.)
Bei tuberkulösen Rindern schöne Ophthalmoreaktion, welche bei nachträglicher Injektionsprobe nochmals auftritt.

33) Moussu, Ebendaselbst. (Ref. Petit.)
Bestätigt die Beobachtungen von Vallée.

34) Dufour et Bruslé, Soc. méd. des Hop., 19. Juli.
30 Fälle von Cuti- und Ophthalmoreaktion. Im Anschluß an die Cutireaktion entstand einmal ein ekzematöser Fleck an der Impfstelle, einmal trat in der Lumbalregion ein zosterartiger Ausschlag auf. Bei älteren Kindern sei die Reaktion nicht spezifisch, wahrscheinlich wirke dort das Tuberkulin an sich als Reiz.

35) Montagnou, Province med., 20 Juli. (Ref. Petit.)
Bei 33 Kranken Ophthalmoreaktion, in 19 Fällen positiv; bei Kachektischen negativ.

36) Chantemesse, Acad. de méd., 23. Juli.
Alkoholisches Präzipitat von Typhustoxin in der Lösung von 1:2500 in die Conjunctiva getropft, bewirkt beim Typhösen eine Rötung und Sekretion, die nach 6—12 Stunden ihr Maximum hat, nach 24 Stunden charakteristisch, nach 2—3 Tagen noch erkennbar ist. Beim Gesunden hört die Irritation schon nach 5 Stunden auf.

37) Citron, Berliner med. Gesellschaft, 24. Juli.
Ophthalmoreaktion bei 80 Fällen mit Höchster Alttuberkulin in 1 %iger Verdünnung. Von 31 Tuberkulösen reagierten 25, von 45 Nichttuberkulösen nur ein einziger. Die Erscheinungen treten später ein als Calmette angibt, sind am deutlichsten nach 12—24 Stunden.
Die kutane Reaktion sei bei Erwachsenen wertlos, die Ophthalmoreaktion, welche auf einer lokalen Antikörperbildung beruhe, vorzüglich.

38) Lépine, Soc. de Biol., 27. Juli.
Ophthalmoreaktion bei 24 Geisteskranken trat ein, wo sie klinisch erwartet war.

39) Marie et Bourilhet, Soc. de Biol., 27. Juli.
Ophthalmoreaktion bei 40 Geisteskranken. Einer zeigte darauf ein allgemeines Exanthem.

40) Arloing, Soc. de Biol., 27. Juli. Polemik gegen Vallée (24).

41) Putzeys et Stiennon, Soc. de Biol., 27. Juli.
Bei rotzigen Pferden wurden Cuti- und Ophthalmoreaktion mit Malleïn geprüft; keine verwertbaren Resultate.

42) Slatinéano, Soc. de Biol., 27. Juli.
Gesunde Menschen reagieren kutan stärker als die tuberkulösen; aber bei tuberkulösen Meerschweinchen schöne Reaktionen.

43) Calmette, Acad. des sciences, 29. Juli.
Die Ophthalmoreaktion ist viel genauer als die kutane; läßt sich zur Ausschaltung der tuberkulösen Kinder, zur Auswahl der Heilbaren und zur Konstatierung der Ausheilung verwenden.
Die Conjunctiva ist die einzige Schleimhaut, welche auf Tuberkulin reagiert.

44) Bazy, Soc. de Chir., Paris, 31. Juli, referiert Semaine médicale, 7. August.
Fand unter 20 chirurgischen Tuberkulosen nur vier intensive Ophthalmoreaktionen.

45) Guérin, Rev. de méd. vétér. d'Alfort, August (Ref. Petit) wie 32.

46) Moro und Doganoff, Zur Pathogenese gewisser Integumentveränderungen bei Skrofulose. Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 31. 1. August.
Im Anschluß an die Tuberkulinimpfung zeigte sich bei einem Kinde mit Lupus eine chronische, skrofulodermähnliche Veränderung der Impfstelle; bei 3 Kindern trat 10—16 Tage nach der Impfung Conjunctivitis fliktenulosa auf, bei einem davon gleichzeitig ein allgemeiner Lichen scrofulosorum. Bei skrofulösen Kindern wird die kutane Reaktion durch eine vorhergegangene Tuberkulininjektion nicht verhindert.
Darauf bauen die Autoren eine Theorie der Skrofulose: Bei dieser besteht neben allgemeiner eine intensive lokale Antikörperbildung, deren Reaktion mit Tuberkulin oder tuberkulotoxinhaltigen Sekreten die skrofulösen Erscheinungen, wie die Fliktenen, verursacht.
Auch durch Einreibung von Tuberkulin (als Salbe mit Lanolin $\widehat{aa}$) kann man bei Skrofulösen lichenartige Hautreaktionen erzeugen.

47) Mouton, Medicina contemporanea, 4. August, Lissabon (Ref. Petit).
Bei 41 Kindern Ophth.-R., negativ bei einer vereiterten Coxitis und einer moribunden Tuberkulose.

48) Aubaret et Lafon, Gaz. hebd. de méd. de Bordeaux, 4. August (Ref. Petit).
Ophthalmologische Kasuistik der konjunktivalen Probe.

49) Oppenheim, M., Über Hautveränderungen Erwachsener im Anschlusse an die Pirquetsche Reaktion. Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 32. 8. August.
Bei einem Patienten mit Lichen scrofulosorum entstand um die Impfstelle ein Kreis lichenartiger Knötchen, bei einem anderen mit Skrofulose eine torpide kleine Ulzeration. Die Reaktion erfolgt also im Sinne der individuellen skrofulösen Hauterkrankung, während andere Tuberkulöse mit freier Haut nur die normale Quaddelreaktion zeigten.

50) Soulié, Bulletin médical, 14. August (Ref. Petit).
Bei 50 Krank. Ophth.-R. 34mal positiv. Zwei fortgeschrittene Phthisiker negativ.

51) Uriarte, Semana medica 33 (Ref. Petit).
Bei 116 Tuberkulösen Ophth.-R.; negativ bleiben 6 Kachektische und ein unklarer Fall.

52) Aubaret et Magne, Journal de médic. de Bordeaux, 15. August (Ref. Petit).
Bei Wiederholung des Ophth.-R. erhält man verschiedenartige Resultate.

53) Calmette, Prophylaxie à la Tuberculose infantile par la recherche de l'ophthalmoréaction à la tuberculine. La clinique 1907. 16. August.
Die Ophthalmoreaktion ist zur Lösung hygienischer Anforderungen berufen, nämlich zur Elimination der latent Kranken, zur frühzeitigen Behandlung derselben, dann zur Klärung der Frage über die Heredität der Tuberkulose, der Disposition und der v. Behringschen Behauptung, daß die Tuberkulose durch die Kuhmilch übertragen werde.

54) Métraux, Rev. méd. de la Suisse romande, 20. August (Ref. Petit).
Bei 68 Kranken Ophth.-R.; 25 positiv, ein Kachektischer negativ.

55) Detre, L., Differentielle Tuberkulinreaktionen. Vortrag: Preßburg 27. August, Budapest 26. Okt. Orsovi Hetilap 10. Nov.
Die Bouillonfiltrate von Tuberkelbazillen enthalten thermolabile Stoffe, die während des Einengungsprozesses zu Alttuberkulin zugrunde gehen. Detre nennt sie nach Spengler Toxine im Gegensatz zu den im Alttuberkulin vorherrschenden Proteinen. Diese Toxine haben bei Injektion und bei Impfung eine sehr energische Wirkung, welche bei Filtraten von humanen und bovinen Bazillen nicht identisch ist.
Detre impft nun auf die Haut in folgender Weise: 1. Kochsches Alttuberkulin unverdünnt; 2. Humanfiltrat; 3. Bovinfiltrat, daneben Kontrollstelle und nimmt die Durchmesser der Papeln als Maßstab der Empfänglichkeit für den entsprechenden Giftstoff.

Er untersuchte in dieser Weise 110 Fälle von Tuberkulose. 4 fortgeschrittene Phthisen waren an allen Punkten negativ, bei 9 reagierte bloß Koch, in 70 Fällen daneben auch Humanfiltrat, in 9 Bovinfiltrat, in 22 beide Filtrate. Bovine Reaktionen kamen am häufigsten bei Knochen- und Hautfällen, insbesondere bei Kindern vor, am wenigsten bei Drüsentuberkulose, etwas häufiger bei Lungentuberkulose. Detre glaubt, daß die Reaktionen etwas spezifisches sind und bovine, bzw. humane oder gemischte Infektion beweisen. „Humane, bovine Type."

Ein zweiter Unterschied besteht in dem Verhältnis zwischen Filtraten und Alttuberkulin. Bei frischen oder frisch rezidivierenden Fällen entwickelt das jeweilig „dominierende" Filtrat stärkere Reaktionen als das Alttuberkulin „akute Type"; bei älteren Prozessen ist die Filtratempfindlichkeit gering „chronische Type". Frische Lungentuberkulose zeigte (18 von 24) die akute Type, über zwei Jahre alte (27 von 35) die chronische Type. Chirurgische Tuberkulosen zeigten alle „akute Type".

Bei frischen Infektionen sei der Körper gegen „Toxin" und „Protein" empfänglich, später bilde sich Immunität gegen das Toxin, während eine solche gegen die endotoxinartigen Proteine nur bei alten oder sehr ausgebreiteten Prozessen zustande komme.

56) Lesné et Marre, La clinique, 30. August (Ref. Petit).

Bei 63 Kindern Ophthalmoreaktion; von 36 klinisch Tuberkulösen war nur einer negativ, eine ausgeheilte Spondylitis.

57) Mongour et Laude, Bulletin médical, 4. September (Ref. Petit).

Bei 47 Kindern 14 positive Ophthalmoreaktionen.

58) Nicolle, Réaction à la tuberculine dans la lèpre. Acad. des sciences, August, ref. Sem. méd., 4. Sept. 1907.

Von drei Leprakranken reagierte einer kutan, einer konjunktival, beide sehr schwach. Das widerspricht der bisherigen Erfahrung, daß die Leprösen Fieberreaktion auf Injektion zu geben pflegen.

59) Eppenstein, H., Med. Klinik, 1907, Nr. 36.

Variierte die Methode von Calmette, indem er von stark verdünntem Tuberkulin (1 $^0/_0$ Höchst entspricht 0,2 $^0/_0$ Calmette) sukzessive zu 2 und 4 $^0/_0$ bis zur positiven Reaktion ansteigt.

Von 40 so geprüften Bazillenträgern reagierten alle bis auf einen, welcher übrigens nicht kachektisch war. 12 chirurgische Tuberkulosen reagierten schon bei 1 $^0/_0$; auch bei dieser Verdünnung zeigten sich an tuberkulösen Kindern unangenehm starke Erscheinungen: zweimal phlyktaenuläre Entzündungen, einmal eine leichte Keratitis. Von 76 klinisch tuberkulosefreien Menschen reagierten bei 1 $^0/_0$ keiner, 2 $^0/_0$ keiner, bei 4 $^0/_0$ drei; von den vier reagierenden hatten drei schon vorher Reizzustände der Conjunctiva.

60) Bandler und Kreibich, Naturforscherversammlung in Dresden, 16. Sept. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 40.

Von 26 Fällen mit Hauttuberkulose gaben 22 hochpositive Hautreaktion, vier kachektische mit Schleimhauttuberkulose behaftete Patienten waren negativ.

Bei nachheriger Injektion von Tuberkulin reagieren die Impfstellen mit. Bei einem Patienten mit Lupus und Lichen scroful. bildete sich auf Einreibung von Tuberkulin ein lichenartiger Ausschlag.

Histologisch finden sich Entzündungsherde in Cutis und Subcutis, die hauptsächlich aus einkernigen Infiltrationszellen bestehen, dabei epitheloide Zellen und einzelne nicht ganz typische Riesenzellen.

61) Pirquet, v., Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde. Dresden, 16. Sept. Verhandlungen der Gesellschaft und Med. Klinik 1907, Nr. 39.

Besprechung der bisherigen Literatur. Die Ophthalmodiagnose ist bequemer auszuführen, aber wegen des heiklen Applikationsortes nicht zu empfehlen. Quantitative Versuche mit Verdünnungen des Tuberkulins. Begriff der sekundären Reaktion. Praktische Anwendung an klinischen Beispielen.

Tabellen über 988 Fälle. Prozentische Häufigkeit der Tuberkulose überhaupt und der latenten Tuberkulose in den einzelnen Abschnitten des Kindesalters.

62) Langer, Diskussion. Verhandl. der Gesellschaft für Kinderheilkunde 1907.

Kutane Probe mit 25 $^0/_0$ Alttuberkulin, mittels eines kleinen scharfen Löffels, Kontrollstelle mit Wasser benetzt.

Unter 12 Kindern mit tuberkulöser Heridität reagierten 7 positiv, unter 19 Kindern, deren Eltern gesund sind, nur eines. In allen positiven Fällen trat eine deutliche Abschuppung der Epidermis am 5. bis 8. Tage ein.

63) SIEGERT, ebendaselbst.
Fand häufig positive Kutanreaktion bei tuberkulöser Heredität ohne nachweisliche Symptome. Einmal trat eine Frühreaktion an alten Ekzemstellen des Gesichtes und Halses gleichzeitig mit der lokalen Reaktion auf.

64) RIETSCHEL, ebendaselbst.
Bei 80 Säuglingen nur einmal positive Kutanreaktion bei einem auch klinisch tuberkulösen Kinde. 2 sichere Tuberkulöse waren dagegen negativ, Kutane und Injektionsprobe, sowie Agglutination stimmten nicht überein.

65) ENGEL und BAUER, Berliner klin. Wochenschr., 1907, Nr. 37. 16. Sept.
Unter 48 Säuglingen gaben sechs positive Kutanreaktion. Fünf von diesen waren klinisch nicht tuberkulös und gaben auch kein Fieber bei Injektion von Tuberkulin, einer erwies sich auch bei der Obduktion als tuberkulosefrei.
Die Probe sei also bei Säuglingen nicht brauchbar, während sie bei älteren Kindern gute Resultate gab.
Bei einigen Kindern bildete sich erst nach 7 und mehr Tagen eine kleine, follikelähnliche Papel.

66) OLMER und TERRAS, Presse médicale, 18. Sept.
Die kutane Reaktion erscheine zwar nicht bei allen gesunden Erwachsenen, sie sei aber wohl viel weniger verläßlich als die Ophthalmoreaktion mit 1 %iger CALMETTEscher Lösung; die von COMBY empfohlene 1/2 %ige gebe zweifelhafte Resultate.

67) PIRQUET, v., Der diagnostische Wert der kutanen Tuberkulinreaktion bei der Tuberkulose des Kindersalters, auf Grund von 100 Sektionen. Wiener klin. Wochenschr., 1907, Nr. 38. 19. Sept.
Genaue Angaben über Größe, Form der Hautreaktionen bei 23 an Miliartuberkulose verstorbenen Kindern, sowie bei 11 Kindern, welche an nicht miliarer Tuberkulose verstarben und 13 Kindern, bei denen Tuberkulose als Nebenbefund konstatiert wurde.
Bei 52 Sektionen war Probe und Obduktionsbefund negativ.
Von 32 Kindern, welche positive Reaktion gezeigt hatten, fanden sich in 31 Fällen sichere tuberkulöse Veränderungen, in einem Falle Status lymphaticus und Adhäsionen. Die Probe versagt fast regelmäßig in den letzten Lebenstagen tödlicher Tuberkulose, seltener bei Tuberkulose als Nebenbefund (siehe pag. 8).

68) CHANTEMESSE, L'ophthalmodiagnostic de la fièvre typhoide. Deutsche med. Wochenschr., 1907, Nr. 39. 26. Sept.
Bei 70 Typhösen waren Ophthalmoreaktion mit Typhusextrakt und Agglutination positiv, in mehreren Fällen trat im Verlauf des Typhus die Ophthalmoreaktion früher auf als die Agglutination.
Von 50 Kontrollfällen reagierte nur ein einziger positiv, der vor 2 Jahren eine typhusverdächtige Erkrankung durchgemacht hatte. Das wichtigste Erkrankungszeichen der positiven Reaktion ist die Persistenz der Rötung, welche 2—3 Tage nachweisbar ist.

69) FERRAND et JULES LEMAIRE, Presse médicale, 28. Sept.
An 100 Kindern wurden 350 kutane Proben mit verschiedenen Substanzen ausgeführt, 19 histologische Präparate entnommen.
Wenn zuerst eine Impfung, dann Injektion, dann wieder Impfung ausgeführt wird, erscheint die zweite Kutanreaktion schneller und stärker als die erste. Häufig sieht man nach der Injektion ein Wiederauftreten früherer Kutanreaktionen. Einmal war die Kutanreaktion von einer Temperatur von 39,5° begleitet.
Genaue Beschreibung und Abbildung der histologischen Befunde, welche durch ein dermales Ödem und eine ziemlich weitgehende entzündliche Infiltration mit kleinen Rundzellen charakterisiert und von der Reaktion auf kutane Impfung mit Diphtherietoxin (viele polynukleäre Zellen) und nicht bakteriellen, reizenden Substanzen scharf unterschieden ist.
Bei Kontrolle durch die Fieberreaktion nach Injektion von 0,2 mg Tuberkulin ergibt sich eine gute Übereinstimmung, während die Ophthalmoreaktion häufig nicht stimmt.

70) COMBY, Oculoréaction à la tuberculine. Arch. de médicine des enfants, Oct. 1907.
Die Einträufelung von 1/2 %iger CALMETTEscher Lösung gab ausgezeichnete diagnostische Resultate, die in 10 Fällen durch die Sektion verifiziert wurden. Auch kachektische Tuberkulöse geben positive Reaktion. Allgemeine hygienische Vorschläge.

71) STEPHENSON SYDNEY, Brit. med. Journal, Oct. (Ref. PETIT.)
Ophthalmoreaktion in einigen okulistischen Fällen.

72) Mantoux, Congrès de méd. de Paris, Oct. (Ref. Petit.)
Bei 200 Kindern konjunktivale Probe mit 1 $^0/_0$ Calmettescher Lösung. Unter der Altersgruppe 2—5 Jahre fanden sich 4 $^0/_0$, 6—10 Jahre 9 $^0/_0$, 11 bis 16 Jahre 10 $^0/_0$. Dieser Prozentsatz entspricht nicht den statistischen Erfahrungen über die latente Tuberkulose; die Ophthalmoreaktion zeigt also nur einen Teil der latent Tuberkulösen an. Mehrere Kinder, welche das Granchersche Zeichen der Spitzentuberkulose aufwiesen, reagierten nicht.

73) Denys, Rev. intern. de la Tuberculose, Oct. (Ref. Petit.)
Bei Ophthalmoreaktion waren unter 24 Fällen alle Tuberkulösen poritiv.

74) Audéoud, Rev. méd. de la Suisse rom., Oct. (Ref. Petit.)
Ophthalmoreaktion bei 611 Personen; unter 261 Tuberkulösen 247 positiv, unter 303 Nichttuberkulösen 25, unter 47 Suspekten 38 positiv.

75) Franke, Ärztlicher Verein in Hamburg, 2. Okt. Ref. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 48.
Calmettesche Reaktion bei 24 Augenkranken. Verwendet zur konjunktivalen Probe eine mit Thymol haltbar gemachte 1 $^0/_0$ige Lösung. Tuberkulöse Herde in der Iris beteiligen sich nicht an der Reaktion.

76) Nagelschmidt, Zur Diagnose und Therapie tuberkulöser Hautaffektionen. Deutsche med. Wochenschr., 3. Okt.
Impft Lupusknötchen mit Tuberkulin. Dadurch entsteht meistens eine Ulzeration, die einerseits die Diagnose sichert, andererseits den Herd unter Narbenbildung zur Heilung bringt.

77) Czerny, Vortrag in Breslau 11. Okt. Berliner klin. Wochenschr., 1907, Nr. 45.
Die kutane Reaktion sei bei allen Erwachsenen positiv, daher zur Ammenprüfung unbrauchbar. Säuglinge waren alle negativ, was gegen Behring spricht. Für Spitalzwecke ist die Probe gut verwertbar, wenn sie auch wie alle biologischen Methoden nicht absolut verläßlich ist. Für den praktischen Arzt hat die frühzeitige Konstatierung der Tuberkulose keinen Wert, da er doch nicht viel dagegen machen kann.

78) Calmette, Breton et Petit, Soc. de Biol., 12. Oct.
Wenn man gesunden Kaninchen 0,002—0,01 gefällten Tuberkulins intravenös verabreicht, zeigen sie auf die nach 16 Stunden ausgeführte konjunktivale Instillation eine positive Reaktion, bei Instillation nach 3 Tagen keine Reaktion. Nach Injektion von großen Dosen tritt diese vorübergehende Sensibilisation nicht in Erscheinung, die sich aber in ähnlicher Weise nach intrastomachaler Aufnahme von 0,01—0,1 nachweisen läßt.
Die Fähigkeit zur Ophthalmoreaktion beginnt 3 Tage nach intravenöser Infektion der Kaninchen mit Perlsuchtbazillenemulsion, sie schwindet nach 15 bis 18 Tagen mit dem Beginn der Kachexie.
Bei einigen nicht Tuberkulösen, welche keine konjunktivale Reaktion gezeigt hatten, trat eine solche auf, wenn sie subkutan mit Tuberkulin injiziert wurden. Die Autoren erklären dies als lokale Sensibilisierung.

79) Dumarest und Arloing, Province medicale, 12. Oktober.
44 tuberkulöse Erwachsene mit 1 $^0/_0$igem präzipitiertem Tuberkulin untersucht; 27 positive, 5 negative und 9 zweifelhafte Reaktionen, die letzteren bei Patienten, deren Konjunktiva beiderseits gerötet erscheint. In einem Falle wurde eine besonders späte Reaktion, die erst am 3. Tage zu beträchtlicher Höhe anschwoll, beobachtet, mehrmals Reaktionen, welche erst bei der zweiten Instillation auftraten. 5 Patienten, welche seit einigen Wochen mit steigenden Tuberkulindosen behandelt waren, reagierten bis auf einen schwach oder gar nicht. Die Injektion von antitoxischem Serum hatte keinen Einfluß auf die Reaktion. In mehreren Fällen ließen sich leichte Temperatursteigerungen (37,6, 38, 38,1, 38,7) mit den Augenreaktionen in Verbindung bringen. Kopfschmerzen in der betreffenden Stirnhälfte begleiten starke Reaktionen fast regelmäßig, einmal traten allgemein Erscheinungen auf. Mehrmals sah man eine sympathische leichte Mitrötung des anderen Auges, 6 mal eine Erweiterung der Pupille. Bei starken Reaktionen ist Adrenalin 1 : 3000 empfehlenswert. Ein Vergleich zwischen Agglutination und Ophthalmoreaktion gab keine vollkommene Übereinstimmung.

80) Bing, Hospitalstid. 45, Ref. Deutsche med. Wochenschr., 12. Dezember.
Versuche mit der Methode von Calmette ergaben keine befriedigenden Resultate.

81) Albeker, Karl, Gyögy anat. 6. Oktober (ungarisch).
Ophthalmoreaktion mit 1 $^0/_0$igem Alttuberkulin bei 30 Fällen. Von 9 manifest Tuberkulösen reagierten 7, von 21 nicht Tuberkulösen nur einer.

82) LEMAIRE, JULES, Soc. de Biol., 12. Okt.
Gleichzeitige Einspritzung von 0,2 mg Tuberkulin stört die Cutireaktion nicht. Sonst wie Nr. 63.

83) LÉPINE et CHARPENEL, Soc. de Biol., 12. Oct.

84) LÉPINE, Soc. de Biol., 19. Oct.
Ophthalmoreaktion bei Geisteskranken. Unsichere Reaktionen kamen fast niemals vor, ebensowenig schwere Erscheinungen. Bei 10 Kranken wurde die Probe wiederholt; in 6 Fällen, in denen die Reaktion das erstemal negativ oder schwach war, war sie das zweitemal stark positiv.
Bei zwei klinisch nicht Tuberkulösen entstand starke Hyperämie in beiden Augen.

85) LEMAIRE, JULES, Soc. de Biol., 19. Oct. und Presse médicale, 2. Nov.
17 Fälle wurden zuerst mit CALMETTEschem Tuberkulin-Test, dann mit Lösung aus dem Institut Pasteur in Paris geprüft; bei der zweiten Prüfung reagierten 2 mehr; LEMAIRE glaubt daraus auf eine stärke Wirkung des zweiten Extraktes schließen zu können. In 2 Fällen von sicherer Tuberkulose war die kutane Reaktion allein positiv, während Ophthalmo- und Fieberreaktion versagte.

86) FISCHER, L., New York Med. Journ., 19. Oct.
Referierender Artikel über die kutane Reaktion.

87) SCHUBERT, Gesellschaft für Natur- und Heilkunde in Dresden, 19. Okt. Münch. med. Wochenschr. 50.
Bei 50 Kranken Ophthalmoreaktion mit 1 %igem Alttuberkulin. Von 19 Tuberkulösen waren 17 positiv, 2 Kachektische negativ.

88) BUCH, ebendaselbst (Diskussionsbemerkung) sah bei zweiter Einträufelung (zuerst ½ %ige, dann nach 5—6 Tagen 1 %ige Lösung) eine sehr intensive hämorrhagische Konjunktivitis.

89) MASSOLONGO, Riforma med. 47, Ref. Deutsche med. Wochenschr. 50.
Haut- und Augenreaktion sind weniger zuverlässig als die Injektionsprobe, aber doch von diagnostischem Werte.

90) LIGNIÈRES et BERGER, Acad. des sciences, 28. Oktober, Ref. Münch. med. Wochenschr. 48.
Einreibung von Bazillen oder von Tuberkulin auf rasierter Haut bewirkt (bei Tieren) nach 24 Stunden eine spezifische Rötung und Schwellung, für die der Name „Dermoreaktion“ vorgeschlagen wird.

91) HIRSCHLER, Vortrag im Budapester Ärzteverein Mitte Oktober. Budapesti Orvosi Ujság, 31. Oct.
Vergleichende Haut- und Augenimpfung genau nach v. PIRQUET (25 % Tuberkulin) und CALMETTE.

Sichere Lungentuberkulose	PIRQUET 1 von 44 negativ,	CALMETTE 2 von 52.
Klinisch nicht tuberkulös	„ 5 „ 19 positiv	„ 4 „ 30.

Die kutane Impfung gibt zu viel positive Resultate, Ophthalmoreaktion ist für die Praxis geeigneter.

92) HEIM, P. und JOHN, Diskussion im Budapester Ärzteverein, 26. Okt. Orvosi Hetilap, 10. Nov. (ungarisch).
130 Kinder und 5 Erwachsene wurden der PIRQUET-DETREschen Prüfung unterzogen. 66 klinisch Tuberkulöse reagierten positiv bis auf 2 Kachektische, von den übrigen reagierten 55 negativ, 16 positiv.
4 Reaktionstypen: 1. Reaktion auf Alttuberkulin KOCH allein 19 Fälle; 2. Alttuberkulin, Human- und Bovinfiltrat ziemlich gleichstark 15 Fälle; 3. Human Bovin 15 Fälle; 4. Bovin Human 34 Fälle. Zu dem letzteren Typus zählte hauptsächlich die Knochentuberkulose, von der 21 unter 25 diese Form ergaben.

93) LENHARTZ, Ärztlicher Verein in Hamburg, 29. Okt. Ref. Münchener med. Wochenschr., Nr. 48.
Von 15 mit steigenden Tuberkulindosen vorbehandelten Kranken gaben nur 2 deutliche Kutanreaktion. Haut- und Augenreaktion stimmten miteinander überein; bei positiven Fällen war auch eine nachträgliche Injektionsprobe stets positiv, wobei die früher benützte Conjunctiva stets mitreagierte.

94) BANDLER, Verein Deutscher Ärzte in Prag, 30. Oktober. Ref. Wiener klin. Wochenschr., Nr. 48.
38 Lupusfälle gaben mit Ausnahme von 4 miliaren Schleimhauttuberkulosen stets stark positive Kutanreaktion. Therapeutische Anwendung an Lupusstellen: Starke Schwellung, teilweise Ulzeration, Ausheilung mit glatter Narbe.

95) SCHLEISSNER, ebendaselbst.
200 Kinder kutan untersucht. Kutane Probe ist der Injektion vorzuziehen, aber noch nicht absolut empfehlenswert.

96) Painblan, Soc. de méd. du Nord, Novemb. (Ref. Petit.)
In einem Falle hatte die Ophthalmoreaktion eine therapeutische Wirkung.

97) Bosc, Pédiatrie pratique, Nov. 1. (Ref. Petit.)
Von 36 sicher tuberkulösen Kindern bot nur ein Kind (Spondylitis in Ausheilung) keine Ophthalmoreaktion.

98) Nobécaut und Mantoux, Soc. de Biol. 1. Nov.
15 Kaninchen wurden mit menschlichen Tuberkelbazillen infiziert, erkrankten, zeigten aber trotzdem niemals (31 Untersuchungen) kutane Reaktion. Die Ophthalmoreaktion wurde methodisch ungefähr alle 5—7 Tage vorgenommen, sie fand sich bei allen (ca. 150) Untersuchungen nur fünfmal positiv, niemals vor dem 19. Tage. Sie sei also jedenfalls nicht als ein frühzeitiges Symptom aufzufassen.

99) Mongour et Brandeis, Cytologie de l'exsudat dans d'Ophthalmoreaktion. Bull. méd., Novembre 6. (Ref. Petit.)
Beschreibung der Ophthalmoreaktion.

100) Kraus, Lusenberger und Russ, Ist die Ophthalmoreaktion nach Chantemesse zu diagnostischen Zwecken bei Typhus verwertbar? Wiener klin. Wochenschrift 1907, Nr. 45. 7. Nov.
Wässerige Typhusextrakte gaben keine deutlichen Erfolge, dagegen bewirkten Extrakte, welche in der Methode von Chantemesse ausgeführt waren, bei Typhuskranken regelmäßig Reaktionen. Aber auch bei anderweitig erkrankten Menschen verlief die Instillation mit positiven, wenn auch schwächeren und kürzer dauernden Erscheinungen. Andererseits reagierten die Typhösen auch auf Extrakte von Paratyphus, Koli und auf Tuberkulin. Die Reaktionen auf der Conjunctiva seien also nicht spezifisch und hätten jedenfalls nichts mit Antikörpern zu tun. Kutane Impfung von Typhus- und ähnlichen Extrakten gibt ganz gleiche Reaktionen bei Typhösen und bei Gesunden.

101) Joannovics und Kapsammer, Berliner klin. Wochenschr. 11. November.
Bei tuberkulösen Meerschweinchen gaben weder Haut- noch Augenreaktion verwertbare Resultate.

102) Berend, Diskussion im Budapester Ärzteverein, 9. Nov.
45 Fälle nach Pirquet-Detre untersucht. 10 chirurgische Fälle gaben bovine Reaktion. 8 Neugeborene alle negativ. Die Detresche Modifikation ist wegen der therapeutischen Indikation im Sinne Spenglers sehr wertvoll.

103) Morelli, ebendaselbst.
Vergleich in 280 Fällen von kutaner und konjunktivaler Probe. Bei klinisch sicheren Lungentuberkulosen war die kutane Probe in 96 $^0/_0$, die konjunktivale in 86 $^0/_0$ positiv,
bei chirurgischen Tuberkulosen die kutane in 72 $^0/_0$, die konjunktivale in 63 $^0/_0$,
„ zweifelhaften Fällen „ „ „ 42 $^0/_0$, „ „ „ 42 $^0/_0$,
„ klinisch nicht Tuberkulösen „ „ „ 22 $^0/_0$, „ „ „ 14 $^0/_0$.
Die kutane Probe sei empfindlicher und sicherer. Bei konjunktivalen Proben traten schwere Augensymptome auf.

104) Kentzler, ebendaselbst.
181 differentielle Proben. Mit Alttuberkulin fand sind positive Reaktion bei sicheren Tuberkulösen in 98 $^0/_0$, bei klinisch nicht Tuberkulösen in 34 $^0/_0$. — Die Reaktion sei allzuempfindlich, Filtratreaktionen fanden sich bloß in $^1/_3$ der Fälle, und zwar human 20 $^0/_0$, bovin 6 $^0/_0$, gemischt 8 $^0/_0$. Er konnte die Detreschen Typen bei Erwachsenen nicht bestätigen.

105) Flesch, ebendaselbst.
47 Kinder nach Pirquet untersucht. Von 29 positiven kam eines zur Sektion, es fand sich keine Tuberkulose. 4 Fälle von sicherer Tuberkulose waren negativ. Die Reaktion sei also unsicher.

106) Okolicsányi und Kuthy, ebendaselbst.
Bei vielen Patienten eines Tuberkulosesanatoriums war die kutane Probe negativ.

107) Faludi, ebendaselbst.
Kutane Proben mit 25 $^0/_0$ Tuberkulin. 195 Neugeborene waren durchgehends negativ; von den Müttern 126 positiv.

108) Hutyra, ebendaselbst.
Die quantitative kutane Probe ist für klinische Zwecke zu empfindlich. Gegen die Richtigkeit der Differentialprobe spräche, daß sie viel mehr Prozente boviner Tuberkulosen anzeigt, als kulturell gefunden wurden.

109) PREISICH, ebendaselbst.
Führte die differentielle Probe an 140 Kindern des Infektionsspitales aus. Die Reaktionen variieren bei ähnlichen Krankheitsbildern auch am selben Individuum. Bei schwer Tuberkulösen und bei Tuberkulösen während der Masern bleibt die Reaktion aus. Von 36 Skrofulösen waren 15 negativ.

110) DEUTSCH, ebendaselbst.
Führte 43 Proben bei Waisenkindern aus; von 20 hereditär belasteten reagierten 13, von 23 heretidär nicht belasteten 6; die kutane Reaktion mit KOCH- und Humanfiltrat, sowie die konjunktivale Reaktion stimmten in allen Fällen überein; Bovinfiltrat gab nirgends Reaktion. Schwere Konjunktivitiden nach Ophthalmoreaktion.

111) KÉTLY, V., ebendaselbst.
Sah 5 schwere Fälle von CALMETTE-Konjunktivitis. Eine davon rezidivierte bei kutaner Probe.

112) GROSZ, ebendaselbst.
15 sichere und 16 wahrscheinlich Tuberkulöse waren positiv, 9 davon wurden injiziert und gaben auch Fieberreaktion. 5 fortgeschritten Tuberkulöse waren negativ, desgleichen 29 Kinder mit anderweitigen Erkrankungen.
7 Tuberkulöse, welche monatelang mit steigenden Tuberkulindosen behandelt waren und eine hohe Tuberkulinimmunität erreicht hatten (bis 0,3 g), gaben negative Kutanreaktion. 3 Fälle, die erst seit kürzerer Zeit in Behandlung standen, waren schwach positiv.

113) DETRE, ebendaselbst.
Für die spezifische Bedeutung der kutanen Probe sprechen 1. die absolut negativen Resultate bei Neugeborenen, 2. das Anwachsen der Reaktionshäufigkeit mit den Jahren, 3. die Übereinstimmung mit den Sektionen, 4. die theoretische Grundlage der Allergielehre. Die Ophthalmoreaktion ist prinzipiell identisch, aber bei konzentrierter Dosierung gefährlich, bei verdünnter ungenau, daher zu verwerfen. Die DETREschen Typen sind konstante Erscheinungen und stimmen mit dem klinischen Befunde überein. Er hält an der Spezifität der humanen und bovinen Reaktion fest. Der Beweis durch den Tierversuch gelang bisher nicht, weil Meerschweinchen nach Infektion mit humanen und bovinen Bazillen weder kutane noch konjunktivale Reaktion zeigten.
Die kutane Reaktion läßt sich zur Auswertung und Analyse von Tuberkulinsorten verwenden.

114) SCHENCK und SEIFFERT, Münchener med. Wochenschr., 1907, Nr. 46, 12. Nov.
100 Erwachsene wurden nach der Methode EPPENSTEINS mit ansteigenden Tuberkulindosen konjunktival geprüft. Von 28 sicheren Tuberkulosen reagierten bei 1 % Tuberkulin 22 (79 %), bei 4 % Tuberkulin alle, mit Ausnahme eines einzigen, welcher inzwischen verstorben war. Von 52 klinisch nicht Tuberkulösen reagierten bei 1 % 3 (6 %), bei weiterer Steigerung blieben nur 27 (50 %) ohne Reaktion. In einigen Fällen länger dauernde Reaktionen, fliktenuläre Eruptionen und ziliare Injektion. Niemals Temperatursteigerung.

115) PETIT LÉON, Le diagnostic de la tuberculose par l'ophthalmoréaction. Étude clinique et expérimentale. Paris. 128 Seiten.
Technik der Tuberkulindarstellung nach CALMETTE, Beschreibung der Reaktion. Experimente der CALMETTEschen Schule an Tieren (78). Sammelforschung über die klinische Anwendung. (Medizinische, chirurgische Fälle, Kinder, Augenkranke, Irrsinnige.) Eigene Untersuchungrn über 623 Erwachsene und 66 Kinder. 8 Sektionsbefunde, die alle mit der Reaktion stimmen.

Unter 740	Klinisch tuberkulösen	war die Reaktion in 94,32 % positiv.
„ 185	Fraglichen	„ „ „ „ 61,6 % „
„ 938	Tuberkulosefreien	„ „ „ „ 18,43 % „

Die Ophthalmoreaktion zeige bei latenter Tuberkulose nur die aktiven Prozesse an. Anwendung für Hygiene und Prophylaxe (s. 43, 55).

116) KOHN S, Berliner klin. Wochenschr. 47, 28. November.
310 Patienten mit 1 %igem Alttuberkulin konjunktival geprüft:

Tuberkulös	86,	davon positiv 60,	zweifelhaft 0,	negativ 26.
Verdächtig	32,	„ „ 23,	„ 3,	„ 6.
Unverdächtig	192,	„ „ 10,	„ 4,	„ 178.

Typhöse zeigten auffallend häufig positive Reaktion, vielleicht infolge einer allgemeinen Überempfindlichkeit gegen Bakterieneiweiß. Negative Reaktion spricht nicht absolut gegen Tuberkulose: von den schweren Phthisikern (III. Stadium) fehlte in der Hälfte der Fälle die Reaktion, unter beginnenden Fällen nur ausnahmsweise. Bei nachträglicher Injektion entsteht Mitreaktion der Konjunktiva, auch wenn die Fieberreaktion fehlt und wenn die konjunktivale Probe

negativ gewesen war. Die einmalige Einträufelung erzeugt bei nicht tuberkulösen Erwachsenen (nach Dessauer nicht bei Säuglingen), nach einem Intervalle von mehr als drei Tagen gewöhnlich eine Überempfindlichkeit des eingeträufelten Auges; bei Tuberkulösen erstreckt sich die Wirkung meist auch auf das andere Auge. Die Fähigkeit, durch einmalige Einträufelung eine lokale Überempfindlichkeit zu akquirieren, scheint im Laufe des Lebens erworben zu werden.

117) Köhler, Deutsche med. Woch. 1907, 50. 12. Dezember.

169 sicher Tuberkulöse wurden mit ansteigenden Dosen von Alttuberkulin konjunktival geprüft; bei 1 %igem Tuberkulin reagierten 51 %, bei 2 %igem weitere 41 %, bei 4 %igem weitere 8 %; nur 4,7 % blieben reaktionslos.

118) Blümel und Clarus, Med. Klinik 1907, 50. 15. Dezember.

Konjunktivale Probe in Eppensteinscher Methode. 93 Fälle mit Bazillen, davon nur 3 negativ, welche mit Tuberkulin behandelt worden waren, ebenso 9 weitere unter 60 Fällen, welche „Kochsche Reaktion“ gegeben hatten. Von 136 klinischen Tuberkulosen ohne Bazillenbefund 17 negativ. Kein Zusammenhang mit den Turbanschen Stadien.

119) Aronade, Med. Klinik 1907, 51. 22. Dezember.

Zwei Tuberkulöse, welche ursprünglich typische Fieberreaktion gegeben hatten und dann nach ansteigender Immunisierung 1 g Alttuberkulin reaktionslos vertrugen, gaben auch keine kutane Reaktion. Bei kutaner Prüfung waren von 46 Säuglingen 45 negativ; 17 davon kamen zur Sektion; niemals fand sich Tuberkulose, einmal vergrößerte Bronchial- nnd Mesenterialdrüsen, die sich aber im Tierversuch als tuberkulosefrei erwiesen. Von 100 älteren Kindern waren 22 positiv, mehrere mit exsudativer Diathese negativ. Entgegen Engel und Bauer hält Aronade die kutane Probe im Säuglingsalter für empfehlenswerter als die Injektionsprobe.

120) Klieneberger, Münch. Med. Woch. 1907, 52. 24. Dezember.

Bei 17 sicheren Phthisikern war die Ophthalmoreaktion 7 mal negativ, darunter in initalen Erkrankungen. Bei mehrmaliger Instillation reagierten wohl sämtliche Tuberkulöse, aber auch 78 % der Nichttuberkulösen. Die sekundäre Reaktion sei also nicht spezifisch verwertbar.

121) Wiens und Günther, Münch. Med. Woch. 1907, 52. 24. Dezember.

1 %ige Calmettesche Lösung verursachte mehrmals schwere Läsionen: langdauernden Bindehautkatarrh, hartnäckige Randfliktene, starke Ecchymosen; diese Konzentration sei also unzulässig. Auch bei $^1/_2$ %iger Lösung sieht man gelegentlich schwere Erscheinungen, so einmal einen Pannus srofulosus. Bei chronisch gereizter Bindehaut sei die Ophthalmoreaktion überhaupt nicht anzuwenden.

122) Mainini, Münch. med. Wochenschr. 1907, 52. 24. Dezember.

Kutane Probe bei 208 Fällen mit 1 : 80 verdünntem Alttuberkulin und Schnittmethode. Manchmal Rekrudeszenzen der Papelbildung. Häufig torpide Reaktionen. Bei den nicht manifest Tuberkulösen war die Reaktion 87 mal einen Tag nach der Impfung zu sehen, 46 mal nach zwei Tagen, 27 mal noch später, aber dann immer sehr schwach. In 100 Fällen wurde gleichzeitig Haut- und konjunktivale Probe (mit 5 %igem Alttuberkulin) ausgeführt.

Phthisiker mit Baz.-Bef.	12,	davon positiv kutan 11,	konjunktival 11.
Verdächtige	32,	„ „ „ 31,	„ 26.
Unverdächtige	56,	„ „ „ 50 (89 %)	„ 8 (14 %).

Die Erklärung dafür, daß latent inaktiv Tuberkulöse 6 mal häufiger kutan als konjunktival reagieren, sei vielleicht darin gelegen, daß die Reaktionsstoffe in der Haut zäher festgehalten werden als in der Konjunktiva. Diese behält aber die Fertigkeit, die Reaktionsstoffe nachzubilden: bei zweiter Einträufelung im selben Auge reagieren ebensoviele Unverdächtige sekundär, als kutan primär. Die Ophthalmoreaktion deute also möglicherweise vorwiegend auf aktive Tuberkulose hin, während die kutane auch inaktive Herde anzeigt.

XXXVI.

Das Tuberkulin in seiner diagnostischen Anwendung bei Tieren.

Von

Professor Dr. Paul H. Römer

in Marburg.

In einem am 6. Februar 1884 vor der Berliner medizinischen Gesellschaft gehaltenen Vortrag teilte POHL-PINCUS[108]), unbefriedigt von den bisherigen Immunitätstheorien eine neue Auffassung des Wesens der Immunität mit, zu der er auf Grund von Beobachtungen bei Vaccineimpfungen gekommen war. Er wollte bei der ersten Vaccineimpfung eine Herabsetzung, bei der zweiten hingegen eine starke Steigerung des „Saftstroms" beobachtet haben. Dieser Unterschied sei nun nach seiner Meinung die Ursache der Immunität; „es werden mithin durch das einmalige Überstehen mancher Infektionskrankheiten (in der Regel) alle Saftbahnzellen („Bindegewebskörper", „Endothelzellen") der für das Gift empfänglichen Organe so umgestimmt, daß, während das zum ersten Male einpassierende Gift zum Verschluß (Kontraktur) der Saftbahnen führt, das zum zweiten Male (nach erlangter Immunität) einpassierende Gift zur Erweiterung der Saftbahnen führt. Diese Umstimmung ist das Wesen der Immunität."

Diese Umstimmung des Organismus erfolgt durch einen Stoff; und zwar stammt dieser von dem Parasiten her. Wenn es also gelingen würde, den Pilzen diesen Stoff zu entziehen, so würde man mit Hilfe desselben künstlich Immunität erzeugen können. Diese hypothetischen Substanzen nennt POHL-PINCUS je nach den verschiedenen Krankheiten und Krankheitserregern Cholerin, Dysenterin, Scarlatinin, Anthracin, Morbillin, Variolin und Tuberkulin.

„Wir werden deshalb das Tuberkulin darzustellen suchen; das Inhalieren des Tuberkulins, sein Import auf subkutanem und anderem Wege wird durch Gewöhnung an dies Gift den Organismus ebenso unempfänglich für den Bacillus tuberculosus machen, wie es heut die meisten Menschen an und für sich bereits sind; wir werden die hereditär disponierten vor der wirklichen Erkrankung auf diese Weise schützen; wir werden die meisten bereits erkrankten vor dem Fortschritte ihres Leidens bewahren. Wir werden dies zunächst bei den Tieren versuchen, jedoch die Reindarstellung des Tuberkulins nicht abwarten; wir werden vielmehr

die Extrakte der Kulturen und selbst die Extrakte der experimentell frisch erzeugten Miliartuberkeln verwenden; denn in dem Gemisch der verschiedenen extrahierbaren Stoffe hat das Tuberkulin bezüglich der von uns erstrebten Wirkung ein so entscheidendes Übergewicht über alle übrigen verunreinigenden Stoffe, daß der Mitimport dieser letzteren bedeutungslos wird."

Es entbehrt heute nicht eines gewissen Reizes, die Fußnote zu lesen, welche die Redaktion der Deutsch. med. Wochenschrift dem Auszuge aus dem genannten Vortrage beigibt: „Wir verwahren uns aber dagegen, daß wir auch nur mit irgend einer der Ausführungen des Herrn Vortragenden einverstanden seien. Wir haben die Überzeugung, daß Herr Pohl-Pincus selbst nicht einen Augenblick an der Richtigkeit seiner Erörterungen zweifelt, glauben aber, daß er sich auf einem ganz falschen Wege befindet, auf dem ihm glücklicherweise wohl niemand folgen wird."

Diesen Weg, wenn auch ohne die vielfach etwas phantastischen theoretischen Vorstellungen von Pohl-Pincus sich zu eigen zu machen, ging 6 Jahre später Robert Koch und der therapeutische Plan, für dessen Auseinandersetzung durch Pohl-Pincus die Redaktion der Deutschen medizinischen Wochenschrift besorgt um ihre wissenschaftliche Würde anscheinend nur ungern und nur unter der oben wiedergegebenen Verwahrung ihre Spalten zur Verfügung stellte, gewann das Interesse der gesamten wissenschaftlichen Welt, ja entfachte vielfach einen Sturm der Begeisterung auch unter kühler denkenden Menschen, als er durch R. Koch [71]) verwirklicht schien und gedeckt durch seine Autorität wissenschaftliches Bürgerrecht bekam.

Die theoretische Begründung seiner Anschauungen durch Pohl-Pincus aber würde wohl zurzeit der ersten Tuberkulinära noch belächelt worden sein. Heute aber haben wir allen Grund, auch diesen Teil seiner Ausführungen einer ernsteren Betrachtung zu unterziehen; denn — mutatis mutandis — finden wir hier ein Phänomen angedeutet, das immer größere Bedeutung in der Immunitätsforschung bekommt, nämlich jene veränderte Reaktionsfähigkeit des bereits schon einmal infiziert gewesenen Organismus, die lebhaftere, schneller einsetzende Reaktion, wenn er von der gleichen Infektion wiederholt befallen wird — kurz jenes Phänomen, das wir als „Überempfindlichkeit" zu bezeichnen gewohnt sind. Besonders eindrücklich hat auf die Bedeutung dieses Phänomens für die Auffassung der Immunität stets v. Behring hingewiesen.

Der von Pohl-Pincus speziell herangezogene Fall einer lebhafteren Reaktion des Organismus auf die zweite Vaccineimpfung ist ja neuerdings durch Pirquet [107]) bestätigt und als spezifische Überempfindlichkeit gedeutet worden. Bei der künstlichen Immunisierung gegen das Diphtherie- oder Tetanusgift ist das gleiche Phänomen unschwer zu demonstrieren, ebenso bei Behandlung mit gewöhnlichem Serum-Eiweiß. Wir lernen immer mehr einsehen, daß wir es hier mit einer gesetzmäßigen Erscheinung zu tun haben, die wir beobachten, wenn wir ein Individuum mit antikörpererzeugenden Stoffen, sog. „Antigenen"*), immunisierend behandeln.

---

*) Der immer mehr sich einbürgernde Ausdruck „Antigen" für antikörperauslösende Substanzen scheint mir ethymologisch ebensowenig korrekt zu sein, wie die Anwendung des Wortes „pathogen" für krankheiterzeugende Agentien. Denn während man im letzten Fall sagen will, daß das betr. Agens Krankheit erzeugt, sagt man nach dem ethymologischen Wortsinn aus, daß es umgekehrt von der Krankheit erzeugt wird. Ebenso bedeutet „Antigen" ein von den Antikörpern erzeugter Stoff, während es das Gegenteil bedeuten soll.

Auch die gegen die Norm gesteigerte Empfindlichkeit gegen das Tuberkulin zeigt, daß die betr. Individuen unter dem Einfluß des Tuberkulosevirus gestanden haben, ebenso an, wie die Symptome der „Serumkrankheit“ auf eine schon stattgehabte Seruminjektion hinweisen. Die diagnostische Verwertbarkeit dieser veränderten Reaktionsfähigkeit des Organismus dürfte aber nirgends genauer studiert sein als gerade bei der Tuberkulose.

Es ist daher durchaus angebracht, die diagnostische Bedeutung der Tuberkulinreaktion in einem Handbuch der Immunitätsforschung zu besprechen; denn sie gehört in ihrer allgemeinen Bedeutung zu einem für das Verständnis des Wesens der Immunität sehr wichtigen Kapitel.

Gewinnung des Tuberkulins.

Das Wort Tuberkulin ist also, wie erwähnt, zuerst von Pohl-Pincus angewendet worden.

Der erste aber, dem es wirklich gelungen ist, aus Tuberkelbazillenkulturen eine giftige Substanz zu isolieren, war wohl Hammerschlag, der in Nenckis Laboratorium arbeitete. Aber er ahnte nicht die Tragweite dieser Feststellung weder nach der diagnostischen noch nach der therapeutischen Seite hin. Erst die Mitteilungen R. Kochs[71—73]) lenkten die Aufmerksamkeit der ganzen Welt auf das neue eigenartige Mittel, an das sich sogleich die kühnsten Träume hoffender Optimisten knüpften. Ueber die Natur und Gewinnungsweise dieses Stoffes wurde aber zunächst nur wenig bekannt gegeben; denn „es mußte die Nachprüfung um so unbefangener ausfallen, je weniger von dem Mittel selbst bekannt war“ (Koch). Im Januar 1891 teilte Koch[72]) sodann mit, daß die wirksame Substanz mit Hilfe einer 40—50%igen Glyzerinlösung aus den Tuberkelbazillen isoliert würde. Das Mittel „ist also ein Glyzerinextrakt aus den Reinkulturen der Tuberkelbazillen“. Auch diese Angaben waren noch recht allgemein gehalten. Es war daher verständlich, daß man von der Analyse des fertigen, im Handel erhältlichen Präparates ausging, um dann rückwärts Schlüsse auf die Gewinnungsweise und die Natur des neuen Mittels zu machen. So kamen denn auf dem Weg theoretischer Ueberlegungen, einiger chemischer Analysen und Tierversuche Hueppe und Scholl[56]) zu dem Schluß, daß die ursprüngliche Kochsche „Lymphe“ ein Gemisch aus Stoffwechselprodukten des Tuberkelbacillus und aus unzersetztem Nährmaterial von Kulturen — im wesentlichen Handelspepton und Glyzerin — darstelle, das durch Eindicken haltbarer und wirksamer gemacht sei. „Das, was Koch erst mit Glyzerin zu extrahieren glaubt, ist demnach bereits an sich schon in der Kulturflüssigkeit vorhanden, bedarf also keiner Extraktion.“

Diese Schlußfolgerungen waren im wesentlichen zutreffend, enthielten indes doch nicht die ganze Wahrheit. Man kann nämlich mit Hilfe verschiedener Methoden Tuberkulinpräparate herstellen, die sich in ihrer Wirkung auf den tierischen und menschlichen Organismus nicht zu unterscheiden brauchen, wenn auch chemisch gewisse, nachher zu besprechende geringe Unterschiede bestehen. Die gebräuchlichsten dieser — übrigens auch schon von Hueppe und Scholl angewandten — Methoden sind die folgenden:

1. Man züchtet in den gewöhnlichen 1 Liter fassenden Erlenmeyerschen Glaskolben auf 500 ccm flüssigen Nährsubstrats die Tuberkelbazillen.

Das Nährmedium ist eine in der gewöhnlichen Weise hergestellte Fleischwasserpeptonbouillon mit Glyzerinzusatz (2 % Pepton Witte, 3 % Glyzerin, 0,5 % Kochsalz). Man kann das Fleisch verschiedener Tierarten verwenden. Wir benutzen in der Regel gut zermahlenes Pferde- oder Rinderfleisch, von dem wir mit gleichen Teilen Wasser ein Infus herstellen, das zunächst 12 Stunden in der Kälte sich selbst überlassen wird. Hierauf wird es im Autoklaven bei ca. 100° 5—6 Stunden gekocht, dann klar filtriert. Das so gewonnene klare Fleichwasser wird mit 3 Teilen Wasser verdünnt, die oben bezeichneten Mengen Pepton, Glyzerin und Kochsalz hinzugesetzt und das Ganze unter Benutzung von Lakmus als Indikator durch Zusatz von Natronlauge bis zu schwach alkalischer Reaktion neutralisiert. Je 500 ccm werden dann in die Kolben eingefüllt, deren Inhalt während zweier aufeinanderfolgender Tage je 1 Stunde lang strömendem Wasserdampf von 100° ausgesetzt wird. Die so hergestellte, sterile Glyzerinbouillon wird dann mit Tuberkelbazillen beimpft und bei Bruttemperatur im Dunkeln aufgestellt.

Statt des Fleisches als Ausgangsmaterial für das Nährsubstrat kann man auch Liebigs Fleischextrakt verwenden, von dem man eine 1 %ige Lösung herstellt, dann entsprechend den obigen Angaben mit Pepton, Glyzerin und Kochsalz versetzt, neutralisiert, sterilisiert und mit Tuberkelbazillen beimpft.

Um ein rasches und üppiges Wachstum zu erzielen, impft man zweckmäßig von dem auf dem Kondenswasser einer Tuberkelbazillen-Serumkultur gebildeten feinen Häutchen vorsichtig mit einer Öse auf die Oberfläche der Bouillon. Ist man einmal im Besitz von Bouillonkulturen, so ist es für die Gewinnung neuer Kulturen am einfachsten von der Haut auf solchen flüssigen Kulturen auf die Oberfläche der neuen Bouillon vorsichtig zu übertragen. Man spart sich dabei viel Mühe und Ärger, wenn man zur Beimpfung der frisch bereiteten Bouillon nicht von einer schon älteren Kultur mit dicker gefalteter, schwerer Haut ausgeht, sondern von jungen Bouillonkulturen, bei denen die Kulturentwicklung in Gestalt eines dünnen, schleierartigen Gewebes auf der Oberfläche noch im Beginn steht. Von diesem dünnen Häutchen gelingt die Übertragung auf die Oberfläche der neuen Bouillon sehr leicht. Man kann von einem einzigen solchen Kolben aus in kurzer Zeit 100 und mehr Kolben impfen und sicher sein, daß ein üppiges, rasches und gleichmäßiges Wachstum erfolgt. Dieses geschieht in der hinlänglich bekannten charakteristischen Weise.

Nach ca. 6 Wochen langem Wachstum gießt man den Inhalt der Kolben mitsamt den Bazillen in einen Eindampfapparat und dampft bei ca. 95—98° die gesamte Flüssigkeit auf $^1/_{10}$—$^1/_{20}$ ihres ursprünglichen Volums ein. Die so gewonnene eingedickte Flüssigkeit wird, um sie von den toten Bazillenrückständen zu befreien, wiederholt filtriert, dann noch kräftig zentrifugiert. Die klare bräunliche, etwas dickflüssige, mikroskopisch von Tuberkelbazillen freie Flüssigkeit ist das fertige Tuberkulin, das Tuberculinum Kochii.

2. Statt nun aber die gesamte Kulturflüssigkeit mitsamt den Tuberkelbazillen einzudampfen, kann man nach Abschluß des Tuberkelbazillenwachstums auf der Bouillon die Tuberkelbazillen zunächst abfiltrieren, was am besten auf einer Metallnutsche mit Hilfe einer Vacuumpumpe geschieht und dann erst das klare Kulturfiltrat auf $^1/_{10}$—$^1/_{20}$ des ursprünglichen Volums eindicken. Es ist dies die Methode, die wir in der Regel in Marburg anwenden.

Im letzteren Fall haben wir in der Tat nur die das Nährsubstrat zusammensetzenden Stoffe und die Stoffwechselprodukte der Tuberkelbazillen in dem Tuberkulin. In seiner qualitativen Wirkung gegenüber dem menschlichen und tierischen Organismus verhält es sich, soweit wir bis jetzt beurteilen können, wie das eigentliche Tuberculinum Kochii. Vergleicht man aber quantitativ die Wirkung beider, so zeigt sich, vorausgesetzt, daß man in beiden Fällen unter wirklich vergleichbaren Bedingungen arbeitet (gleiche Bouillon, gleiches Alter der Kulturen, dieselbe Intensität der Eindickung), daß das zuerst beschriebene Verfahren quantitativ etwas stärker wirksame Präparate liefert. Offenbar findet hier, wie dies auch Koch betont hat, noch eine Auslaugung, eine Extraktion der Tuberkelbazillen durch die glyzerinhaltige Flüssigkeit statt. Qualitativ wird allerdings nach allem, was wir bisher wissen — und somit haben im Grunde Hueppe und Scholl doch recht — nichts wesentliches an dem Endprodukt geändert und die quantitativen Differenzen in der Stärke der Giftwirkung kann man leicht durch ein etwas stärkeres Eindicken des bazillenfreien Kulturfiltrats ausgleichen.

3. Nach dem Gesagten ist es selbstverständlich, daß lediglich das Filtrieren genügend lange gewachsener Tuberkelbazillen-Kulturen genügt, um ein Tuberkulin zu gewinnen. Solche Bouillon-Kulturfiltrate sind aber viel schwächer wirksam als durch Eindampfen gewonnene Präparate. (Nach Denys[26]) und Buden[15]) sollen diese Filtrate eine besonders günstige therapeutische Wirkung auf den Tuberkuloseprozeß haben.)

Nicht ganz gleichgültig für die Tuberkulinbereitung ist die Art der verwandten Tuberkelbazillenkultur. Die im Handel befindlichen Tuberkuline stammen fast ausschließlich von Tuberkelbazillen menschlicher Provenienz her. Man kann aber ebenso gut auch vom Rinde, vom Pferde und Schwein stammende Tuberkelbazillen (Malm[93]), Römer[113]), De Schweinitz und Dorset[125]), sowie vom Huhn herrührende Stämme (Héricourt und Richet[53]), Babes[6]), Römer[113]) benutzen. Nach den Angaben von Ramond und Ravaut[116]) sind auch Kaltblüter-Tuberkelbazillen geeignet. Ja sogar tuberkelbazillenähnliche Bakterien, wie Thimotheebazillen (Irimescu[62])), sowie die Streptothrix farcinica sollen Tuberkulin liefern (Feistmantel[33])). Ein Teil derartiger Versuche bedarf aber noch der Nachprüfung und Ergänzung; denn sie beschränken sich zum Teil auf Experimente an Menschen und Tieren, bei denen man lediglich von der temperatursteigernden Wirkung großer Dosen ausging. Bei der gelegentlich zu beobachtenden Labilität in der Temperatur tuberkulöser Individuen ist solchen Versuchen bezw. ihrer Deutung vorläufig nur ein beschränkter Wert beizumessen. Verfasser kann auf Grund exakter Giftwertbestimmungen, die sich auf die Ermittelung der tötlichen Minimaldosis bei tuberkulösen Meerschweinen in bestimmtem Stadium der Erkrankung stützen, behaupten, daß die von Säugetiertuberkelbazillen und Hühnertuberkelbazillen gelieferten Tuberkuline sich qualitativ gleich verhalten, insofern als sie nicht nur bei den mit der entsprechenden Kultur infizierten Tieren die klassische Reaktion und Tuberkulintod hervorrufen, sondern bei allen mit Mensch-, Rind- oder Hühnertuberkelbazillen infizierten Individuen. Auf bemerkenswerte quantitative Differenzen kommen wir nachher zurück.

Entsprechend diesen drei Methoden der Tuberkulinbereitung bringen die Höchster Farbwerke auch drei verschiedene Tuberkuline in den Handel, nämlich einfache Bouillon-Kulturfiltrate, im Vacuum eingedickte Filtrate und nach der ursprünglichen Kochschen Methode hergestelltes

Tuberkulin. Da ferner sowohl von Tuberkelbazillen menschlicher Provenienz als Rindertuberkelbazillen diese verschiedenen Tuberkuline hergestellt werden, handelt es sich im ganzen um 6 Präparate, welche von Höchst in den Handel kommen. Dieselben sind bezeichnet als T. O. A (Filtrat von Bouillonkulturen der Tuberkelbazillen menschlicher Provenienz), P. T. O. (Filtrat von Bouillonkulturen der Rindertuberkelbazillen), Vacuum-Tuberkulin (eingedicktes Bouillonkulturfiltrat von Tuberkelbazillen menschlicher Provenienz), Perlsucht-Vacuum-Tuberkulin (eingedicktes Bouillon-Kulturfiltrat von Rindtuberkelbazillen), Tuberculinum Kochii (nach der sub 1 beschriebenen Methode hergestelltes Präparat aus Kulturen menschlicher Provenienz), Perlsucht-Tuberkulin (entsprechend dem Tub. Kochii hergestelltes Präparat aus Rindertuberkelbazillen).

Die einfachen Kultur-Filtrate sind zu diagnostischen Zwecken ungeeignet, da sie zu schwach wirksam sind. Die Vacuum-Tuberkuline entsprechen den gewöhnlichen Tuberkulinen in ihrer Wirksamkeit. In diagnostischer Hinsicht sind, wie erwähnt, die von Rinder- oder Menschentuberkelbazillen stammenden Tuberkuline qualitativ als gleichwertig anzusehen; überhaupt ist nach Ansicht des Verfassers bisher noch kein eindeutiger Beweis für essentielle Unterschiede zwischen den von verschiedenen Tuberkelbazillenstämmen gelieferten Tuberkulinen geliefert worden.

Das Tuberkulin wird außer in Höchst noch in zahlreichen anderen Fabriken hergestellt, z. B. von Merck-Darmstadt, dem Behringwerk-Marburg, den Laboratorien verschiedener tierärztlicher Hochschulen, dem Pasteur-Institut zu Paris, dem Jenner-Pasteur-Institut zu Budapest, dem Berner Serum- und Impf-Institut und noch von anderen Fabrikationsstätten.

Andere Tuberkuline.

In seiner Publikation aus dem Januar 1891 gab Koch ferner an, daß die wirksame Substanz des Tuberkulins in absolutem Alkohol unlöslich sei und daher durch diesen, wenn auch nicht rein, so doch gereinigt gefällt werden könne. Das wirksame Prinzip schien ihm ein Derivat von Eiweißkörpern zu sein, aber kein eigentliches „Toxalbumin", da es sich hitzebeständig und dialysierbar erwies. Diese Angaben fanden Bestätigung durch Hueppe und Scholl[56]), Klebs[68]), Hunter[57]) und Hahn[47]). Letzterer identifizierte das wirksame Prinzip genauer als eine „Toxalbumose". Alle weiteren Methoden zur Reinigung und Isolierung des wirksamen Prinzips aus dem Rohtuberkulin sollen weiter unten gelegentlich der Erörterungen über die chemische Natur des Tuberkulins genauer besprochen werden.

Vielfach wurden Versuche gemacht, das Kochsche Tuberkulin durch andersartig gewonnene Präparate zu ersetzen. So suchte Klebs[68—70]) die nach seiner Meinung gefährlichen Substanzen des Tuberkulins, bei denen er Alkaloidcharakter vermutete, durch verschiedene Fällungs- und Extraktionsmethoden zu beseitigen. Er gewann auf diese Weise sein sog. „Tuberkulocidin", sowie später das „Antiphthisin".

Buchner und Hahn[18—48]) stellten einen plasmatischen Zellsaft aus Tuberkelbazillen her in ähnlicher Weise wie sie solche auch aus Choleravibrionen, Typhusbazillen, Staphylokokken etc. gewonnen hatten, indem sie die auf den Kulturen gebildeten feuchten Häute mit Quarz und Kieselguhr zerrieben und dann unter einer hydraulischen Presse nach Zusatz von destilliertem Wasser oder Kochsalzlösung bei 400—500 Atmosphären

Druck ausspreßten. Das so gewonnene „Tuberkulo-Plasmin“ ist eine bernsteinfarbene klare Flüssigkeit, die viel hitzekoagulables Eiweiß enthält. Durch Kieselguhrfiltration kann das Präparat keimfrei gewonnen werden. Das Präparat hat katalytische Wirkung.

LANDMANN[82—84]) nahm eine fraktionierte Extraktion der Tuberkelbazillen mit Wasser, Kochsalz und Glyzerin vor, indem er die Extraktion bei 40° begann und erst allmählich zu höheren Temperaturen überging. Er glaubt auf diese Weise ein qualitativ von dem Tuberkulin verschiedenes Gift gewonnen zu haben, da sein „Tuberkulol“ auch die in der Kälte extrahierbaren Substanzen des Tuberkulin enthalte.

MARAGLIANO[94]) benutzt, um die Nebenwirkungen des Glyzerins zu vermeiden, wässerige Auszüge aus Tuberkelbazillen, ebenso v. RUCK[116]).

Endlich hat noch KOCH[74]) neue Verfahren zur Gewinnung von Tuberkulosegiften angegeben. Er zertrümmerte mechanisch (im Achatmörser oder in Kugelmühlen) gut getrocknete Bazillen. Der Staub wurde dann mit destilliertem Wasser extrahiert. KOCH gewann auf diese Weise einen Extrakt „TO“ genannt und den Rückstand „TR“. Zuletzt hat dann KOCH[75]) die ungetrennte Benutzung von TO und TR das „Neutuberkulin Koch Bazillenemulsion“ empfohlen. Alle diese Präparate sollten im wesentlichen in therapeutischer Hinsicht das alte Tuberkulin ersetzen. In diagnostischer Hinsicht haben sie sämtlich das ursprüngliche Tuberkulin nicht verdrängen können; das einfache Rohprodukt genügte offenbar den Ansprüchen.

Das Tuberkulin also, wie wir es heute in der Praxis zu diagnostischen Zwecken benutzen, wird fast ausschließlich nach einer der oben auf Seite 3 und 4 sub 1 und 2 beschriebenen Methoden gewonnen.

Chemische Natur des wirksamen Stoffes im Tuberkulin.

Man hat sich in der bakteriologischen Wissenschaft daran gewöhnt in flüssigen Kulturmedien gelöste Gifte der Bakterien Toxine und an den Bazillenleib geknüpfte Endotoxine zu benennen. v. BEHRING bezeichnet neuerdings die entsprechenden Gifte als Lytine und Somatine.

Angewandt auf das Tuberkulosegift kann man dieses sowohl als Toxin wie als Endotoxin bezeichnen, weil es sich sowohl frei in der Kulturflüssigkeit, als in der Leibessubstanz der Tuberkelbazillen befindet; denn auch die Tuberkelbazillenleiber vermögen in geeigneter Dosis die typische Tuberkulinwirkung hervorzurufen. Um also die chemische Natur des wirksamen Prinzips, das sich im Tuberkulin findet, zu ermitteln, kann man 2 Wege einschlagen: die Analyse des gelösten Toxins (Lytins), oder des am Bazillenleib haftenden Endotoxins (Somatins).

a) Analyse des gelösten Toxins.

Die ersten grundlegenden Untersuchungen über die Chemie des KOCHschen Tuberkulins rühren, abgesehen von den schon erwähnten Feststellungen KOCHS, KLEBS, HUEPPES und SCHOLLS, HUNTERS, von KÜHNE[80]) her; er züchtete auf einer Fleischextraktbouillon, der er bestimmte Mengen Pepton und Glyzerin zusetzte, Tuberkelbazillen, und untersuchte nach längerem Wachstum derselben die chemischen Veränderungen des Nährmediums. Er fand dabei nur eine geringe Zunahme von echtem, durch Ammonsulfat nicht aussalzbaren Pepton und einen

tryptophanähnlichen Farbstoff, sowie eine indolähnliche Substanz, die er deshalb vermutete, weil das alkoholische Extrakt des Tuberkulins beim Kochen mit Salzsäure und etwas Nitrit eine rote Farbe gab, ähnlich der Indolreaktion, allerdings nicht so purpurfarben wie diese. Vielleicht ist diese Substanz identisch mit dem Stoff, der den Tuberkulosekulturen ihren charakteristischen süßlich-aromatisch-obstähnlichen Geruch verleiht. Durch Alkoholfällung des Tuberkulins erhält man aus demselben ein Albumosengemisch, dessen Hauptbestandteil nach Kühne Deuteroalbumose ist. Die fraktionierte Alkoholfällung des Tuberkulins nach der Kochschen Vorschrift ist mit gewissen Schwierigkeiten verknüpft wegen der infolge des hohen Glyzeringehaltes klebrigen und harzigen Beschaffenheit der Niederschläge. Man benutzt deshalb zweckmäßiger die oben auf S. 4 sub 2 beschriebene Herstellungsmethode des Tuberkulins, nach der man die Kulturfiltrate allein eindampft. Man kann dann nach dem Vorgang Ruppels[117]) auf zwei Wegen zu Trockenpräparaten gelangen:

1) Durch Alkoholfällung des im Vacuum eingedickten Bouillonfiltrats (Vac. Tub. a). Durch Fällung mit 80 % Alkohol erhält man dabei etwa 10 g aus 1 Liter der ursprünglichen Bouillon, durch Fällung mit 66 % Alkohol 2,5 g Trockentuberkulin; es sind dies leicht lösliche hygroskopische Pulver, die aus geringen Mengen Akroalbumose, beträchtlicheren Mengen primärer Albumosen und in der Hauptsache aus Deuteroalbumosen bestehen (Ruppel).

2) Um das eingedickte Bouillonkulturfiltrat (Vac. Tub. a) zunächst von Glyzerin und Salz zu befreien, hat Ruppel[117]) dasselbe einer viertägigen Dialyse gegen strömendes Wasser unterworfen. Im Innern der Pergamentschläuche fand sich sodann ein Überzug von Heteroalbumose, die zum Teil in der Flüssigkeit noch suspendiert war und durch Zentrifugieren leicht entfernt werden konnte. Durch Alkoholfällung (80 %) dieses nach abgeschlossener Dialyse auf sein ursprüngliches Volumen wieder eingedickten Tuberkulins werden durchschnittlich 2 g Trockentuberkulin gewonnen, die zum mindesten zu 60 % aus Deuteroalbumosen bestehen. Die Art der Gewinnung dieser Präparate kann am besten aus der beifolgenden dem Heft 5 der Beiträge zur experimentellen Therapie[13]) entnommenen Tabelle sub a links entnommen werden.

Nach den Feststellungen Kühnes[80]) findet sich im eigentlichen Kochschen Tuberkulin ziemlich reichlich Akroalbumose; da diese in den nach der Ruppelschen Methode hergestellten Präparaten nur in sehr geringen Mengen sich fand, vermutet Ruppel[117]), daß die Hauptmenge dieser Substanz ihren Ursprung den Tuberkelbazillen selbst verdankt. Sie muß beim Auskochen der Bazillen mit der glyzerinhaltigen Bouillon extrahiert worden sein, darauf weist auch ihr Phosphorgehalt hin, der sich auch bei anderen aus den Tuberkelbazillen extrahierten Körpern findet.

Die spezifische Wirkung der durch Alkoholfällung aus dem Tuberkulin gewonnenen Präparate (über die sich quantitative Angaben in der bezeichneten Tabelle finden) ist geknüpft an Körper mit Albumosencharakter, und Hahn[47]) bezeichnet deshalb das Tuberkulin als eine „Toxalbumose". Helmann[52]) aber konnte nach vollkommener Alkoholfällung des Extraktes einer Tuberkelbazillenkartoffelkultur doch noch Tuberkulinwirkung im Filtrat nachweisen; auch muß hervorgehoben werden, daß Proskauer und Beck[109]) und Fraenkel[36]) in vollkommen eiweißfreien Nährmedien, auf denen Tuberkelbazillen gezüchtet waren, Tuberkulin nachweisen konnten. Die Albumosen sind also nicht der Giftstoff selbst, sondern nur Träger desselben.

Im ganzen ist man bisher bei der chemischen Analyse des eigentlichen Tuberkulins, was die Isolierung des wirksamen Prinzips betrifft, nicht sehr weit gekommen. Besser waren schon die Ergebnisse bei der Analyse der Bazillenleiber selbst.

b) Analyse der Bazillenleiber.

Die Tuberkelbazillen bestehen wie alle tierischen und pflanzlichen Lebewesen aus Eiweiß, Fett, Kohlehydratensalzen und Wasser. Die von dem flüssigen Kulturmedium getrennten Bazillen enthalten (vgl. Tabelle) durchschnittlich 84,0 % Wasser (nach HAMMERSCHLAG[50]) 85,9 %). Die Überführung in Trockenform kann durch Alkoholbehandlung (Alkohol-Tb.) geschehen, wobei die Bazillen gleichzeitig etwas ausgelaugt werden oder durch Einbringen in ein Vacuum (Vac.-Tb.).

Zur Extraktion der trocknen Bazillen kann man nun die verschiedensten Methoden anwenden. WEYL[135]) gewann mit verdünnter Lauge ein Extrakt, das sich durch Essigsäure in der Kälte fällbar erwies und das er deshalb als ein Mucin („Toxomucin") ansah. Hiergegen spricht aber der Phosphorgehalt desselben. Sein Extrakt stellt nach RUPPEL[117]) wohl ein Gemisch von Nukleoproteiden dar. RUPPEL verwandte die verschiedensten Methoden, z. B. verdünntes Alkali, Wasser und Glyzerin bei Siedehitze, Kochsalzlösungen und Verdauungsflüssigkeiten, um Extrakte zu bekommen. Dieselben zeigten sämtlich nur sehr unbedeutende Eiweißreaktionen und enthielten durch Essigsäure fällbare Substanzen. Bei Kombination verschiedener Extraktionsmittel konnte RUPPEL im ganzen 55 % der Trocken-Tb. extrahieren.

Einen bedeutsamen Fortschritt für die chemische Analyse der Tuberkelbazillen bedeutete das von KOCH[74]) zur Herstellung seines Neutuberkulins angegebene Verfahren, durch das die Tuberkelbazillen mechanisch zerkleinert und dann mit Wasser extrahiert werden, wodurch ein Extrakt „**TO**" und ein Rückstand „**TR**" entsteht. Schon durch einfaches Anreiben mit Wasser kann man aus zertrümmerten Trocken-Tb. (Alkohol-Tb. oder Vac.-Z.-Tb.) ein TO erhalten ,das 50 % des Gesamtgewichts der Tb. enthält. Die so gewonnene alkalische Lösung enthält keine koagulierbaren Eiweißkörper und gibt von allen Farbenreaktionen der Eiweißkörper nur eine deutliche Biuretreaktion, dagegen hat sie die Eigenschaft genuine Eiweißkörper aus ihren Lösungen auszufällen, muß also Nukleinstoffe enthalten. Durch Essigsäure erhält man eine Fällung, die sich frei von Schwefel erweist, aber Phosphor enthält. RUPPEL[117, 118]) identifizierte diesen Stoff als ein Nuklein (Tb.-Nuklein der Tabelle), aus dem er weiterhin ein spezifisch wirksames Protamin = Tuberkulosamin gewann. Die nicht durch Essigsäure fällbare Substanz erkannte RUPPEL als eine Nukleinsäure mit spezifischer Giftwirkung = Tuberkulinsäure (Tubs. der Tabelle). Der Phosphorgehalt dieser Säure beträgt 9—9,4 %, ihre Lösungen, die stark sauer reagieren, fällen genuine Proteine und Albumosen aus ihren Lösungen aus. Über die biologische Wirksamkeit dieser Nukleinsäure hat v. BEHRING[12]) genauere Angaben gemacht.

Sie charakterisiert sich als eine Nukleinsäure noch weiter dadurch, daß sie bei längerem Erhitzen auf dem Wasserbad einerseits (spezifisch unwirksame) Alloxurbasen liefert (geringe Mengen Xanthin und Adenin, reichlich Guanin) und anderseits eine phosphorhaltige spezifisch wirksame Säure, die Tuberkulo-Thyminsäure, mit starker spezifischer Wirksamkeit (vgl. Tabelle).

Durch Erhitzen der Tuberkulothyminsäure im Autoklaven erhält man nach Entfernung der reichlich entstandenen Phosphorsäure eine Lösung, welche mit Silbernitrat bei Gegenwart von Barythydrat einen gelben Niederschlag liefert. Dieser Niederschlag repräsentiert die Silberverbindung des **Tuberkulosins**, das in Form rhombischer Plättchen kristallisiert und dem ebenfalls noch die spezifische Giftwirkung anhaftet. Die chemische Natur dieses Stoffes ist noch nicht näher untersucht worden.

Ableitung der wichtigsten Tuberkulosegift-Präparate von der Tb.-Bouillonkultur.

a) 10 000 ccm Bouillonkultur.

- 9750 ccm bazillenfreies Filtrat = 100 000 + M^{tb}
  - 500 ccm Vac. Tub. a (bis zu höchstens 40^{0} erhitzt) = 1 500 000 + M^{tb}
    - entweder 50 g Tub. durch 80 % Alkohol gefällt = 1 200 000 + M^{tb}
    - oder 25 g Tub. durch 66 % Alkoh. gefällt = 1 000 000 + M^{tb}
    - oder 20 g Tub. dialysiert und mit 80 % Alkohol gefällt = 1 000 000 + M^{tb}
- 250 g Tb. feucht = ca. 1.200 000 + M^{tb}
  - 33 g Alkohol-Tb. = 500 000 + M^{tb} oder 40 g Vac.-Tb. = 800 000 + M^{tb}
    - 33 g Alkohol-Z.-Tb. oder 40 g Vac. Z.-Tb. = 1 600 000 + M^{tb}
      - 2,5 g Tubs. = 175 000 + M^{tb}
        - 1,2 g Tuberkulo-Thyminsäure = 72 000 + M^{tb}
          - 0,05 g Tuberkulosin = 2000 + M^{tb}
      - 8 g Tb. Nuklein = 480 000 + M^{tb}
        - 0,5 g Tuberkulosamin = 30 000 + M^{tb}
          - 0,02 g Tuberkulo-Lysin
      - 29,5 g Tb. R. = 600 000 + M^{tb}
        - 6 g Tb. R. Nuklein = 240 000 + M^{tb}
        - 23,5 g Tb. R. I = 235 000 + M^{tb}

b) 10 000 ccm Bouillonkultur bei 80—90^{0} eingedampft

- 1000 ccm Tuberkulinum Kochii = 2 000 000 + M^{tb}
- 200 g Tb.-Rückstand feucht = 1 000 000 + M^{tb}
  - 13 g Tb.-Fett resp. Wachs
  - 22 g E.-Tb. = 900 000 + M^{tb}
    - 8 g T. D. = 160 000 + M^{tb}
      - 0,3 g Tuberkulosin.
    - 14 g T. D. R. = 140 000 + M^{tb}

Aus dem erwähnten Tuberkulosamin gewinnt man durch Erhitzen mit Wasser, oder besser mit 5 % Oxalsäure im Autoklaven eine Lösung, die in eine Arginin-, eine Histidin- und eine Lysinfraktion (Tuberkulolysin, vgl. Tabelle) zerlegt werden kann.

Dem nach dem Abzentrifugieren des aus den Z.-Tb. gewonnenen TO zurückgebliebenen TR kann man durch 1 % Natronlauge noch etwas

Nuklein entziehen, das durch Essigsäure und Alkohol ausgefällt werden kann (Tb.R.-Nuklein). Der Rückstand Tb.R. besteht zum großen Teil aus anorganischen Bestandteilen, aus Fetten bezw. Wachsarten und aus sehr widerstandsfähigen unlöslichen, nach HAMMERSCHLAG[50]) der Zellulose, nach MICHIMURA[96]) der Hemizellulose ähnlichen Körpern. Nach RUPPEL[117]) gehören sie zu der Klasse des Keratins oder Chitins nahestehenden Proteinoiden.

Die anorganischen Bestandteile bestehen nach DE SCHWEINITZ und DORSET[123–125]) aus Natriumoxyd, Kaliumoxyd, Kalziumoxyd, Kohlenstoff, Magnesia, Kieselsäure und Phosphorsäure.

Der Fettgehalt der Tuberkelbazillen ist nach den Angaben der Autoren verschieden groß (HAMMERSCHLAG[150]) 26,2 %, KLEBS[68]) 22 %, DE SCHWEINITZ und DORSET[123]) 37 %, ARONSON[4, 5]) 20—25 %, RUPPEL[117]) 8—10 bis zu 25—26 %, KREISLING[77]) 39 %). Nach RUPPEL[117]) muß man unterscheiden zwischen Fetten, die in kaltem Alkohol löslich sind (freie Fettsäuren und Glyzeride), zweitens Fette, die in heißen Alkohol übergehen (Palmitin- und Stearin-Säureester höherer Alkohole) und ätherlöslichen Fetten, welche ebenfalls Fettsäureester höherer Alkohole sind. Diese sämtlichen Fette bzw. Wachse sind spezifisch unwirksam. Durch Erhitzen der entfetteten Tb. (E.Tb. in der Tabelle sub b) mit glyzerinhaltigem Wasser im Autoklaven erhält man einen durch Filtration trennbaren Rückstand = TDR. und ein klares Filtrat TD, das ein wertvolles Ausgangsmaterial für die Isolierung des Tuberkulosins und der Spaltungsprodukte des Tuberkulosamins bildet.

Alle geschilderten eingreifenden Prozeduren, die zum Teil noch mit starker Erhitzung der Präparate verbunden sind, zeigen die außerordentliche Widerstandsfähigkeit des wirksamen Prinzips im Tuberkulin an. Im Gegensatz zu KOCH fanden wir[13]) das Tuberkulin nur sehr wenig dialysierbar, selbst in Form der gereinigten Präparate; von Bedeutung ist hierbei allerdings die Art der benutzten Dialysatoren.

Wertbestimmung des Tuberkulins.

Für die Bestimmung der Wirksamkeit von Bakteriengiften sind wir auf physiologische Prüfungsmethoden angewiesen. Es genügt nicht wie bei vielen anderen pflanzlichen Giften ein Abwägen oder Abmessen des betreffenden Präparates, da auch bei chemisch und physikalisch sich gleich verhaltenden Rohprodukten die biologische Wirksamkeit innerhalb weiter Grenzen schwanken kann. Es ist bekannt, mit welcher Genauigkeit man z. B. das Diphtheriegift oder das Tetanusgift auf diese Weise bewertet.

Der quantitativen Austitrierung des Tuberkulins stehen aber gewisse Schwierigkeiten im Wege. Während wir zur Giftwertbestimmung des Diphtherie- und Tetanusgiftes normal sich verhaltende Tiere einer bestimmten giftempfindlichen Spezies, nämlich Meerschweine und Mäuse, benutzen, denen wir die Gifte subkutan applizieren und unter Benutzung eines genügend großen Tiermaterials Wertbestimmungen ausführen können, die in ihrer Präzision kaum von den Toxizitätsbestimmungen chemisch wohl definierter Gifte abweichen, stoßen wir bei der Tuberkulinbewertung auf die Schwierigkeit, daß unsere gebräuchlichen kleinen Laboratoriumstiere, wofern sie nicht tuberkuloseinifiziert sind, nahezu unempfindlich gegen das Tuberkulin vom Unterhautbindegewebe aus sind. Zu ihrer Tötung müßte man so große Dosen anwenden, daß andere mit der

Tuberkulinwirkung nicht zusammenhängende Faktoren (Glyzerin-, Salz-, Peptonwirkung) ihren Einfluß störend geltend machen würden. Die Benutzung der stärker empfindlichen Pferde, Ziegen und Schafe zum Zweck der Giftbewertung verbietet sich schon aus finanziellen Gründen.

Diese Schwierigkeiten in der Tuberkulinbewertung könnten vielleicht umgangen werden, wenn man ausschließlich hochgiftige Präparate benutzte, von denen ein Bruchteil der Dosis des gewöhnlichen Tuberkulins genügt, um auch gesunde kleine Laboratoriumstiere, etwa Meerschweine, zu töten. Allein in der Praxis müssen wir mit dem weniger giftigen Handelstuberkulin rechnen, das, wie erwähnt, wegen seines hohen Glyzerin-, Salz- und Peptongehaltes ungeeignet ist zur Prüfung an gesunden Tieren.

Diese Schwierigkeiten hat von Lingelsheim [88]) dadurch zu umgehen gesucht, daß er eine intrazerebrale Injektion des Giftes in Anwendung brachte. Hierbei erwiesen sich nach seinen Feststellungen gesunde Meerschweine gegenüber verschiedenen Tuberkulosegiftpräparaten ca. 180 mal empfindlicher als bei subkutaner Giftinjektion. Gegen diese Prüfungsmethode hat Neufeld [95]) einige Bedenken erhoben, die hauptsächlich darauf hinauslaufen, daß vom Gehirn aus Meerschweine auch gegenüber anderen nicht spezifisch wirksamen Bestandteilen der Tuberkulosegifte empfindlicher sind. Mit Recht hebt aber von Behring [12]) demgegenüber hervor, daß Neufeld versäumt hat, nach der Lingelsheimschen Methode gesunde Meerschweine einerseits, tuberkulöse Tiere andererseits vergleichend zu prüfen. Wie Verfasser kürzlich feststellen konnte, kann unter gewissen Bedingungen die Lingelsheimsche Prüfungsmethode recht gute Resultate zeitigen. Tatsächlich eignet sie sich aber doch nur zur Prüfung wirksamerer Präparate, als es das gewöhnliche Handelstuberkulin ist. von Lingelsheim hat selbst nur nach besonderen Methoden gewonnene, stärker wirksame Präparate benutzt. Die Anwendung seiner Methode zur Prüfung des Handelstuberkulins an gesunden Meerschweinen dürfte sich auf Grund einer sehr einfachen Berechnung verbieten. Die Tuberkulosegiftempfindlichkeit gesunder, d. h. nicht tuberkuloseinfizierter Meerschweine ist im allgemeinen ca. 100 mal geringer als die tuberkulöser Tiere derselben Art. Man würde also zur Tötung eines gesunden Meerschweines von 400 g etwa 20 ccm Tuberkulin bei subkutaner Injektion brauchen; denn, wie wir weiter unten sehen werden, benötigen wir zur Tötung tuberkulöser Meerschweine ca. 0,2 ccm. Diesen 20 ccm bei Injektion in das Unterhautbindegewebe entspräche bei intrazerebraler Injektion eine Dosis von ca. 0,12 ccm. Die Anwendung solch großer Dosen Tuberkulin vom Gehirn aus verbietet sich aber angesichts der großen Menge Glyzerin im Kochschen Tuberkulin.

Eine genaue Bewertung erscheint aber trotzdem dringend nötig, nicht allein für wissenschaftliche Laboratoriumsversuche, sondern auch für die Bedingungen der Praxis speziell für diagnostische Zwecke; denn nur unter Zugrundelegung einer einheitlichen Methode, die die Benutzung der genau gleichen Giftdosis zur Voraussetzung hat, kann man zu vergleichbaren Resultaten und zu einheitlichen Grundsätzen über die Beurteilung der Tuberkulinreaktion kommen. Die Herstellung des Tuberkulins nach einheitlicher Methode garantiert bei weitem nicht Präparate von gleicher Giftigkeit. Schon geringe Differenzen in der Art der Kulturmedien, der Züchtungstemperatur, der Art der Züchtung, der Art der Kultur, ihrer Wachstumsintensität und Giftproduktion können zu quantitativ sehr verschieden wirksamen Präparaten führen.

Koch[73]) ging bei der Bewertung des Tuberkulins von tuberkulösen Meerschweinchen aus, denen er abgestufte Mengen Tuberkulin unter die Haut spritzte. Er machte aber schon mit Recht darauf aufmerksam, daß die Auswahl der tuberkulösen Tiere nicht ganz gleichgültig ist, da je nach dem Stand des Tuberkuloseprozesses die Empfindlichkeit innerhalb weiter Grenzen schwanken kann. Wählt man z. B., wie Verfasser[113]) hervorgehoben hat, Meerschweine, die mit einer großen Dosis einer hochvirulenten, stark giftigen Kultur geimpft sind, so erweisen sich diese Tiere oft sehr wenig empfindlich gegen Tuberkulin; der Tuberkuloseprozeß kann unter Umständen so rasch verlaufen, daß es gar nicht zum Eintritt der charakteristischen Überempfindlichkeit kommt. Wählt man andererseits sehr schwach infizierte Tiere, so kann es Wochen, selbst Monate dauern, bis der gewünschte Grad der Überempfindlichkeit erreicht ist. Im Marburger Institut benutzen wir daher eine mittelstarke Infektion mit einer mäßig virulenten Kultur, die erfahrungsgemäß in 8 Wochen ausgewachsene Meerschweine an Tuberkulose tötet. Wir benutzen die Meerschweine in der 4. oder 5. Krankheitswoche zur Prüfung mit abgestuften Mengen des Tuberkulins. Als Kriterium für die Bewertung kann man die krankmachende Wirkung oder die tödliche Wirkung heranziehen. Wir benutzen im allgemeinen nur die tödliche Wirkung, d. h. den Todeseintritt des geprüften Tieres in spätestens 48 Stunden nach der Injektion mit dem charakteristischen Befund. Derselbe besteht in einem Ödem an der Injektionsstelle, lebhafter Rötuug der Milz und Leber und zirkumskripten Rötungen um die tuberkulösen Lungenherde; die zu den Unterhautdrüsen führenden Blutgefäße pflegen stark gefüllt zu sein. Der Tod erfolgt in der Regel unter starkem Temperaturabfall nach anfänglicher Steigerung der Körpertemperatur. Bei Anwendung vielfacher Multipla der tötlichen Minimaldosis kann das Fieber vollkommen fehlen und der Abfall der Temperatur sofort einsetzen, auch werden bei solchem ganz akuten Verlauf häufig auch die anderen geschilderten Symptome, die übrigens auch bei langsamerem Verlauf der tödlichen Vergiftung nicht immer sämtlich sich finden, vermißt. Die Krankheitserscheinungen bei Injektion nicht tödlicher Dosen bestehen in hohem Fieber, lokaler Schwellung und allgemeiner Mattigkeit der Tiere. Für die Bewertung des Tuberkulins benutzen wir aber in der Regel als Kriterium den Todeseintritt und wir drücken den Giftwert aus in $+ M^{tb}$, d. h. in tödlichen Dosen für so und so viel Gramm Gewicht tuberkulöser Meerschweine ($1 + M^{tb} =$ tödliche Dosis für 1 g Lebendgewicht eines Meerschweins in bestimmtem Stadium der tuberkulösen Erkrankung). Bei extakter Dosierung und Auswahl von gleich infizierten und gleich schweren Meerschweinen (die nicht gravid sein dürfen) kann man mit großer Bestimmtheit auf eine gleiche Empfindlichkeit rechnen; wenigstens haben wir bei genauer Beachtung dieser Momente nie mit den von Dönitz[23]) beklagten individuellen Schwankungen in der Giftempfindlichkeit zu rechnen gehabt. Indes kann man noch genauer vorgehen, wie dies unter anderem auch nach den Angaben Ottos[105]) im Frankfurter Seruminstitut geschieht, wo die Handelstuberkuline einer exakten Prüfung unterzogen werden. Die eingesandten Tuberkuline werden dort eingestellt auf ein „Standardtuberkulin" von bekanntem Wert. Der mit Hilfe dieses gefundene Wert wird benutzt als Maßstab für die Giftigkeitsbestimmung des zu prüfenden Präparates. Die Tuberkulinbewertung erfolgt nach den Angaben Ottos folgendermaßen: „Eine größere Zahl Meerschweinchen (etwa 40—50) von annähernd gleichem Gewicht (360—400 g) werden mit Tuberkelbazillen

infiziert. Zu diesem Zweck wird eine bestimmte Menge Tuberkelbazillen (frische, 12—14tägige Bouillonkultur) auf einer chemischen Wage genau abgewogen und mit so viel physiologischer Kochsalzlösung verrieben, daß in $^1/_2$ ccm genau $^1/_2$ mg Kultur enthalten ist. Von dieser Aufschwemmung erhält jedes Meerschweinchen $^1/_2$ ccm subkutan injiziert.

Sobald diese Tiere tuberkulös geworden sind, was durch die fortschreitende Gewichtsabnahme, welche gegen das Ende der 3. Woche einsetzt, erkannt werden knnn, werden die zum Prüfungsversuch geeigneten Meerschweinchen herausgesucht*). Mit diesen Tieren werden 2 Parallelreihen angesetzt. Die 1. Reihe erhält fallende Dosen Standardtuberkulin, um die minimal tödliche Dosis zu ermitteln, die 2. homologe Dosen des zu prüfenden Tuberkulins. Da in der Regel schon 0,1 - 0,25 ccm zur Tötung der „reifen" Tiere innerhalb 24 Stunden genügen, so wählt man zu der Ausführung der Versuche am zweckmäßigsten Tuberkulindosen von 0,05 ccm bis zu 0,3 ccm. Zur genaueren Dosierung wird eine Verdünnung der Tuberkulinpräparate von 1 : 10 (mit physiologischer Kochsalzlösung) hergestellt. Von dieser Verdünnung injiziert man 0,5 bezw. 1,0—1,5—2,0—2,5—3,0 ccm subkutan.

Nach 24 Stunden ist die Prüfung beendigt. Aus dem Vergleich der Wirkung beider Präparate ist die Kompetenz des zu prüfenden Präparates ermöglicht. Sterben in beiden Versuchsreihen die Tiere, welche gleiche Dosen erhalten haben, und zeigen dieselben den für die Tuberkulinvergiftung typischen Befund, so wird das neu zu bewertende Tuberkulin als dem Standardtuberkulin gleichwertig und somit als den Anforderungen genügend angesehen. Bleiben dagegen in der 2. Reihe Tiere leben, während die in der 1. mit den gleichen Mengen Tuberkulin behandelten Meerschweinchen eingehen, so wird das Tuberkulin als minderwertig zurückgewiesen. Auch im anderen Falle, wenn es eine zu kräftige Wirkung entfaltet, wird es beanstandet und erst zugelassen, wenn es (je nach dem Grade der ermittelten Stärke) so weit verdünnt ist, daß seine Wirkung dem des Standardtuberkulins entspricht.

Im Frankfurter Institut werden die Präparate außerdem auf Keimfreiheit, auf Klarheit und daraufhin untersucht, ob sie mikroskopisch keine Tuberkelbazillen enthalten.

Kultur-Nr.	Bouillon-Kultur-Filtrat	Tuberkulin (eingedampft auf $^1/_{20}$)
1 (schwach virulente Mensch-Tb.	1 ccm = 80 + M	1 ccm = 1600 + M
8 mäßig virulente Rind-Tb.	1 ccm = 200 + M	1 ccm = 6000 + M
2015 stark virulente Rind-Tb.	1 ccm = ca. 200 + M	1 ccm = 5000 + M

*) Es empfiehlt sich am Ende der 4. bis 5. Woche durch einen Vorversuch zunächst zu prüfen, ob die infizierten Meerschweinchen schon für den Prüfungsversuch „reif" sind. Zu diesem Zwecke injiziert man zweien bis vieren der Tiere 0,3 bis 0,5 ccm Standardtuberkulin. Die erstere Dosis muß hinreichen, um die Tiere akut innerhalb 24 Stunden zu töten. Tötet 0,3 die Tiere nicht, so wartet man noch einige Zeit mit der Anstellung des Prüfungsversuches.

Bereits oben wurde erwähnt, daß man zur Gewinnung des Tuberkulins auch von dem klaren Bouillonkulturfiltrat (ohne Bazillen) ausgehen kann. Um gewisse Anhaltspunkte für die Prüfung des aus solchen Filtraten hergestellten Tuberkulins zu gewinnen, kann man auch schon Vorprüfungen des Giftgehaltes solcher Filtrate vornehmen. Der Giftgehalt des daraus gewonnenen konzentrierten Tuberkulins entspricht dann in der Regel ziemlich genau der Stärke der Eindickung — ein Zeichen, daß also bei der Konzentration nichts von spezifisch wirksamen Bestandteilen verloren geht. Die nachfolgende Tabelle enthält einige solcher vergleichender Prüfungen von Bouillonkulturfiltraten und daraus gewonnenen eingedickten Tuberkulinen z. T. von Menschen-, z. T. von Rinder-Tb. herrührend.

Aus dieser Tabelle ergibt sich zunächst, daß die virulenteren Stämme im allgemeinen auch stärker wirksames Tuberkulin liefern; gelegentlich gewinnt man jedoch auch aus den stark virulenten Rind-Tb. ein schwächeres Tuberkulin. Wir glauben aber trotzdem, daß die stärkere Giftproduktion der virulenteren Stämme eine Gesetzmäßigkeit ist; denn in den zuletzt genannten Fällen von geringerer Tuberkulinproduktion liegt nur scheinbar eine geringere Giftbildung vor. Berechnet man nämlich die gebildeten Giftmengen auf die Menge der auf der gleichen Bouillonmenge gewachsenen Tb., so ergibt sich ausnahmslos die stärkere Giftbildung der virulenteren Kulturen. In den oben in der Tabelle näher geschilderten Versuchen hatten z. B. die Tb. 1 geliefert pro 1 l Bouillon 5 g Trocken-Tb., die Tb. Nr. 8 dagegen 3,2 g und die Tb. Nr. 2015 nur 2,9 g. Auf die Trocken-Tb.-Menge berechnet würde sich also statt des ermittelten drei- bis viermal stärkeren Giftwertes ein sechsmal größerer für die Kulturen 8 und 2015 ergeben.

In Kulturen von Hühner-Tb. oder den homogenen Kulturen Arloings fanden wir geringere Giftmengen als in den Säugetier-Tb.-Kulturen. Qualitativ verhielt sich aber das von ihnen gebildete Gift wie das „Säugetiertuberkulin“.

Der Japaner Kanda[64]) prüfte am tuberkulösen Rind vergleichend zwei Tuberkuline, das eine von Tb. menschlicher, das andere von Tb. boviner Provenienz herrührend, indem er von den Angaben Kochs über die verschiedene Natur der vom Menschen stammenden Tb. und der vom Rinde stammenden „Perlsuchtbazillen“ ausging. „Da die Infektiosität beider Tuberkelbazillen nach dem Kochschen Versuche verschieden ist, kann auch wohl eine Verschiedenheit beider Tuberkuline in bezug auf die Reaktion erwartet werden.“ Er fand eine deutlichere typischere Reaktion nach Injektion des „Rindtuberkulins“; 0,3 ccm desselben entsprachen etwa 0,5 ccm „Menschtuberkulin“. „Für die Diagnose ist das Tuberkulin von Rinder-Tb. (R.-Tuberkulin) zweckmäßiger und zuverlässiger als das von Menschentuberkelbazillen (M.-Tuberkulin).“ Wenn auch Kanda nicht expressis verbis eine qualitative Differenz der beiden Tuberkuline ausspricht, so könnte der Unerfahrene doch leicht seiner Interpretation diese Deutung geben. Tatsächlich handelt es sich aber auch hier nur um jene geschilderten quantitativen Differenzen. Der promptere Eintritt der Reaktion wäre ebenso gut nach einer entsprechend größer gewählten Dosis Menschentuberkulins erfolgt.

Endlich sei noch bemerkt, daß der durch exakte Prüfungen ermittelte Giftwert des Tuberkulins sich anscheinend unbegrenzt hält.

Diagnostische Anwendung des Tuberkulins.

I. Bei Rindern.

Vergleicht man die Entwicklung, die die Wertschätzung des Tuberkulins in der menschenärztlichen Praxis einerseits und in der Veterinärmedizin anderseits genommen hat, so ist kein Zweifel, daß die veterinärärztliche Wissenschaft die wirkliche Bedeutung des Tuberkulins rascher erkannt hat. Während nämlich in der medizinischen Literatur Publikationen auf Publikationen sich drängten, die sich mit dem Heilwert des neuen Mittels beschäftigten und begeisterte Anhänger mit leidenschaftlichen Gegnern auf dem literarischen Kampfplatz rangen, verschaffte sich langsam aber sicher das Tuberkulin in der Veterinärmedizin Eingang und Anerkennung, weil man von vornherein hier mehr der Eigenschaft des neuen Mittels seine Aufmerksamkeit zuwandte, die sich als dauernd wertvoll und nützlich erwies, nämlich seiner diagnostischen Bedeutung.

Die ersten tastenden Versuche, häufig vorgenommen nur an wenigen Tieren, ja oft nur an einem einzigen Rinde, haben heute angesichts der großen Erfahrungen, die man an tausend und abertausend Rindern mit dem Tuberkulin als Diagnostikum gemacht hat, in ihrer Kleinheit und Unbeholfenheit fast etwas Rührendes, jedoch bildeten sie die erste wertvolle Grundlage für die Aufstellung bestimmter Prinzipien in der Beurteilung des Tuberkulins (vgl. die Literaturzusammenstellung am Schluß).

Die Veterinärmedizin lernte vor allen Dingen sich bald bei der Beurteilung der diagnostischen Brauchbarkeit des Tuberkulins vor dem falschen Schluß zu hüten, der in der Menschenpraxis so oft gemacht wurde und heute noch gemacht wird, nämlich das Ergebnis der klinischen Untersuchung als Grundlage für die Beurteilung der diagnostischen Brauchbarkeit des Tuberkulins zu betrachten. Unter Zugrundelegung dieses Maßstabes würden die Fehlresultate des Tuberkulins in der Veterinärpraxis geradezu enorm sein. Gegenüber dem Menschenarzt aber befand sich der Veterinärmediziner insofern erheblich im Vorteil, als es ihm in vielen Fällen ohne weiteres möglich war, das Ergebnis der Tuberkulinprüfung durch Aufnahme eines Schlachtungsbefundes zu kontrollieren. Auch hier zeigte sich bald, daß eine oberflächliche Inspektion des geschlachteten Tieres etwa gar im Sinne der Aufnahme der gewöhnlichen Schlachthausbefunde nicht genügt, sondern daß eine minutiöse Untersuchung aller Organe insbesondere der Drüsen, ev. unter Zuhilfenahme des Miskroskops erfolgen muß, wenn man zu einem gerechten Urteil über den diagnostischen Wert des Tuberkulins kommen will. „Es kann deshalb nicht stark genug hervorgehoben werden, daß ein immenser Unterschied dazwischen existiert, was man früher „tuberkulös" genannt hat und was wir jetzt auf Grundlage der Tuberkulinreaktion mit diesem Beiwort bezeichnen müssen. Wenn ein reagierendes Tier geschlachtet wird, bemerkt der Schlächter sehr oft keine Spur von Tuberkulose, ja selbst der Tierarzt muß oft recht genau aufpassen, um die kleinen Knoten in den Lymphdrüsen — namentlich den retropharyngealen, mesenterialen, mediastinalen und bronchialen —, welche so oft den einzigen pathologischen Befund abgeben, zu entdecken" (Bang [10]). In einem kritischen Sammelreferat stellte Eber [27]) alle bis zum 1. Februar 1892 ausgeführten Tuberkulinversuche an Rindern zusammen; er berücksichtigte in seiner Statistik

von den positiven Tuberkulosebefunden nur die, in denen die Tuberkulose durch pathologische Befunde oder den Nachweis der Tuberkelbazillen bei Lebzeiten gesichert war, ließ dagegen bei negativen Befunden alle die Fälle unbeachtet, in denen nicht eine gründliche und sachgemäße Untersuchung des Kadavers erfolgt war. Unberücksichtigt blieben ferner die Tuberkulinprüfungen an bereits fiebernden Tieren und als positive Reaktion wurden alle die betrachtet, bei denen eine Erhöhung der Körpertemperatur um mindenstes 0,5° eingetreten war. Berücksichtigt man weiter, das Eber vollkommen und zwar absichtlich die angewandten Tuberkulindosen unberücksichtigt gelassen hat, daß er die zeitlichen Zwischenräume zwischen den einzelnen Temperaturmessungen, sowie den Beginn der Temperaturmessungen nicht beachtet hat, so ist es doch recht bemerkenswert, daß er nur in 12,55 % der Fälle ein Fehlresultat der diagnostischen Impfung fand, d. h. Fehlen von Tuberkulose bei positiver Reaktion oder Vorhandensein der Tuberkulose bei negativer Reaktion. Eber schließt sein Referat folgendermaßen: „Berücksichtigt man hierbei einerseits, daß einzelnen negativ ausgefallenen Versuchen nur eine geringe Beweiskraft zuzusprechen ist, daß aber bei der im Verhältnis geringen Anzahl einwandfreier Versuche jedes negative Ergebnis außerordentlich schwer ins Gewicht fällt, und die Verhältniszahlen stark gegeneinander verschiebt und zieht man dann anderseits in Betracht, daß die Mehrzahl der bei der Schlachtung tuberkulös gefundenen Tiere bei Lebzeiten keinerlei Symptome erkennen ließ, aus denen auf das Vorhandensein der Krankheit geschlossen werden konnte, so muß man einräumen, daß wir in dem Tuberkulin ein äußerst schätzenswertes Hilfsmittel zur Erkennung der Tuberkulose intra vitam beim Rinde kennen gelernt haben.“

Nach den Feststellungen Bangs[10]) betragen die Fehlresultate nur 9,7 % und einer Berechnung von Voges[134]) zufolge sogar nur 2,78 %. Auf Grund solcher exakter Feststellungen mehrten sich immer mehr die Anhänger des Tuberkulins und dasselbe nahm als Diagnostikum in der Veterinärmedizin ziemlich ungehemmt seinen Siegeslauf, gefördert durch gewichtige Stimmen, wie die von Nocard, Siedamgrotzky, Bang, Eber, Malm und Hutyra. Bereits 1895 faßte der VI. internationale Kongreß zu Bern eine Resolution, die die Bedeutung des Tuberkulins als Diagnostikum voll anerkannte. Der glänzendste Beweis für die Anerkennung der Bedeutung des Tuberkulins ist wohl darin zu erblicken, daß Bang, gestützt auf seine reichen Erfahrungen, die Tuberkulindiagnostik als Grundlage für seinen groß angelegten Bekämpfungsplan der Rindertuberkulose wählen konnte.

Einwände gegen Anwendung des Tuberkulins. Der von manchen gegebene Hinweis auf Gehalt des Tuberkulins an lebenden Tuberkelbazillen ist unberechtigt. Schon die Herstellungsweise des Tuberkulins garantiert sein Freisein von lebenden Tuberkelbazillen. Ferner hat man auf die diagnostischen Fehlresultate hingewiesen, z. B. auf das Vorhandensein der Tuberkulose bei fehlender Reaktion. In solchen Fällen besteht aber entweder eine so ausgedehnte Tuberkulose, daß sie sich schon ohne weiteres klinisch verrät, oder es handelt sich um einige kleine, vollkommen abgeheilte, abgekapselte Herde. In beiden Fällen sind die Fehlresultate praktisch bedeutungslos. Ferner hat man auf die gelegentlich bei gesunden d. h. tuberkulosefreien Tieren beobachteten positiven Tuberkulinreaktionen hingewiesen. Manchen dieser Beobachtungen gegenüber ist vielleicht die Mahnung Nocards[103]) angebracht,

der er 1895 in Bern Ausdruck gab: „Suchen sie, wenn sie den durch das Tuberkulin angezeigten Herd nicht gefunden haben und sagen sie einfach, sie haben ihn nicht gefunden, aber nicht, daß ein solcher nicht existiert." Immerhin haben neuere experimentelle Erfahrungen gezeigt, daß es eine positiven Tuberkulinreaktion bei fehlender anatomischer Tuberkulose gibt. Infiziert man nämlich ein Rind mit schwachvirulenten Tuberkelbazillen, die bei ihm niemals tuberkulöse Herdbildung veranlassen, beispielsweise mit dem Behringschen Bovovaccin, so tritt trotzdem eine typische Tuberkulin-Überempfindlichkeit ein. Solche Erfahrungen zeigen uns, was die theoretische Seite der Frage betrifft, daß zwar eine positive Tuberkulinreaktion eine Tuberkuloseinfektion, nicht aber eine anatomische Tuberkulose, d. h. tuberkulöse Herderkrankungen des Organismus anzeigt, praktisch aber wird diesem Moment keine große Bedeutung zukommen, da die natürliche Infektion des Rindes in der Regel durch Tuberkulosevirus erfolgt, welches Herderkrankungen im Organismus des Rindes hervorruft. Immerhin wäre es doch in dem einen oder andern Fall, wo auf Tuberkulin reagierende Rinder trotz genauester Untersuchung ihrer Organe tuberkulosefrei befunden werden, denkbar, daß in solchen Fällen eine natürliche Infektion des Rindes durch schwachvirulentes Tuberkulosevirus stattgefunden hat [Römer [114])]. Bemerkt sei noch, daß die Tuberkulin-Überempfindlichkeit nach solchen Infektionen mit schwachvirulenten Tuberkelbazillen nur eine vorübergehende ist.

Der Einwand, daß auch bei anderen Erkrankungen, z. B. Aktinomykose, Rinder auf Tuberkulin reagieren, ist auch noch nicht genügend begründet. Bei der ungeheuren Ausdehnung der Rindertuberkulose ist es wohl möglich, daß in solchen Fällen neben der Aktinomykose auch noch eine latente Tuberkulose vorgelegen hat.

Die insbesondere von Hess [54]) seinerzeit ausgesprochene Befürchtung, das Tuberkulin könne den Verlauf der Tuberkulose beim Rind beschleunigen, hat auch nicht die praktische Bedeutung des Tuberkulins in der Praxis vermindern können. Nocard konnte nur in 3 von 3000 Fällen Auftreten von Miliartuberkulose im Anschluß an die Tuberkulinprüfung feststellen, und selbst in diesen Fällen ist ihm ein „post hoc" wahrscheinlicher als ein „propter hoc". Verfasser konnte bei 2000 Rinderimpfungen einen einzigen Fall feststellen, wo nachweislich das Tuberkulin den Tod eines Rindes veranlaßt hatte; es handelte sich um einen Tuberkel in der Medulla oblongata; die durch die Tuberkulininjektion bewirkte entzündliche Hyperämie in der Umgebung lebenswichtiger Zentren hatte in diesem sicherlich zu den seltensten Ausnahmen zählenden Fall den Tod veranlaßt.

Endlich hat man die diagnostische Bedeutung des Tuberkulins mit dem Hinweis auf das Erlöschen der Tuberkulinreaktion nach einmal stattgehabter Tuberkulinprüfung herabzusetzen gesucht. Daß dieses Moment in der Tat eine praktische Bedeutung bekommen kann, beweist unter anderem sehr drastisch die Tatsache, daß unter 40 000 im Jahre 1901 in Deutschland vom Ausland her eingeführten Rindern trotz negativer Tuberkulinreaktion 7000 = 17,5 % bei der Schlachtung tuberkulös befunden wurden, zum größten Teil offenbar infolge einer trügerischen Vorprüfung mit Tuberkulin. Dieses Ausbleiben der Reaktion, das Gutman [45]) übrigens auch experimentell demonstriert hat, braucht aber praktisch keine Bedeutung zu bekommen, wenn man die von Vallée [132]) gemachten Feststellungen beachtet. Er zeigte nämlich, daß in solchen

Fällen die Tuberkulinreaktion früher auftritt, auch kürzer dauert als gewöhnlich. Beginnt man also in solchen Fällen schon bald nach der Tuberkulininjektion mit den Temperaturmessungen und wählt überdies die doppelte Menge der Tuberkulindosis, so kann diese Gefahr ebenfalls leicht vermieden werden.

Es besteht daher auch heute noch jener schon 1902 von EBER[27]) aufgestellte, oben zitierte Satz von der diagnostischen Bedeutung des Tuberkulins für die allgemeine Praxis zu Recht. Und ebenso besteht, was die Beurteilung des einzelnen Falles betrifft, der Satz BANGS[10]) zu Recht: „Die Tuberkulinreaktion allein gibt meiner Meinung nach keinen in gerichtlichen Fragen hinlänglichen Beweis für die Gegenwart der Tuberkulose, und der negative Erfolg einer Tuberkulinimpfung gibt noch weniger einen absoluten Beweis für die Abwesenheit der Tuberkulose."

Ausführung der Impfung.

1. Dosierung. Es ist, wie erwähnt, dringend nötig, zur diagnostischen Impfung genau auf ihren Giftwert eingestellte Tuberkuline zu benutzen. Das eingespritzte Flüssigkeitsvolum ist dabei ziemlich gleichgültig, wenn nur jedesmal die gleiche Menge wirksamer Substanz appliziert wird. Da nun in Deutschland alles Tuberkulin einer staatlichen Kontrolle unterliegt und nur Tuberkuline von ungefähr gleichem Giftwert in den Handel gelangen, hat man sich daran gewöhnt, die diagnostische Dosis für das Rind in Volumeinheiten zu bezeichnen.

Man gibt erwachsenen Rindern in der Regel 0,5 ccm, den ein- bis zweijährigen 0,3 ccm und den noch jüngeren Tieren 0,2 ccm staatlich geprüften Tuberkulins. Für die Einspritzung stellt man sich mit 0,4 % Karbolwasser eine 10fache Verdünnung des Originaltuberkulins her. Zu diesem Zweck gießt man in einen graduierten Meßzylinder soviel Tuberkulin ein, als man voraussichtlich in den nächsten zwei Tagen verbrauchen wird*) und fügt dann neunmal so viel mit abgekochtem Wasser hergestellter 0,4 %iger Karbollösung hinzu. Von der 10fachen Verdünnung sind dementsprechend einzuspritzen 5, 3 und 2 ccm. Die gesamte Flüssigkeitsmenge gießt man zweckmäßig aus dem Meßzylinder in eine Flasche mit weitem Hals ein, aus welcher die Einzeldosen mit der Injektionsspritze eingesogen werden.

Eine andere Dosierung erfordern lediglich die Fälle, in denen man eine (zu betrügerischen oder anderen Zwecken vorgenommene) Vorprüfung des Rindes mit Tuberkulin vermutet, z. B. also bei allen Rindern, die von dem Ausland her importiert werden. Nach dem Vorschlage VALLÉES wenden wir in solchen Fällen die doppelte Dosis an, also 1,0 bezw. 0,6 bezw. 0,4 ccm Originaltuberkulin oder 10, 6 und 4 ccm der 10fachen Verdünnung.

2. Technik der Injektion. Als Injektionsspritze benutzt man eine Asbeststempelspritze, welcher mindestens drei starke Kanülen beigegeben sind. Vor Beginn und nach Beendigung der Impfungen ist die Spritze mit 2,5 %iger Karbollösung gut auszuspülen. Die Kanülen sollen jedesmal mit karbolgetränkter Watte abgerieben werden, ehe sie bei einem Rinde zur Verwendung kommen. Der Stempel der Spritze trägt

*) Die Verdünnungen halten sich allerdings länger als 2 Tage (bis zu 3 Monaten); immerhin ist es empfehlenswert, nicht unnütz große Mengen der Verdünnung sich von vornherein zu bereiten.

zweckmäßig eine Einteilung in einzelne Kubikcentimeter und einen Schieber, mit Hilfe dessen die Dosierung sehr vereinfacht wird.

Die Einspritzung findet in der Halsgegend an einer Stelle statt, wo die Haut in weiten Falten abhebbar ist. Die vorher mit Karbolwasser abgewaschene Haut wird senkrecht durchstochen, wobei die Kanüle soweit vorzuschieben ist, daß sie im Unterhautbindegewebe frei bewegt werden kann. Die Spritze wird auf die Kanüle erst dann aufgesetzt, wenn diese schon in das subkutane Gewebe eingeführt ist. Die Flüssigkeit muß beim Verschieben des Spritzenstempels leicht abfließen. Die dabei entstehende kleine Beule wird durch leichtes Streichen mit einem karbolgetränkten Wattebausch etwas verteilt.

3. Technik der Temperaturmessung. Da, wie wir nachher sehen werden, von der Beurteilung der gemessenen Temperaturen unser diagnostisches Urteil hauptsächlich abhängt, verlangen die Temperaturmessungen eine besonders sorgfältige Ausführung.

Zunächst ist es notwendig, die zu impfenden Tiere mindestens zwei Tage vor Beginn der Impfungen im Stall zu halten, da erfahrungsgemäß die Temperatur frisch von der Weide in die Ställe getriebener Tiere zunächst sehr schwanken kann. Wenn angängig, empfiehlt es sich schon während dieser Tage abends und morgens die Temperatur zu messen. Auf alle Fälle ist am Tage der Injektion morgens und abends die Temperatur aufzunehmen. Die Injektion selbst erfolgt zweckmäßig abends spät um 10 oder 11 Uhr. Nach der Impfung wird mit den Temperaturmessungen 6 Stunden nach der Injektion begonnen und dieselben 24 Stunden lang alle 2 Stunden wiederholt. Ist nach dieser Zeit die Temperatur nicht zur Norm zurückgekehrt, so sind die Messungen fortzusetzen, bis die Temperatur normal geworden ist.

In jenen schon erwähnten Fällen, wo eine Vorprüfung des Rindes mit Tuberkulin vermutet wird, ist nach Injektion der doppelten Dosis Tuberkulin mit den Temperaturmessungen schon 3 Stunden nach der Injektion zu beginnen, da nach den Angaben Valées die Fieberreaktion früher einsetzt.

Die Messungen erfolgen mit Hülfe kleiner Maximalthermometer, die vollkommen in den After versenkt werden können. Vor Einführung des Thermometers sind nötigenfalls feste Kotballen aus dem unteren Mastdarmende zu entfernen. Um den Hals des am oberen Ende des Thermometers vorhandenen Knopfes befestige man ein ca. 30 cm langes dünnes Band, an dessen anderem Ende eine Klemme angebracht ist. Nach Einführung des Thermometers setze man diese Klemme auf die Schwanzhaare des Rindes und zwar dicht an der Schwanzwurzel auf. Das Thermometer bleibt 5 Minuten liegen. Bei Vornahme eines größeren Versuches mit vielen Tieren legt man gleich einer größeren Zahl von Rindern (etwa sechs) die Thermometer hintereinander ein. Nach Einführung des letzten pflegt es dann in der Regel zur Herausnahme des ersten Thermometers Zeit zu sein, den man nach Ablesen der Temperatur und Herunterschleudern der Quecksilbersäule dem siebenten Rind einlegt, worauf man das zweite Thermometer herausnimmt, dem achten Rind einführt usw. Man kann auf diese Weise die Temperatur von 50 Rindern in $^1/_2$—2 Stunden einwandsfrei feststellen. Das Ablesen der Thermometer hat nur durch Sachverständige zu erfolgen.

Beachtenswert erscheint der Vorschlag ein Thermometer in der Hülse in den Mastdarm einzunähen und nach 24 Stunden wieder herauszunehmen, da es ja in der Hauptsache darauf ankommt, die erreichte

Höchsttemperatur zu ermitteln. Nach den Erfahrungen des Verfassers wird dies Verfahren aber nur in einzelnen Fällen anwendbar sein. Wenn es sich um Massenprüfungen handelt, erscheint diese Methode nicht zweckmäßig.

4) Beobachtung und Beurteilung der Reaktion. Gesunde, d. h. noch nicht tuberkuloseinfizierte Rinder zeigen in der Regel nach der Injektion nicht die geringste Alteration ihres Befindens und der Temperatur. Manchmal erhebt sich allerdings die Temperatur etwas, aber nicht über 0,5° gegenüber der höchsten gemessenen Anfangstemperatur und selbst diese Erhöhung ist vielleicht weniger auf eine Tuberkulinwirkung zu beziehen, als vielmehr durch die allgemeine Beunruhigung der Rinder verschuldet.

Die tuberkuloseinfizierten Rinder antworten dagegen mit Fieberbewegungen, die in der Regel 6—8 Stunden nach der Impfung einsetzen und nach 12—18 Stunden ihren Höhepunkt erreichen. Nur in den schon erwähnten Fällen, wo kurz vorher schon eine Tuberkulinprüfung des Rindes stattgefunden hat, setzt das Fieber schon nach 2—3 Stunden ein und erreicht nach 6—8 Stunden seinen Höhepunkt.

Der vielfach behauptete anfängliche Abfall der Temperatur bei sonst positiver Reaktion ist durchaus nicht die Regel. Die Temperatur pflegt meistens nach 24 Stunden zur Norm zurückgekehrt zu sein, so daß die typische Reaktion die Form einer steilen Kurve besitzt. Manchmal zeigt sich aber auch ein über mehrere Tage sich hinziehendes langsames Absinken der Temperatur. Es kann nicht genug empfohlen werden, neben der gewöhnlichen Registrierung der Temperatur auch eine Kurvenaufzeichnung vorzunehmen, die in sehr anschaulicher Weise gerade jene langsam abklingenden Fieberbewegungen demonstriert.

Neben der Temperaturerhöhung zeigt sich bei den reagierenden Tieren manchmal eine allgemeine Mattigkeit, Beschleunigung des Pulses und der Atembewegungen, Appetitverlust, bisweilen auch Schwellungen an der Impfstelle. Bei bestehender Eutertuberkulose oder Tuberkulose der subkutan gelegenen Drüsen schwellen das Euter bezw. die Drüsen oft an. Gelegentlich werden auch Schüttelfröste beobachtet. In stark verseuchten Stallungen macht die Herde im Gegensatz zu ihrem allgemeinen Aussehen vor der Impfung sehr oft einen im ganzen matten, kranken Eindruck. Doch sind alle diese Erscheinungen nur von kurzer Dauer. Ziemlich konstant findet man dagegen eine Verminderung der Milchmenge, die allerdings bei dem einzelnen Tier weniger in Betracht kommt als bei Feststellung des Gesamtgemelkes. Bei großen Milchvieh-Stallungen sollte man also niemals alle Tiere auf einmal prüfen. Manche wollen auch Abnahme des Fettgehaltes der Milch unter dem Einfluß der Reaktion beobachtet haben. Es ist schwer zu entscheiden, wieviel hier auf Kosten des Tuberkulins, wieviel auf die allgemeine Beunruhigung der Tiere kommt. Ernstere Zufälle werden, wie oben auseinandergesetzt, in der Regel nicht beobachtet. Bestehende Gravidität wird durch Tuberkulininjektion nicht beeinflußt, auch nicht bei positiven Reaktionen.

Auch sind alle eben genannten Erscheinungen mit Ausnahme des Fiebers keine Regel bei den tuberkuloseinfizierten Tieren. Für die Beurteilung der Tuberkulinreaktion ist daher — abgesehen von einigen nachher zu besprechenden Ausnahmefällen — einzig und allein das Ergebnis der Temperaturmessungen maßgebend.

Das Wichtigste ist natürlich die Beurteilung dieser Temperaturmessungen, zumal von diesem Urteil häufig praktisch wichtige Entscheidungen abhängen. So benutzt ja z. B. Bang das Resultat der Tuberkulinprüfung, um die Tiere einer Herde in eine gesunde und eine infizierte Abteilung zu trennen.

Bleibt jede Reaktion aus, so ist das Tier als gesund zu betrachten; denn entweder ist es in der Tat vollkommen frei von tuberkulösen Veränderungen oder aber es hat nur vereinzelte abgeheilte und verkalkte Tuberkuloseherde, die praktisch bedeutungslos sind. Eine bemerkenswerte Ausnahme bilden nur die Fälle, in denen die Reaktion ausbleibt, weil die Tuberkulose schon zu weit vorgeschritten ist. Diese Fälle verraten sich aber in der Regel dem Auge des Sachverständigen durch ihr klinisches Verhalten.

Was die Beurteilung der fiebernden Fälle betrifft, so kann man, wie Eber[31a]) ausführt, hierbei von zwei verschiedenen Gesichtspunkten ausgehen. Entweder man legt die normale Temperaturskala des Rindes zu Grunde und sieht dann jede nach der Injektion gemessene über diese Skala sich erhebende Temperatur als abnormal an, läßt also die relative Steigerung gegenüber der gemessenen Anfangstemperatur ganz unberücksichtigt und hält sich lediglich an das absolute Ergebnis. Anderseits kann man seine Beurteilung lediglich nach der relativen Erhebung gegenüber der Anfangstemperatur oder gegenüber einer vor der Impfung ermittelten Durchschnittstemperatur richten. Wegen der Schwankungen in der normalen Körpertemperatur des Rindes hat man anfänglich diese „relative" Methode sehr bevorzugt, während man neuerdings wiederum mehr dem erstgenannten Beurteilungsmodus zuneigt. Es hat sich notwendig erwiesen, die noch nicht 6 Monate alten Tiere besonders zu beurteilen, da bei ihnen normalerweise schon eine höhere Temperatur besteht.

Im übrigen hat man sich gewöhnt, alle Rinder, deren Temperatur sich nach der Injektion nicht über 39,5° erhebt als unverdächtig anzusehen, weil bis dahin die normale Temperatur des Rindes reicht. Dagegen ist jede 40° übersteigende Temperatur bei älteren Rindern als positive Reaktion zu deuten.

Differenzen bestehen dagegen bei den verschiedenen Autoren hinsichtlich der zwischen 39,5 und 40° gemessenen Temperaturen. Bei diesen pflegt man allgemein alle diejenigen Reaktionen als positiv zu betrachten, bei denen eine relative Erhöhung der Temperatur um mindestens 1° festgestellt ist. Es bleiben also die Reaktionen zwischen 39,5 und 40° übrig, bei denen die Gesamterhebung der Temperatur weniger als 1° beträgt. Nach Eber ist es falsch, wenn die preußische Vorschrift über die Beurteilung der mit Hilfe des Tuberkulins erlangten Temperaturtabellen vorschreibt, solche Fälle ohne weiteres als unverdächtig anzusehen; denn es finden sich unter ihnen neben gesunden Tieren auch inifizierte. Praktisch ist dieser Punkt deshalb so bedeutungsvoll, weil sich unter diesen schwach reagierenden Tieren gerade oft sehr stark tuberkulöse Individuen finden.

Eber nimmt daher eine gesonderte Untersuchung dieser Gruppe vor, indem er diejenigen Tiere als reagierend in dieser Gruppe bezeichnet, „bei denen die Gesamterhebung gegenüber der Anfangstemperatur mindestens 0,5° betrug und deren Temperaturkurve den unverkennbaren Charakter einer wirklichen Fieberkurve (allmählicher Anstieg, Verweilen auf der Höhe und allmählicher Abfall) an sich trug. Diejenigen Fälle aus der Gruppe der zweifelhaften Reaktionen aber, bei

denen die Gesamterhebung unter 0,5° C zurückblieb, oder die, falls 0,5° C überschritten war, doch nur einzelne unvermittelte höhere Erhebungen aufwiesen, wurden der Gruppe der nicht reagierenden Tiere zugezählt, nachdem — und darauf habe ich stets besonderen Wert gelegt — durch eine genaue klinische Untersuchung die Unverdächtigkeit nochmals kontrolliert worden war." EBER glaubt, daß der Geübte auf diese Weise mit großer Sicherheit die Tiere dieser zweifelhaften Reaktionsgruppe nach der einen oder anderen Seite verteilen kann. Eine vollkommen schematische Beurteilung ist eben bei dieser Gruppe nicht angebracht. „Bezüglich der sogenannten zweifelhaften Reaktionen stehe ich daher noch heute auf dem Standpunkte, daß diese Gruppe von Reaktionen für wissenschaftlich exakte Untersuchungen nicht zu entbehren ist und daß die Entscheidung darüber, welche von diesen Tieren als verdächtig und welche als unverdächtig anzusehen sind nicht mit Hilfe schematischer Formeln, sondern nur an der Hand der Erfahrung von Fall zu Fall am besten getroffen wird" (EBER).

Die Beurteilung der Tuberkulinprobe wird verschieden ausfallen, je nach dem Zweck, den man dabei verfolgt. Handelt es sich z. B. um die Einleitung der Bekämpfung nach BANG, so wird man gut tun noch strenger zu verfahren und alle Reaktionen zwischen 39,5 und 40°, die mindestens 0,5° relative Erhöhung aufweisen, als positive zu betrachten. Denn es ist von geringerem Schaden, wenn einmal ein nicht tuberkulöses Tier in die reagierende Abteilung eingestellt wird, als wenn ein tuberkulosebehaftetes in der gesunden bleibt und, weil es vielleicht gerade an einer schweren Tuberkulose leidet, den Erfolg der Isolierung illusorisch machen kann.

Handelt es sich aber um eine wissenschaftliche Entscheidung, von deren Ergebnis die Schlachtung eines Tieres abhängig gemacht wird, so ist es richtiger, nach den Grundsätzen EBERS zu verfahren. Dieselben sind denn auch in der Hauptsache durch den letzten internationalen tierärztlichen Kongreß zu Budapest angenommen worden.

Der Kongreß faßte folgende Resolution:

1. Die Herstellung und Abgabe des Tuberkulins ist unter die Aufsicht des Staates zu stellen.

2. Nur solche Rinder sind der Tuberkulinprobe zu unterwerfen, deren Körpertemperatur zur Zeit der Injektion 39,5° nicht übersteigt.

3. Bei allen Rindern, welche zur Zeit der Tuberkulineinspritzung keine 39,5° übersteigende Temperatur aufweisen, ist jede 40° C übersteigende Erhöhung der Körpertemperatur als positive Reaktion aufzufassen.

4. Alle Temperaturerhöhungen über 39,5° bis 40° C sind als zweifelhafte Reaktion zusammenzufassen und für sich zu beurteilen.

An der Hand dieser Grundsätze kann man mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit entscheiden, ob ein Rind tuberkulös ist, d. h. eine anatomisch erkennbare Tuberkulose hat oder nicht. Es sei aber nochmals hervorgehoben, daß auf Grund neuerer experimenteller Feststellungen die positive Tuberkulinreaktion nicht nur durch eine anatomisch erkennbare Tuberkulose bedingt wird, sondern eine Begleiterscheinung der Tuberkuloseinfektion darstellt auch in Fällen, in denen es nicht zur Herdbildung im Organismus kommt. Für die allgemeine Praxis aber spielt dieses Moment nur eine untergeordnete Rolle.

Hervorgehoben mag zum Schluß noch werden, daß die Tuberkulinreaktion uns keine Aufschlüsse über die Ausdehnung der Tuberkulose

bei dem geprüften Rinde gibt, etwa in dem Sinne, daß die Stärke der Reaktion wächst mit der Verbreitung der tuberkulosen Herderkrankungen. Eher könnte man fast das Umgekehrte annehmen, da in vielen Fällen mit ganz geringer Tuberkulose die Reaktion oft besonders typisch ausfällt.

II) Bei anderen Tieren.

Unter den Rindern findet man von allen Säugetieren die Tuberkulose am verbreitetsten; den Rindern folgen was die Beteiligung an der Tuberkulose betrifft, die Schweine, hierauf Pferde, Schafe und Ziegen.

Zu diagnostischen Zwecken ist das Tuberkulin bei diesen Tieren in der Praxis bisher nur wenig verwandt worden, höchstens zur Erkennung der Schweinetuberkulose. Nach den neueren Feststellungen von Dammann und Müssemeier[22]), scheinen sich Dosen von 0,1 ccm des gewöhnlichen Handelstuberkulins gut hierzu zu eignen, indem gesunde aus unverseuchten Beständen stammende Schweine nach dieser Dosis reaktionslos blieben, während tuberkuloseinfizierte Tiere prompt reagierten. Zu beachten ist, daß die Temperatur der Schweine normalerweise sich zwischen 39,4—40,4° bewegt, also höher liegt als die der Rinder. Das Gleiche gilt auch für die Ziegen, bei denen die gleichen Autoren 0,2 ccm Tuberkulin mit Erfolg diagnostisch verwandten. Gesunde Ziegen reagierten hierauf nicht, während die infizierten Tiere Fieber bekamen. Nach den Feststellungen Eichhorns[32]) reichen für tuberkulöse Ziegen sogar schon Dosen von 0,02—0,03 g aus.

Zuverlässige Daten über die Tuberkulinempfindlichkeit der Schafe und Pferde und die zur diagnostischen Impfung geeignete Dosis stehen noch aus.

Affen hat auf Tuberkulin-Empfindlichkeit unter anderen Grawitz[143]) untersucht; er fand, daß tuberkulöse Affen auf Dosen von 0,01 bis 0,0005 ccm reagierten; aber auch manche bei der Sektion gesund befundene Tiere hatten auf gleiche Dosen reagiert. Fröhner[38]) berichtet über eine tödliche Tuberkulinwirkung von 0,01 g Tuberkulin bei einem tuberkulösen Affen. Der Tod erfolgte 40 Stunden nach der Injektion. Dagegen erzielten Bärmann und Halberstädter[11]) bei experimentell an Hauttuberkulose erkrankten Affen mit Dosen von 0,0001 bis 0,005 g keine deutlich ausgeprägten Temperatursteigerungen, selbst nicht bei einer einmaligen Dosis von 0,05 g. Wohl aber konnten sie Lokalreaktion in einzelnen Fällen finden. Es muß aber hervorgehoben werden, daß die von ihnen geprüften Affen anscheinend schon fieberten, als sie mit Tuberkulin geprüft wurden. Man ist also weit entfernt davon, eine zuverlässige diagnostische Dosis für den Affen zu kennen.

Über diagnostische Tuberkulinimpfungen bei anderen Tieren (Hunden, Katzen etc.) finden sich Angaben bei Fröhner[37]). Von Bedeutung ist endlich noch für wissenschaftliche Versuche die diagnostische Meerschweinprüfung. In der Regel gehen wir hier allerdings von der tödlichen Tuberkulinwirkung aus und pflegen die auf ein Multiplum der tödlichen Minimaldosis nicht sterbenden Tiere als nicht infiziert anzusehen. Was die Beurteilung der bloßen Fieberreaktion bei Meerschweinen betrifft, so ist dieselbe nur mit großer Vorsicht vorzunehmen; denn auch gesunde Meerschweine können mit Temperatursteigerungen bei der subkutanen Injektion von Tuberkulin antworten; nach Dönitz[24]) erzeugen z. B. Dosen von 0,15 ccm Tuberkulin bei Meerschweinen von 400 g Fieber. Zur Feststellung der „spezifischen Ueberempfindlichkeit“ werden wir des-

halb vorläufig gut tun, uns an die bei tuberkulösen Meerschweinen erfahrungsgemäß tödliche Dosis zu halten, auch auf die Gefahr hin, daß wir dadurch die tuberkuloseinfizierten Tiere verlieren.

Wie auf so vielen Gebieten der Wissenschaft, giebt es also auch noch in der Tuberkulindiagnostik große Lücken, deren Ausfüllung der Zukunft vorbehalten bleibt.

Literatur.

1) Arloing, Rec. de méd. 1891.
2) Ders., Lyon. Journ 1891.
3) Ders., Rev. vét. 1891.
4) Aronson, Berl. klin. Wochenschr. 1898, pag. 484.
5) Ders., Verein für innere Medizin. Berlin 1902.
6) Babes, A. und V., Congrès de la tub. 1891.
7) Bang, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1891, Nr. 15 u. 16.
8) Ders., Tidskr. für Vet., Bd. XXI.
9) Ders., Revue d'Hygiène. Mai 1895.
10) Ders., Zeitschr. für Tiermedizin, Bd. XXII.
11) Bärmann und Halberstädter, Berl. klin. Wochenschr, 1906. Nr. 7.
12) von Behring, Berl. klin. Wochenschr. 1899, pag. 537.
13) von Behbing, Römer, Ruppel, Beitr. zur exper. Therapie, Bd. V.
14) von Bockum-Dolfs, Tiermed. Rundschau. Bd. V, pag. 13.
15) Broden, Arch. de méd. exper. et d'anat. Pathol. 1893, Tome XI.
16) Buch, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1891.
17) Buch-Lüben, Berl. tierärzt. Wochenschr. 1891.
18) Buchner, Münch. med. Wochenschr. 1897.
19) Bulloch und Macleod, Journ. of Hyg. 1904, Vol IV, pag. 1.
20) Carrière. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1901, pag. 11.
21) Chauveau, Leblanc, Méguin, Nocard, Straus, Trasbot und Weber, Bull. de l'Acad. de Méd. 1891, Tome XXXV.
22) Dammann und Müssemeier, Hannover-Verlag von Schrader 1905.
23) Dönitz, Klin. Jahrb., Bd. VII.
24) Ders., Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd. IV.
25) Delvos, Berl. tierärzt. Wochenschr. 1891. Nr. 4.
26) Denys, Ref. Centralbl. für Bakteriol., Bd. XXXI.
27) Eber, Centralbl. für Bakteriol., Bd. XI.
28) Ders., Zeitschr. für Tiermedizin, Bd. XVIII.
29) Ders., Zeitschr. für Tiermedizin, Bd. XXI, Heft 1 u. 2.
30) Ders., Naturforscherversammlung Braunschweig 1897.
31) Ders., Tuberkulinprobe und Tuberkulosebekämpfung beim Rind. Berlin 1898.
31a) Ders.. Veterinärkongreß Budapest 1905.
32) Eichhorn, Ref. Hyg. Rundschau 1892, Bd. IV.
33) Feistmantel, Centralbl. für Bakteriol., Bd. XXXVI.
34) Fenner, Monatshefte für prakt. Tierheilkunde, Bd. III.
35) Feser, Zeitschr. für Tiermedizin, Bd. XIX.
36) Frafnkel, Hyg. Rundschau 1894, Bd. XVII.
37) Fröhner, Monatsheft für prakt. Tierheilkunde, Bd. V, Heft 2.
38) Ders., ibidem, Bd. V, Heft 5.
39) Gensert, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1891.
40) de giaxa, Centralblatt für Bakteriol., Bd. XXX.
41) Giofreddi, Centralblatt für Bakteriol., Bd. XXX.
42) Glusert, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1892.
43) Grawitz, Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 19.
44) Gutman, Monatshefte für prakt. Tierheilkunde, Bd. VI, pag. 10.
45) Ders., Berl. tierärztl. Wochenschr. 1891, Nr. 2.
46) Hafner und Lydtin, Bad. tierärztl. Mitteilungen 1891.
47) Hahn, Berl. klin. Wochenschr. 1891, Nr. 30.
48) Ders., Münch. med. Wochenschr. 1897, Nr. 48.
49) Hahn, Roger, Bertrant, Lyon. Journ. 1892.

50) Hammerschlag, Centralbl. für innere Medizin 1891.
51) Heine, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1891.
52) Helmann, Ref. Hyg. Rundschau, Bd. III.
53) Héricourt und Richet, Sem. méd. 1891.
54) Hess, Landwirtschaftl. Jahrb. der Schweiz 1894, Jahrg. VIII.
55) Hink, Bad. tierärztl. Mitteilungen 1891.
56) Hueppe und Scholl, Berl. klin. Wochenschr. 1891, Nr. 4 und 8.
57) Hunter, Brit. med. Journ. 1891. 25. Juli 1891.
58) Hutyra, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1891.
59) Ders., Zeitschr. für Tiermedizin, Bd. IV.
60) Ders., Monatsheft für prakt. Tierheilkunde 1891.
61) Jensen, Maanedskr. for Dryol., Bd. IV.
62) Jrimescu, Ref. Münch. med. Wochenschr. 1906, Nr. 13.
63) Junger s. Schmidtke, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1892.
64) Kanda, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLVII.
65) Kasparek, Wiener klin. Wochenschr. 1897.
66) Kiekhöfer, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1892, Nr. 15.
67) Kitt, Wochenschr. für Tierheilkunde und Viehzucht 1891.
68) Klebs, Centralbl. für Bakteriol., Bd. XX.
69) Ders., Münch. med. Wochenschr. 1900, Nr. 49 und 1901, Nr. 4 und 17.
70) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 45.
71) Koch, R., Berl. klin. Wochenschr. 1890, Nr. 46.
72) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 3.
73) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1891, Nr. 43.
74) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 14.
75) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1901.
76) Kolberg, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1892.
77) Kreisling, Centralbl. für Bakteriol., Bd. XXX.
78) Krickels, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1891.
79) Krickels-Düren, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1892.
80) Kühne, Zeitschr. für Biol., Bd. XXIX und XXX.
81) Kunke, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1892.
82) Landmann, Hyg. Rundschau 1898, Bd. VIII.
83) Ders., Hyg. Rundschau 1900, Bd. VIII.
84) Ders., Centralbl. für Bakteriol., Bd. XXVII.
85) Lapp, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1892.
86) van Leeuwen, Holl. Zeitschr., Bd. XVIII.
87) Lindquist, Tidskr. for Vet. 1891.
88) von Lingelsheim, Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 37.
89) Lothes, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1891, Nr. 13.
90) Lydtin, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1891.
91) Ders., Bad. tierärztl. Mitteilungen 1891.
92) Malkmus, Monatsh. für prakt. Tierheilkunde, Bd. III.
93) Malm, Om Tuberkulin Fabricius Christiania 1894.
94) Maragliano, Berl. klin. Wochenschr. 1898, Nr. 18.
95) Neufeld, Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 15.
96) Nishimura, Archiv für Hyg., Bd. XXI, Heft 1.
97) Nocard, Gaz. méd. de Paris 1891.
98) Ders., Ann. d'Hyg. publ. 1891, Tome XXVI.
99) Ders., Sem. méd. 1891.
100) Ders., Ann. de l'Institut Pasteur 1892.
101) Ders., Ann. d'Hyg. publ. 1894.
102) Ders., Montargis 1896.
103) Ders., Deutsche Zeitschr. für Tiermedizin 1895, Bd. XXII.
104) Noack, Sächs. Berichte 1892.
105) Otto, Klin. Jahrb., Bd. XIII.
106) Pennsylvan. Kommission, Amer. Vet. Rev., Bd. XV.
107) Pisquet, Naturforscherversammlung 1904.
108) Pohl-Pincus, Deutsche med. Wochenschr. 1884.
109) Proskauer und Beck, Zeitschr. für Hyg., Bd. XVIII.
110) Ramond und Ravaut, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1898.
111) Röckl-Schütz, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1891, Nr. 6.
112) Röckl-Schütz-Lydtin, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundh.-Amt, Bd. VIII.
113) Römer, Beitr. zur exper. Therapie, Bd. VI.
114) Ders., Beitr. zur Klinik der Tuberkulose, Bd. IV.
115) Rönnholm, Tidskr. for Vet. 1891.

116) RUCK, VON, Münch. med. Wochenschr. 1899.
117) RUPPEL, Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXVI.
118) Ders., Beitr. zur exper. Therapie, Bd. IV.
119) SCHINDELKA, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1892.
120) SCHMIDT, Maanesdskr. for Dryol. 1891.
121) SCHUMANN-GREIZ, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1892.
122) SCHWARZ, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1891.
123) DE SCHWEINITZ und DORSET, Centralbl. für Bakteriol., Bd. XIX.
124) DE SCHWEINITZ und MARTIN, Centralbl. für Bakteriol., Bd. XXIII.
125) DE SCHWEINITZ und DORSET, Centralbl. für Bakteriol., Bd. XXXIII.
126) SELLMER, Maanedskr. for Dryol. 1891.
127) SIEDAMGROTZKY-JOHNE, Sächs. Berichte 1891.
128) SIEDAMGROTZKY, Sächs. Berichte 1892
129) Ders., Zeitschr. für Tiermedizin, Bd. XIX.
130) STICKER, Archiv für animale Nahrungsmittelkunde 1890/91, Nr. 4.
131) UJHELYI, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1892.
132) VALLÉE, Ann. de l'Institut Pasteur 1904, Tome IX.
133) VISEUR, Lyon. Journ. 1892.
134) VOGES, Der Kampf gegen die Tuberkulose des Rindviehs. Jena 1897.
135) WEYL, Deutsche med. Wochenschr. 1891.

XXXVII.

Malleïn.

Von

Dr. A. Wladimiroff

in St. Petersburg.

I. Antigene der Rotzbazillen*).

Die Antigene der Rotzbazillen sind im Vergleich zu denjenigen anderer pathogener Mikroorganismen noch wenig erforscht, obwohl sie seit der Entdeckung des Malleïns durch HELMANN und KALNING im Jahre 1890 bereits eine nicht geringe praktische Bedeutung gewonnen haben. Was wir bisher über die Natur der Rotzgifte wissen, gründet sich fast ausschließlich auf experimentelle Arbeiten, welche entweder deren diagnostische Bedeutung oder ihre immunisierenden Fähigkeiten zum Gegenstande hatten. Aus allen diesen Arbeiten läßt sich nur eins mit Sicherheit ableiten, und zwar daß die aktiven Substanzen des Bacillus malleï in die Gruppe der Endotoxine gehören.

Trotz der großen Verschiedenheit in der Technik, deren sich die einzelnen Forscher bedient haben, um Rotzantigene zu gewinnen, weichen die Resultate ihrer Versuche doch im großen und ganzen nur wenig voneinander ab. Wenn man nun nach dem gemeinsamen Faktor sucht, der allen Darstellungsmethoden eigen ist, so erkennt man unschwer, daß er in der Verwendung des Bakterieninhaltes besteht.

Vielfach sind es direkt die abgetöteten Bakterienzellen gewesen, deren Wirkung auf den Tierorganismus studiert worden ist, wobei die Art der Abtötung sich als kaum von Belang erwiesen hat, sei es, daß sie durch Eintrocknen von Bakterienaufschwemmungen bei 36—38° (KLEPZOFF) erzielt wurde, oder durch längeres Erwärmen auf 60 respektive 62° (KLEINE, SADOWSKY), durch Sterilisieren bei 120° [BROMBERG, SACHAROFF[70])], oder endlich durch Terpentinzusatz zu Bouillonkulturen (GALTIER). Hervorzuheben ist nur, daß nach BROMBERGS Angaben in den jungen (viertägigen) Kulturen weniger von der toxischen Substanz enthalten war als in älteren Kulturen.

Die meisten Forscher benutzten freilich bakterienfreie Produkte, gewannen dieselben jedoch durch Filtration entweder von Aufschwemmungen,

*) Die in diesem und den nachfolgenden Kapiteln besprochenen Fragen sind vom Verf. zum Teil bereits früher im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von KOLLE und WASSERMANN behandelt worden und bilden stellenweise eine Umarbeitung und Erweiterung der entsprechenden Abschnitte des genannten Werkes.

in denen die Rotzbazillen bei verschiedenen Temperaturen extrahiert worden waren (HELMANN, KALNING, KRESLING[44]), MALZEFF, SACHAROFF[70]), PREUSSE[67]), STEPANOFF), oder aber von mehr oder weniger alten Bouillonkulturen, in denen gleichfalls bereits eine Mazeration der Bazillen stattgefunden haben mußte (ROUX und NOCARD[58]), KRESLING[45]), PEARSON, PREISZ u. a.). Werden derartige Filtrate mit eiweißfällenden Mitteln behandelt, so befindet sich die wirksame Substanz im Niederschlage (DE SCHWEINITZ und KILBORN, BABES[1, 2]) FOTH[19]), BONOME und VIVALDI[8]), GUTZEIT).

Endlich hat BONOME[7]) bereits im Jahre 1894 zur Bereitung des Rotztoxines ein Verfahren angewandt, welches neuerdings (1906) von BESREDKA speziell für die Gewinnung von Endotoxinen angegeben worden ist. Dasselbe bestand darin, daß er die Rotzbazillen 15 Tage lang in Rinderblutserum hielt, welches er darauf filtrierte. Die wirksamen Stoffe waren in dem Filtrate enthalten.

Über die chemische Natur der Rotzgifte ist bisher noch nichts Sicheres bekannt. Jedenfalls handelt es sich nicht um Alkaloide, wie HELMANN voraussetzte, nachdem er aus dem mit Salzsäure angesäuerten wässerigen Extrakte von Rotzbazillen durch Sublimat, Gerbsäure, Jod, Jodkali und Wolframmolybdensäure Niederschläge erhalten hatte. Diese Auffassung ist hinfällig nach den sehr exakten Untersuchungen von KRESLING[45]), welche indeß auch die Frage nicht gelöst, sondern nur die von anderen ausgesprochene Vermutung bestätigt haben, daß die wirksamen Stoffe an die Eiweißkörper des Bakterieninhaltes gebunden sind. BABES[2]) ist nun der Ansicht, daß „es sich zweifellos um Enzyme handelt, welche den Albuminaten anhaften". Werden letztere durch Alkohol aus der Extraktflüssigkeit gefällt, so gehen die toxischen Substanzen vollkommen in das Präzipitat über und lassen sich aus demselben weder durch Chloroform noch durch Äther wieder ausziehen. Jedoch dürfte hiermit die Enzymnatur wohl kaum als sicher erwiesen gelten, um so weniger als GUTZEIT das wirksame Prinzip (aus Filtraten von Rotzbouillonkulturen), welches ja fraglos bei der Alkoholfällung mit den Eiweißkörpern niedergerissen wird, doch in Alkohol und Äther löslich fand, wenn er es auf anderem Wege, und zwar durch Behandlung der Bakterienfiltrate mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung gewann.

Die Rotztoxine, insofern sie den wirksamen Bestand des Malleïns bilden, zeichnen sich im Gegensatz zur Mehrzahl der übrigen bakteriellen Antigene durch große Stabilität aus. Weder durch niedere Temperaturen (gefrieren), noch auch durch starke Hitzewirkung (120° im Autoklaven) werden sie in ihren biologischen Eigenschaften geschädigt. In geeigneter Weise aufbewahrt, erhalten sie sich offenbar unbegrenzt lange unverändert. Für das trockene Präparat liegen in dieser Beziehung Erfahrungen über eine Periode von 12 Jahren [FOTH[23]),] für das flüssige — von 9 Jahren [WLADIMIROFF[91])] vor. Als einziges schädigendes Moment ist uns bisher nur die Einwirkung des Lichtes bekannt.

Was die biologische Wirkung der Malleusantigene auf den tierischen Organismus anbetrifft, so ist dieselbe fast ausschließlich an der Hand des sogenannten Malleïns studiert worden. Wir wenden uns daher zunächst zur Besprechung dieses letzteren.

II. Grundzüge der Malleïnbereitung.

Die Bezeichnung „Malleïn" stammt von HELMANN und ist dem Worte „Tuberkulin" nachgebildet. Während sich in der älteren Literatur

noch die Synonyma „Rotzlymphe“ und „Morvin“ (Babes[1])) finden, ist gegenwärtig „Malleïn“ als gemeinsame Benennung für alle verschiedenen Präparate angenommen, welche, in der einen oder in der anderen Weise aus Rotzbazillen dargestellt, zu diagnostischen Zwecken verwendet werden.

Der Verschiedenheit der Darstellungsmethoden kommt nur eine technische Bedeutung zu; denn im Prinzip ist es, wie bereits eingangs hervorgehoben, ohne Belang, zu welchen Mitteln man greift, um sich das endozelluläre Gift der Rotzbazillen zu verschaffen. Überblickt man alle bisher zu diesem Zwecke eingeschlagenen Verfahren, so kann man sie im allgemeinen in vier Typen einteilen, je nachdem das Endprodukt das Filtrat eines Bakterienextraktes, das Filtrat einer Bouillonkultur, das Präzipitat aus einem dieser beiden Filtrate oder endlich die Aufschwemmung abgetöteter Bakterienleiber darstellt.

1. Filtrate von Bakterienextrakten. Die beiden Entdecker des Malleïns, Helmann und Kalning, sind unabhängig von einander auf fast völlig gleichem Wege vorgegangen. Beide haben die von Kartoffelreinkulturen abgeernteten Rotzbazillen aufgeschwemmt, unter Erhitzen mazerieren lassen und die nach Filtration durch Tonkerzen von den Bakterienleibern befreite Flüssigkeit zu diagnostischen Zwecken verwendet. Der Unterschied bestand nur darin, daß Kalning destilliertes Wasser zur Aufschwemmung benutzte und letztere vor der Filtration zunächst im Laufe von zwei Tagen viermal auf 120° erwärmte und fernere zwei Tage bei 39° stehen ließ, während Helmann außer destiliertem auch glyzerinhaltiges Wasser benutzte und die Erwärmung gradatim je einige Stunden bei 50° und bei 80° vornahm, ehe er zur endgültigen Sterilisation bei 115° schritt. Es liegt auf der Hand, daß diesen technischen Unterschieden keine praktische Bedeutung zukommt, ebensowenig wie weiteren kleinen Abweichungen in den Versuchen von Kresling[44]), Malzeff, Sacharoff[70]) u. a., welche sich zeitweilig an dasselbe Darstellungsprinzip gehalten haben. Die Vorzüge dieses Präparationstypus bestehen darin, daß das Endprodukt (abgesehen von Glyzerin) keinerlei fremdartige Beimengungen zu den Giften der Rotzbazillen enthält. Wenn dieser Modus trotzdem in der Massenproduktion des Malleïns keine Verwendung gefunden hat, so liegt der Grund hierfür einerseits darin, daß das Abernten der Bazillenrasen von den Kartoffelkulturen eine zu mühsame, zeitraubende und infektiöse Arbeit ist, andererseits aber die Beimengung heterogener Substanzen, insofern sie nur biologisch indifferent sind, nicht so ängstlich vermieden zu werden braucht. In dieser Beziehung stellt schon das Verfahren von Preusse[67]) (später auch von Stepanoff angewandt) eine Vereinfachung dar: alte, bereits schwarz und hart gewordene Kartoffelkulturen von Rotz wurden mit Wasser und Glyzerin übergossen und mehrere Tage bei 35° der Mazeration ausgesetzt, dann mehrmals filtriert und hierauf im Dampftopf sterilisiert. Das Malleïn, welches eine Zeit lang vom Veterinärinstitut in Charkoff[92]) ausging, wurde auch auf diesem Wege, aber aus jungen (viertägigen) Kartoffelkulturen gewonnen.

2. Filtrate von Bouillonkulturen. Die Verwendung von Bouillonkulturen ist zuerst von Roux und Nocard[58]) in die Malleïntechnik eingeführt worden. Es ist a priori klar, daß das Endprodukt um so reicher an wirksamer Substanz sein muß, je üppiger das Wachstum der Bakterien in der Bouillon vor sich geht. Um dieses zu erreichen, ist zu den verschiedensten Mitteln gegriffen worden. Die einzelnen Faktoren, welche hierbei in Betracht kommen, sind folgende:

Was zunächst die Bereitung der Bouillon anbetrifft, so spielt die Wahl der Fleischart (Pferd, Schaf, Kaninchen, Hund, Rind, Huhn), wie schon LÖFFLER konstatiert hat, für das Gedeihen des Bac. malleï keine Rolle. Irgend welche Vorzüge der von GUTZEIT speziell zur Malleïnbereitung empfohlenen Pferdefleischbrühe haben wir ebensowenig wie FOTH[20]) bestätigen können. Dagegen ist es für die Ausbeute von Nutzen, nach dem Vorgange von ROUX zu der üblichen Rindfleisch-Pepton-Kochsalz-Bouillon einen Zusatz von 4—5 % Glyzerin zu machen. Ferner verlangt die Reaktion des Substrates Beachtung. Zwar gedeihen die Rotzbazillen nach SMITH, KRESLING[44]), SCHRÖDER am üppigsten bei schwachsaurer Reaktion; um jedoch einen zu hohen Säuregrad zu vermeiden, ist sorgfältige Neutralisation vorzuziehen; FOTH[20]) warnt aber hierbei vor dem Überneutralisieren mit nachfolgenden Abstumpfungen durch Salzsäure.

Das Beschicken der Bouillon kann in einer Weise geschehen, welche die Anreicherung der Rotzbazillen in der Kultur nicht unerheblich beschleunigt. Denn obwohl der Bac. malleï in der gesamten Flüssigkeitsschicht gedeiht, so hat er doch eine gewisse Tendenz zum Oberflächenwachstum, worauf zuerst SMITH aufmerksam gemacht hat. Am Rande der Oberfläche entsteht zunächst ein grauweißer Ring, welcher sich unter günstigen Umständen ausbreiten und zur Bildung eines schleimigen Deckhäutchens führen kann. Um diese besonders energische Form des Wachstums von vornherein zu begünstigen, rät FOTH[20]), bei der Malleïnbereitung die Aussaat am Rande der Flüssigkeit anzubringen.

Das Temperaturoptimum für den Bac. malleï befindet sich zwischen 30 und 40° C. Aus begreiflichen Gründen vermeiden jedoch die Malleïnproduzenten die Grenzen dieses Spielraumes und halten sich an Temperaturen, die nicht unter 33° und nicht über 38° liegen.

Die Züchtungsdauer ist natürlich von größtem Einfluß auf den Bakterienertrag der Bouillonkulturen. Es ist daher wenig rationell, wenn einige Autoren sich mit Terminen unter einem Monat begnügen: SACHAROFF[70]) 3—6 Tage, BANG 6 Tage, PEARSON 14 Tage, FOTH[19]) 20 Tage. ROUX und NACARD wählten als Züchtungsdauer 1 Monat. DE SCHWEINITZ und KILBORNE 2 Monate, PREISZ (nach MAKOLDY) 3 Monate; KRESLING[90]) dehnt dieselbe gegenwärtig sogar auf 8—12 Monate aus. Dieses letztere Verfahren hat einen doppelten Grund. Erstens haben frühere Versuche von KRESLING[45]) gezeigt, daß eine bedeutende Spanne Zeit dazu erforderlich ist, die Wuchsfähigkeit der Rotzbazillen auf einem und demselben Substrat zu erschöpfen. Wenn gut gewachsene Bouillonkulturen durch Tonkerzen filtriert und immer wieder von neuem mit lebenden Rotzbazillen beschickt wurden, so ließen sich letztere bis zu fünfzehnmal in dieser Weise züchten. Freilich schien nach der fünften Generation schon keine weitere Toxinanhäufung in dem Substrat stattzufinden. Der zweite Grund liegt darin, daß das aus Bouillon dargestellte Malleïn außer den Rotztoxinen noch hoterogene organische Substanzen enthalten muß, deren fiebererregende Wirkung jedenfalls nicht ausgeschlossen werden kann; deshalb soll während einer protrahierten Züchtungsdauer der Abbau dieser Substanzen durch die Bakterten so weit als möglich getrieben werden.

Bei der Wahl des Aussaatmateriales kommt es ebenfalls im Interesse der Ausbeute darauf an, einen gut wachsenden Bakterienstamm zu finden. Vielfach werden die zur Malleïnbereitung bestimmten Stämme außerdem noch durch Tierpassage in ihrer Virulenz gesteigert (ROUX,

Foth[22]) u. a.), obwohl die Toxicität des Malleïns in keiner direkten Abhängigkeit von der Virulenz der benutzten Rotzbazillen zu stehen scheint.

Die Filtration der Bouillonkulturen bildet technisch die schwierigste Phase in der Malleïnbereitung, weil die Rotzbazillen, besonders in flüssigen Nährmedien, bedeutende Mengen einer schleimigen Substanz produzieren, welche sehr bald die Filterporen bis zu völliger Undurchgängigkeit verlegt. Diesem Übelstande kann man bis zu einem gewissen Grade dadurch abhelfen, daß man die Bakterienmasse vor dem Filtrieren durch lange Ruhe sich gut am Boden absetzen läßt und die Flüssigkeit mehrfach durch verhältnismäßig grobmaschiges Material schickt, ehe man sie auf die Bakterienfilter gibt. Nach unseren Erfahrungen wird die Filtration noch durch Erwärmen der Flüssigkeit erleichtert. Trotzdem nimmt sie, selbst unter Anwendung von Druck- oder Saugvorrichtungen, so viel Zeit in Anspruch, daß man bei einigermaßen großen Portionen Vorkehrungen gegen die Verunreinigung des eminent faulfähigen Materials treffen muß. Selbst wenn letztgenannter Übelstand völlig vermieden wird, bleiben die Verluste infolge von Verdampfen bei Sterilisation oder Erwärmung, Filterwechsel u. dgl. noch immer recht bedeutend; nur praktische Erfahrung lehrt, dieselben auf ein Minimum zu reduzieren.

Das Eindampfen des Filtrates auf ein Zehntel des ursprünglichen Volumens, wie es vielfach geübt wird, ist nur als Konservierungsmittel zu betrachten. Wenn nämlich die Bouillon mit einem Zusatz von 5 % Glyzerin bereitet war, so enthält das Endprodukt 50 % davon, was jedenfalls genügt, um zufällige Keime nicht zur Entwickelung kommen zu lassen. In dieser konzentrierten Form ist das Malleïn nicht direkt verwendbar, sondern muß vor dem Gebrauche in entsprechender Weise erst wieder verdünnt werden.

Der ursprüngliche leitende Gedanke, mittels Präzipitin die wirksame Substanz des Malleïns in reinerer und konstanterer Form darzustellen, hat sich nicht bewahrheitet; denn einerseits werden, wie bereits oben ausgeführt, die Rotztoxine bei der Eiweißfällung nur mechanisch mitgerissen, so daß sie auch nur einen Teil des Präparates bilden, und andererseits steht der Toxingehalt des Niederschlages durchaus in Abhängigkeit von demjenigen des verarbeiteten Filtrates. Daher müssen bei dem ersten Akte dieser Darstellungsmethode d. h. bei der Gewinnung des Filtrates die gleichen Gesichtspunkte beachtet werden, wie bei dem flüssigen Malleïn.

Außer dem Filtrate von Bouillonkulturen (de Schweinitz und Kilborne, Foth[19]), Gutzeit u. a.) sind auch Filtrate von Kartoffelkulturextrakten (A. Babes, V. Babes und Matoc) zur weiteren Verarbeitung verwendet worden.

Als Fällungsmittel dient ganz allgemein absoluter Alkohol, nur die zuletzt zitierten Forscher haben sich bei ihren Versuchen auch anderer Mittel, wie Ammonsulfat, Magnesiumsulfat oder einer Mischung von absolutem Alkohol und Äther bedient.

Zum Zweck der Fällung wird das Filtrat allmählich in einen bedeutenden Überschuß von Alkohol hineingegossen. Hierbei ist es rationell nach dem Vorgange von Foth, welcher neuerdings auch von A. Babes befolgt wird [Furtuna[26])], das Filtrat vorher durch Eindampfen auf ein geringeres Volumen einzuengen. Das im Alkohol fast augenblicklich entstehende weiße lockere Präzipitat muß auf Filtern gesammelt und im

Vakuum getrocknet werden. Es resultiert ein leichtes, nicht hygroskopisches Pulver, welches sich gut konservieren und bequem verschicken läßt. In Wasser ist es leicht löslich. Die Lösung ist jedes Mal unmittelbar vor dem Gebrauch anzufertigen und besitzt alle Eigenschaften des Malleïns.

4. Abgetötete Bakterienleiber. Bei einer vergleichenden Studie über verschiedene Darstellungsmethoden des Malleïns hat SACHAROFF[70]) unter anderem Bouillonkulturen und auch Emulsionen von Kartoffelkulturen des Bac. malleï durch Erhitzen auf 120° getötet, worauf er dieselben teils ohne weitere Bearbeitung, teits nach Entfernung der Bakterien durch Filtration auf ihren diagnostischen Wert prüfte. Da es ihm nicht gelang einen Unterschied in ihrer Wirkung auf den Tierorganismus zu entdecken, so empfahl er für die Malleïnbereitung die unfiltrierten Sorten in Anbetracht der Einfachheit und Schnelligkeit ihrer Präparation. Obwohl späterhin auch KLEPZOFF bestätigte, daß Einspritzungen toter Rotzbazillen den gleichen diagnostischen Effekt haben, wie diejenigen des üblichen Malleïns (er tötete die Bakterien in Form aufgeschwemmter Kartoffelkulturen durch Austrocknen bei 36—38°), so hat doch dieser Typus der Malleïnbereitung niemals praktische Verwendung im Großen gefunden.

III. Darstellung einiger der verbreitetsten Malleïnsorten.

Das **Malleïn ROUX** wird im Institut Pasteur unter Benutzung maximal virulenter Rotzkulturen dargestellt. Die Virulenz wird durch fortgesetzte intravenöse Verimpfung auf Kaninchen unterhalten und ist so hoch, daß die Kaninchen und sogar weiße Mäuse von den Bazillen in weniger als 30 Stunden getötet werden. Die Aussaat geschieht in Kolben, welche je 250 ccm Glyzerinbouillon enthalten. Nach einmonatlicher Züchtung bei 35° werden die Kulturen 30 Minuten lang im Autoklaven bei 100° sterilisiert, dann auf dem Wasserbade bis auf $^1/_{10}$ ihres ursprünglichen Volumens eingedampft und endlich durch „papier Chardin“ filtriert. Nach einer älteren Angabe NOCARDS[58]) geschah das Filtrieren vor dem Eindampfen und fand letzteres im Vakuum bei niedriger Temperatur und in Gegenwart von Schwefelsäure statt. Das konzentrierte Endprodukt „malléine brute“ ist eine dunkelbraune syrupartige Flüssigkeit, welche sich dank ihrem hohen Glyzeringehalte (ca. 50 $^0/_0$) sehr gut in gewöhnlichen verkorkten Flaschen konserviert. Vor dem Gebrauch ist dieses Malleïn wieder um das 10fache zu verdünnen, wozu nach der Anweisung eine 5 : 1000 Karbollösung benutzt werden soll. Die diagnostische Dosis für ein Pferd beträgt 0,25 ccm des „malléine brute“ oder 2,5 ccm der Verdünnung.

Bei der Präparation des **Malleïns**, welches **für das russische Reich** in dem Laboratorium des Verfassers hergestellt wird, verfährt KRESLING gegenwärtig in der Weise, daß er einen bestimmten, besonders toxischen und gut wachsenden Stamm von Rotzbazillen in 5 $^0/_0$ Glyzerin enthaltender Rinderbouillon nicht weniger als 8 Monate lang bei 37° kultiviert. Die Züchtung geschieht in abgemessenen Bouillonmengen (600—800 ccm); das Gesamtquantum einer Serie beträgt meist 30—40 Liter. Während des Aufenthaltes im Thermostaten werden die Kulturkolben wiederholt geschüttelt, um die Deckhäutchen zu senken und für

neues Oberflächenwachstum Raum zu schaffen, welches sich gegen Ende der Züchtungsperiode nur noch durch einen grauweißen schleimigen Ring am Rande der Flüssigkeit und auf der Gefäßwand zu erkennen gibt. Die reifen Kulturen werden auf ihre Reinheit geprüft, darauf bei 110° sterilisiert und dann sukzessive durch Fließpapier und Tonkerzen filtriert. Der bereits früher erwähnte Flüssigkeitsverlust infolge von Verdunsten im Brutschrank, Verdampfen beim Erhitzen, sowie infolge der Filterwechsel kann bis zu 20% betragen und wird während der nunmehr erfolgenden Toxizitätsbestimmung (an rotzkranken und an gesunden Pferden) soweit durch Wasser ersetzt, daß die diagnostische Dosis für ein Pferd gerade 1 ccm beträgt. Das fertige Präparat kommt nur in Einzeldosen und zwar in zugeschmolzenen Glasampullen zur Versendung. Diese Art des Ablasses ist dadurch geboten, daß die Arbeitsbedingungen, unter denen die russischen Tierärzte das Malleïn anzuwenden gezwungen sind, ihnen bei weitem nicht immer die Möglichkeit geben, Verdünnungen konzentrierter Flüssigkeiten oder Lösungen trockener Präparate in steriler Weise auszuführen.

Über die Darstellung des **Malleïn (s. Morvin) A. Babes** lautet die jüngste Mitteilung von V. Babes[3]) folgendermaßen: „Unser Malleïn (Morvin) wird derart bereitet, daß wir reichliche Kulturen aus virulentem Material in einer Kartoffelpasta herstellen; die Kulturen bleiben fünf bis sechs Wochen im Brutofen, kommen dann in ein Wasserbad von 68° während $3\frac{1}{2}$ Stunden, werden dann mit Wasser emulsioniert und darauf durch ein Wittsches Filter filtriert, das Filtrat*) in Alkohol präzipitiert, dann wieder filtriert, der Filterniederschlag mit Alkohol und dann mit Äther gründlich gewaschen. Hierauf wird das Pulver unter der Luftpumpe rasch getrocknet.“ Die diagnostische Dosis dieses Präparates für ein Pferd beträgt 0,02—0,03 g. — Aus einer früheren Mitteilung von A. Babes[1]) entnehmen wir noch folgende Details: Das Präzipitieren geschah durch Eingießen der filtrierten Bakterienemulsion in 86% Alkohol oder in ein Gemisch aus gleichen Teilen von absolutem Alkohol und Äther unter Benutzung eines besonderen Rührapparates, worauf der Niederschlag mit Wasser aufgenommen und zur Befreiung von Salzen, Ptomaïnen usw. dialysiert wurde. Das Trocknen geschah im Vakuum bei 40°. Zum Gebrauch sollte das Präparat gelöst werden in einem „Gemisch von Wasser und Glyzerin in der Proportion von 5 cg auf 10 ccm (Normallösung)“.

Das **Malleïnum siccum Foth** ist wiederum aus Bouillonkulturen dargestellt. Amphotere oder schwachsaure Bouillon mit einem Zusatz von 4,5% Glyzerin wird in möglichst großen Gesamtmengen in Kölbchen zu 100—250 ccm mit Rotzbazillen von maximaler Virulenz am Rande der Flüssigkeitsschicht geimpft. Zur Steigerung der Infektiosität des Rotzgiftes führt Foth dasselbe durch den Organismus von Katzen, Meerschweinchen und Feldmäusen; besonders an letzteren ließ sich durch fortgesetzte Weiterimpfung ein Material erzielen, das selbst nach subkutaner Einführung die Tiere in 48—60 Stunden unter dem Bilde einer Rotzseptikämie zugrunde gehen ließ. Die hiermit beschickten Kulturen verblieben drei Wochen im Thermostaten bei 37,7° („eher ein Dezigrad darüber als darunter!“), um darauf nach Prüfung ihrer Reinheit bei einer konstanten Temperatur von 76—80° auf $\frac{1}{10}$ ihres ursprünglichen Volumens eingeengt zu werden. Die so gewonnene Masse wird „in kleinen Por-

*) Nach Konzentration bei 65° [Furtuna[26])].

tionen durch eine Anzahl guter Faltenfilter und dann noch einmal durch Fließpapierbrei gepreßt. Es resultiert eine tiefbraune, dickflüssige, ganz klare Flüssigkeit. Der Verlust beim Filtrieren darf nicht mehr als 10% betragen.“ Nunmehr wird das Filtrat in dünnem Strahle und unter fortwährendem Umrühren in die 25—30fache Menge absoluten Alkohols eingegossen, wobei fast momentan ein feiner, flockiger, weißer Niederschlag entsteht. Der Alkohol muß so wasserfrei wie möglich sein, um Zusammenballen oder Klebrigwerden des Präzipitates zu vermeiden. Nach 24 Stunden wird der Niederschlag zunächst durch vorsichtiges Abhebern und dann auf einem Saugfilter vom größten Teile des Alkohols befreit, mehrfach mit Alkohol absolutus gründlich durchgewaschen und schließlich noch alkoholfeucht ins Vakuum gebracht, wo er bei Zimmertemperatur in Gegenwart von frisch ausgeglühtem Chlorcalcium (oder über Schwefelsäure) sorgfältig getrocknet wird. Beim Trocknen im Wasserbade würde er zu einer braunen, kolophoniumartigen, fast unlöslichen Masse zusammensintern. Das Endprodukt muß aber ein sehr leichtes, voluminöses, weißes, durchaus nicht hygroskopisches Pulver sein, welches sich im Wasser momentan absolut klar mit einem leicht gelblichen Farbentone löst. „Ein gutes Präparat soll sich, auf Papier gestreut und tagelang der Zimmerluft ausgesetzt, nicht bräunen.“ Die Einzeldosis des Malleïnum siccum für Pferde beträgt 0,045—0,05 g[23]).

In ganz analoger Weise hat auch Tröster[85]) das Malleïn im bakteriologischen Institute der Militär-Roßarztschule zu Berlin dargestellt.

IV. Wirkung des Malleïns auf den tierischen Organismus.

Das Malleïn ist im allgemeinen als schwaches Gift zu betrachten. Wir sind nicht einmal in der Lage, seine tödliche Dosis bei subkutaner Applikation angeben zu können. Selbst die kleinen Laboratoriumstiere, wie Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen, Hunde, vertragen die Einspritzung von mehreren Gramm Malleïns unter die Haut, ohne daran zugrunde zu gehen. Immerhin gelingt es durch sehr große Dosen, besonders wenn sie wiederholt werden, oder durch intravenöse Einführung des Toxins bei allen untersuchten Tieren gewisse Vergiftungserscheinungen, eventuell auch den Tod hervorzurufen.

Bevor wir zur Besprechung der Intoxikationserscheinungen schreiten, müssen wir die auffällige und praktisch höchst wichtige Tatsache hervorheben, daß ein enormer gradueller Unterschied in der Reaktion besteht, welche das Malleusantigen im Organismus rotzfreier Individuen einerseits und rotzinfizierter andererseits verursacht. Auf diesem Unterschiede basiert die Bedeutung des Malleïns für die Diagnostik.

a) Intoxikationserscheinungen bei gesunden Tieren.

Was zunächst die Körpertemperatur anbetrifft, so läßt sich immer eine Steigerung derselben durch genügend hochgewählte Dosen erzielen. Jedoch selbst bei so kleinen Tieren, wie Kaninchen und Katzen, ist nach unseren Erfahrungen[89]) die subkutane Einführung mehrerer Gramm Malleïn dazu erforderlich; und auch dann kommt es nur zu einer mäßig hohen und sehr schnell (in wenigen Stunden) vorübergehenden Fieberbewegung. Dasselbe beobachtet man auch bei Pferden. Spritzt man ihnen große Malleïnmengen unter die Haut, so steigt ihre Körper-

temperatur nach einigen Stunden, erreicht aber fast niemals 40 ° und fällt noch am selben Tage endgültig zur Norm ab. Es gibt aber auch besonders empfindliche Exemplare, bei denen selbst die übliche diagnostische Dosis (siehe weiter unter) eine solche leichte Fieberbewegung zur Folge hat. Intravenöse Injektion von Malleïn hat, wie Sacharoff[71]) und Guinard und Artaud gezeigt haben, eine bedeutend höhere und länger andauernde Hyperthermie zur Folge. Noch schwerer sind die Fiebererscheinungen, wenn man das Gift in Gestalt abgetöteter Bakterienleiber in die Blutbahn einführt (Finger, Bromberg, Sacharoff[71]).

Am Ort der Einspritzung wird das Malleïn von gesunden Tieren schnell und anstandslos resorbiert. Nur bei besonders empfindlicher Haut kommt es zur Bildung eines leichten, fast schmerzlosen Ödems, welches im Laufe eines Tages spurlos schwindet. Wenn Nocard[58]) ein solches Ödem bei gesunden Pferden nach Einspritzung der zwei- bis vierfachen diagnostischen Dosis von „maléine brute" auftreten sah, so ist dies wohl zum Teil auch durch den hohen Glyzeringehalt des Präparates zu erklären. Sacharoff[71]) konnte bei einer Katze, welcher er 4 Tage hintereinander glyzerinfreies Malleïn zu 0,4 ccm eingespritzt hatte, am vierten Tage an den Injektionsstellen nur einige Ekchymosen des Unterhautzellgewebes konstatieren.

Die Wirkung des Malleïns auf den Puls ist von Guinard und Artaud an der Hand intravenöser Injektionen bei Hund und Esel studiert worden. Hierbei ergab sich, daß der erste Effekt eine Pulsverlangsamung ist, auf die weiterhin erst eine Beschleunigung folgt. Der Blutdruck ist anfangs gesteigert, dann aber herabgesetzt.

Gesteigerte Schweißabsonderung haben Cadiot und Roger an Pferden und jungen Katzen, Guinard und Artaud beim Esel experimentell festgestellt; letztere außerdem auch Speichelfluß beim Hunde.

Von nervösen Intoxikationserscheinungen nennt Finger bei Kaninchen Krämpfe und Lähmungen, Sacharoff[71]) bei Katzen „Depression der Nerventätigkeit", selbst Coma, Babes[2]) Krämpfe, Guinard und Artaud bei Hund und Esel Unruhe, Muskelzittern, Übererregbarkeit, Krämpfe, gesteigerte Peristaltik.

Bei chronisch verlaufender Intoxikation wird stets Mattigkeit, mangelnde Freßlust, Abmagerung (bei Kaninchen nach Finger Haarausfall) beobachtet. Ist der Ausgang letal, so findet man bei der Obduktion vorwiegend Stauungserscheinungen in den Abdominalorganen, bisweilen sogar Entzündung der Leber (Finger, Sacharoff[71]) und der Nieren (Babes[2]).

b) Reaktion rotzkranker Tiere.

Die durch das Malleïn bei rotzkranken Tieren verursachten Intoxikationserscheinungen sind am besten an Pferden studiert, weil sie hier für die Rotzdiagnose von besonderer praktischer Bedeutung sind. Wir können uns daher im folgenden darauf beschränken, eine eingehende Besprechung der Malleïnreaktion nur bei dieser Spezies zu geben.

Die typische Malleïnreaktion rotzkranker Pferde ist durch zwei Kardinalsymptome — Temperatursteigerung und lokale Geschwulstbildung — charakterisiert; erst in zweiter Linie kommen anderweitige Intoxikationserscheinungen in Betracht.

Die Temperaturreaktion. Der Temperaturanstieg beginnt nach unseren Erfahrungen 6—8 Stunden nach der Malleïninjektion. (Foth[23])

gibt als Durchschnittswert 5—6 Stunden an, FURTUNA[26]) die 7. Stunde, MALM —8. SCHLEGEL — die 9. Stunde.) Die Kurve ist anfangs ziemlich steil, erreicht aber erst nach weiteren 6—8 Stunden (SCHLEGEL —5. FURTUNA —7 Stunden) ihr Maximum, welches zwischen 40—42° C gelegen ist. Auf dieser Höhe hält sich das Fieber mit einigen Schwankungen mehrere (nach SCHLEGEL durchschnittlich 8) Stunden und sinkt darauf mehr oder weniger gleichmäßig ab, meist jedoch ohne am Schlusse der ersten 24 Stunden wieder normalen Temperaturen Platz zu machen. Der zweite Tag zeigt fast immer eine erneute, wenn auch geringere Fieberbewegung; indessen kommt es auch vor, daß sie der ersten wenig an Intensität nachsteht, ja sogar dieselbe übertrifft. Die gesamte in dieser Weise charakterisierte Reaktionskurve kann ohne wesentliche Veränderung in ihren einzelnen Teilen insofern eine Verschiebung erfahren, als sie verfrüht oder verspätet einsetzt; der früheste von FURTUNA[26]) an seinem kolossalen Material beobachtete Beginn war 1 Stunde, der späteste 22 Stunden nach der Injektion.

Die lokale Reaktion an der Injektionsstelle ist die konstanteste Folgeerscheinung des Malleïns bei rotzkranken Pferden. 6—10 Stunden nach der Einspritzung entsteht im Unterhautzellgewebe eine sehr schmerzhafte, anfangs scharf umschriebene, derbe, heiße, später mehr diffuse, teigige Geschwulst, welche nicht weniger als 15 cm im Durchmesser hält. Die Hitze und Schmerzhaftigkeit der Geschwulst läßt schon am 2. Tage bedeutend nach, während ihre Dimensionen zuzunehmen fortfahren, so daß sie sich — nach Einspritzung an der Vorderbrust fast immer, nach Einspritzung am Halse nicht selten — bis auf die entsprechende Vorderextremität ausbreitet. In dem Maße, wie dies geschieht, werden ihre Konturen verschwommener, und nach 3—5—8 Tagen tritt vollständige Resorption ein.

Die Allgemeinerscheinungen tragen nach unseren Erfahrungen keinen konstanten Charakter. Die Abgeschlagenheit und die Appetitverringerung entsprechen der Höhe des Fiebers. Alle übrigen Intoxikationssymptome sind noch weniger konstant und stehen in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit des Individuums einerseits und von der Darstellungsmethode des angewandten Präparates andererseits. Immerhin können unter Umständen alle oben angeführten, an gesunden Tieren studierten Intoxikationssymptome mehr oder weniger deutlich in die Erscheinung treten, so daß man mit SCHLEGEL von einer förmlichen Malleïnkrankheit zu sprechen berechtigt ist. SCHLEGEL schildert sie folgendermaßen: „Die betreffenden Pferde versagen Futter- und Getränkaufnahmen, die Maulschleimhäute sind trocken, klebrig, vermehrt warm; die Nasen- und Augenschleimhäute sind höher gerötet und deren Sekretion vermehrt (dünner Nasenausfluß, Tränen); das Haarkleid, namentlich auf dem Rücken und den Flanken, ist trocken und gesträubt; die Darmgeräusche sind meist vermehrt, oft laut kollernd, die Defäkation manchmal zurückgehalten, selten diarrhöisch. . . . Oft kommt auch beschleunigte und angestrengte Atmung sowie vermehrte Herztätigkeit vor. . . . Am häufigsten aber beobachtet man von organischen Erscheinungen eine mehr oder weniger starke Eingenommenheit der Psyche, die Pferde zeigen starke Depression, sind abgeschlagen, traurig, müde, ihre Körperhaltung ist nachlässig, sie halten den Kopf in die Krippe oder tief gesenkt, der Blick ist matt, das Auge halb geschlossen, andauerndes Schildern, die Pferde stehen wie schlafend da. In anderen Fällen bekunden die Pferde Erscheinungen der Irritation, sie sind sehr unruhig, aufgeregt, trippeln

hin und her, stampfen häufig mit den Füßen. Nicht selten zeigen rotzige Pferde (außer der Temperaturerhöhung) Fiebererscheinungen, wie heftige Schüttelfröste, mehr oder weniger starkes Muskelzittern usw."

V. Prüfung des Malleïns.

Aus dem vorausgehenden Abschnitt ist ersichtlich, daß ein Malleïn nur dann zu diagnostischen Zwecken verwandt werden kann, wenn wir es so dosieren können, daß ein bestimmtes (stets gleich bleibendes) Quantum des Präparates nach subkutaner Einführung bei gesunden Pferden keine oder fast keine Intoxikationserscheinungen zur Folge hat, während es bei rotzkranken Pferden die volle Giftreaktion mit ihren beiden Kardinalsymptomen — typische Fieberbewegung und Impfgeschwulst — hervorruft. Gleichviel also, ob ein flüssiges oder ein trockenes Malleïn dargestellt wird, hat der Produzent die Aufgabe, jede Partie (Serie) seines Präparates daraufhin zu prüfen, ob es in der von ihm angenommenen Dosis den gestellten Anforderungen entspricht.

Die Erfüllung dieser Aufgabe ist um so schwieriger, als für sie die üblichen Methoden des Austestierens von Antigenen nicht verwendbar sind. Wir besitzen kein Rotzantitoxin; aber auch selbst dann, wenn wir über ein solches verfügen würden, so könnten wir es doch nicht zu Laboratoriumsprüfungen verwerten, da unsere kleinen Versuchstiere dem Rotzgift gegenüber zu unempfindlich sind. Alle Experimente, die Malleïnstärke direkt an rotzinfizierten Laboratoriumstieren zu bestimmen (Malm), sind bisher gescheitert, so daß für die Praxis kein anderer Ausweg übrig bleibt, als jede neuproduzierte Malleïnpartie an einer möglichst großen Reihe normaler und malleöser Pferde zu prüfen.

Wenn bei dieser Prüfung das Malleïn in der von dem gegebenen Produzenten festgesetzten Dosis an rotzfreien Pferden Temperaturerhöhungen oder Lokalerscheinungen hervorruft, mögen dieselben ihrem Typus nach auch keineswegs den obengeschilderten Kardinalsymptomen entsprechen, so ist es zu stark. Wenn dagegen bei rotzkranken Pferden die Reaktion flau oder nicht genügend scharf hervortritt, so ist es zu schwach. Handelt es sich um ein flüssiges Malleïn, so kann der eventuelle Fehler durch Verdünnen respektive Eindampfen korrigiert werden. Außerdem empfiehlt es sich, wie es im Laboratorium des Verfassers geschieht, den Versuchspferden einige Wochen nach Applikation des zu prüfenden Maleïns vergleichsweise die diagnostische Dosis einer früheren, in der Praxis erprobten Malleïnserie einzuspritzen. Selbstverständlich darf die Prüfung nicht als beendet angesehen werden, bevor die Obduktion der Versuchspferde mit nachfolgender genauer Untersuchung ausgeführt worden ist.

VI. Anwendung des Malleïns.

Die Kontroversen, welche um die Anwendung des Malleïns besonders in früheren Jahren mit großer Heftigkeit ausgefochten wurden, waren zum nicht geringen Teil dadurch veranlaßt, daß noch keine einheitlichen Prinzipien für die Technik der Malleïnisation sowie für die Beurteilung ihrer Resultate festgelegt waren. In beiden Hinsichten sind Dank zahlreichen Veröffentlichungen erfahrener Experimentatoren und Beobachter, sowie vor allem Dank den kompetenten Äußerungen der tierärztlichen Kongresse bedeutende Fortschritte zu verzeichnen. Und

wenn auch in einigen Details die Ansichten hier und da noch auseinander gehen, so dürfen wir doch die Hauptfragen im allgemeinen als gelöst betrachten.

a) Technik der Malleïnisation.

Die Dosierung. Ein jeder Malleïnproduzent gibt auf Grund der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Prüfung die diagnostische Dosis seines Präparates an. Diese Zahl hat aber naturgemäß nur die Bedeutung eines Mittelwertes. Im allgemeinen ist man ja bestrebt, die einzuspritzenden Toxinmengen der Größe oder dem Gewicht des Tieres anzupassen, jedoch wäre es bei den diagnostischen Injektionen zwecklos, diese Anpassung, wie es Beinarowitsch versucht hat, bis zur mathematischen Genauigkeit zu treiben. Die Körpermasse allein ist ja in diesen Fällen für die erforderliche Toxinmenge nicht ausschlaggebend, und wir wissen nur zu gut, daß die Giftempfindlichkeit auch noch durch andere Faktoren beeinflußt wird, wie z. B. Alter, Rasse, allgemeiner Ernährungszustand, Grad des Krankheitsprozesses. Es genügt daher für die Praxis, sich an die Durchschnittsdosis zu halten, dieselbe allenfalls etwas zu verringern, wenn es sich um junge oder kleine oder verfeinerte Tiere handelt, oder aber etwas zu erhöhen, falls sie für besonders große Tiere bestimmt ist. Von praktischer Bedeutung ist die Beobachtung Schlegels, daß auch hochträchtige und säugende Stuten die diagnostische Malleïndosis ohne Schaden vertragen.

Die Einspritzung hat selbstverständlich mit sterilisierten resp. desinfizierten Instrumenten zu geschehen, gleichviel ob eine gewöhnliche Stempelspritze oder der an die Malleïnampullen (aus dem Tavelschen Institut zu Bern) angepaßte Becksche Apparat zur Anwendung kommt. Die Spritzennadel darf nicht zu lang und nicht zu fein sein, um ihr Verbiegen und Abbrechen zu vermeiden. Schlegel rät außerdem, der Nadelspitze die Form einer Lanzette zu geben, um den Einstich weniger fühlbar zu machen. Strengste Asepsis ist ferner bei der Verdünnung resp. Auflösung der konzentrierten resp. trockenen Präparate zu beobachten, sofern zu diesem Zwecke nicht antiseptische Flüssigkeiten verwendet werden. Abscheeren der Haare und Desinfektion der Haut an der Einstichstelle halten wir, wie die Meisten, für unerläßlich. Wenn Schlegel auch bei mehreren Hunderten von Pferden ohne diese Vorsichtsmaßnahme keine üblen Folgen zu verzeichnen hatte, so kann deren Unterlassung, besonders von Seiten Ungeübterer oder in unsauber gehaltenen Beständen, doch gelegentlich Komplikationen nach sich ziehen. Abgesehen von schweren Infektionen, wie Tetanus oder Anthrax, können von der Hautoberfläche Eitererreger importiert werden, die bei gesunden Pferden störende Temperatursteigerungen, bei malleösen Pferden Abszeß der Impfgeschwulst befürchten lassen. Ferner muß die ganze Injektionsmasse ausschließlich in das Unterhautzellgewebe eingeführt werden; daher tut man gut, die Haut stark von ihrer Unterlage abzuziehen und sich vor dem Entleeren der Spritze durch seitliche Bewegungen der Nadel davon zu überzeugen, ob deren Ende nicht in der Haut oder aber in der Fascie fixiert ist.

Als Injektionsstelle wird die Vorderbrust oder die Seitenfläche des Halses gewählt. Wir geben der ersteren aus doppelten Gründen den Vorzug. Einmal ist hier die Haut verschieblicher und lockerer, so daß eine Einspritzung in tiefer gelegene Schichten mit Sicherheit vermieden werden kann; zweitens fällt hier die Massagewirkung fort, welche

am Halse durch die größere Hautspannung und die selbst bei Stallruhe beständig stattfindenden Bewegungen ausgeübt wird. Deshalb kommt an der Vorderbrust die lokale Reaktion zu ungestörterer Entwickelung: Die Geschwulst liegt in ihrer Gesamtmasse im Unterhautzellgewebe (ohne sich zum Teil im intermuskulären Bindegewebe zu verbergen, wie dies häufig am Halse der Fall ist), tritt überaus relief hervor, und ihre Dimensionen können durch Messungen zahlenmäßig bestimmt werden *).

Die Thermometrierung hat eine zwiefache Aufgabe zu erfüllen. Vor der Malleïnisierung soll sie die „normale" Temperatur der zu prüfenden Pferde eruieren, eventuell Fiebernde (39° C) von der Prüfung ausscheiden. Nach der Injektion soll sie den Typus der Temperaturkurve möglichst klar zur Anschauung bringen. Der erste Zweck wird erreicht durch dreimalige Messungen (morgens, mittags, abends) im Laufe der beiden Vortage der Malleïneinspritzung; der zweite Zweck durch Messungen, welche von der 6. bis zur 16. Stunde nach der Einspritzung allstündlich und von dann ab bis zur 36.—42. Stunde zweistündlich (mit einer Nachtunterbrechung von acht Stunden) ausgeführt werden. In der Praxis lassen sich diese Forderungen nicht immer in dem gewünschten Umfange erfüllen und müssen je nach den Umständen mehr oder weniger reduziert werden. Jedenfalls aber dürfen sie nicht unter folgendes Mindestmaß herabsinken, ohne Gefahr den Zweck der Malleïnisation illusorisch zu machen: Drei Messungen am Vortage der Einspritzung (womöglich noch eine vierte unmittelbar vor der Injektion) und zweistündliche Messungeu von der 6. bis zur 20. Stunde nach der Einspritzung. Bei dieser Anordnung verzichtet man freilich auf eine nähere Einsicht sowohl in die „normalen" Temperaturverhältnisse des Versuchsobjektes, als auch in die unter Umständen sehr wertvolle Reaktion des zweiten Tages. Da mit dem Thermometrieren nicht früher begonnen zu werden braucht, als 6 Stunden nach der Einspritzung, so ist es am zweckmäßigsten, diese auf die Zeit zwischen 10 und 12 Uhr abends zu verlegen.

Alle äußeren Bedingungen, welche auf die Körperwärme der Tiere von störendem Einfluß sein könnten, sind für die Beobachtungsdauer sorgfältig zu eliminieren. Vor allem müssen die Pferde daher schon während der Voruntersuchung, sowie während der Reaktionsperiode selbst, in völliger Ruhe und in ein und demselben wohltemperierten Raume, geschützt vor Zugwinden [Foth[23])] gehalten werden. Endlich ist es von Wichtigkeit, daß die Pferde zur Zeit der thermischen Reaktion nicht überfüttert (Schlegel) und besonders nicht mit kaltem Wasser getränkt [Matweïeff[91])] werden, da bei Unterlassung dieser Vorsichtsmaßregeln die Fieberkurve derart entstellt werden kann, daß sie jeden diagnostischen Wert einbüßt.

---

*) Foths[23]) Bedenken, daß durch diese Wahl des Injektionsortes die Fehlerquelle bei nicht rotzigen Pferden vergrößert werden könnte, ist unbegründet. Fast von dem Moment der Entdeckung des Malleïns an, habe ich mit Helmann und nach ihm beinahe ausschließlich die Vorderbrust zu den Einspritzungen benutzt und kann auf Grund dieser Erfahrung nur das oben gesagte aufrecht erhalten. Im Gegenteil ist es mir wiederholt gelungen, die Ursache einer scheinbaren atypischen Reaktion malleöser Pferde darin zu finden, daß die Einspritzung am Halse und zu tief (besonders bei unruhigen Tieren) ausgeführt worden war. Die bei empfindlichen rotzfreien Pferden auftretende Schwellung kann ja freilich aus anatomischen Gründen an der Vorderbrust etwas größer ausfallen als am Halse, entbehrt aber stets der übrigen charakteristischen Merkmale, wie Schmerzhaftigkeit, Hitze, progressive Ausbreitung, tagelanger Bestand.

b) Beurteilung der Malleïnreaktion.

Zwischen dem gänzlichen Ausbleiben aller Reaktionserscheinungen und dem Auftreten des vollen sub IV b geschilderten Bildes wird in der Praxis eine ganze Reihe von Übergängen angetroffen. Dieser Umstand hat BABES[3]) und FURTUNA sogar veranlaßt, eine eigene Nomenklatur einzuführen, indem sie große und kleine typische Reaktion, progressive Reaktion, große und kleine atypische Reaktion unterscheiden*). Schon die Kardinalfrage, was überhaupt als typische Reaktion anzuerkennen sei, hat noch keine absolut einheitliche Beantwortung gefunden.

Ursprünglich verlegten einzelne Autoren (KALNING, FOTH[21]), PREUSSE[68]) u. a.) das Hauptgewicht nur auf die Temperatursteigerung, die durch das Malleïn hervorgerufen wird. Andere berücksichtigten zwar auch die örtliche Geschwulstbildung, bemaßen aber die thermische Reaktion nur nach der Differenz ante et post injectionem (1—1,5—2° C), ohne die absolute erreichte Temperaturhöhe in Anschlag zu bringen (HELMANN, NOCARD, LECLAINCHE[46]), JOHNE[38]), DIECKERHOFF und LOTHES, MALZEFF, THOMASSEN u. a.), und wollten sogar nach der Größe dieser Differenz den Grad des Rotzverdachtes bemessen (SCHINDELKA[73]), FREDERIKSE u. a.). Schon richtiger war es, die absolute Höhe, welche die Temperatur nach der Malleïninjektion erreicht, als Maßstab für die Beurteilung der thermischen Reaktion heranzuziehen [MAC FADYEAN[50]), TRÖSTER[87]), BABES[3])], denn, haben wir es mit sehr niedrigen Ausgangstemperaturen zu tun, so kann selbst bei einem Anstieg um 2° die Kurve noch unterhalb derjenigen Grenze (40° C) bleiben, welche wir als Minimum der Malleïnwirkung bei rotzigen Pferden ansetzen müssen. Selbstverständlich darf es sich auch hier nicht um ein bloßes Emporschnellen der Temperatur bis über das erwähnte Minimum handeln, sondern ihre Kurve muß einem ganz bestimmten Typus entsprechen. Was diesen letzteren anbetrifft, so sind die meisten (NOCARD[63]), PREUSSE[68]), HUTYRA und PREISZ, BABES[3]) usw.) darin einig, daß er durch die mindestens 24 Stunden andauernde Erhebung der Temperatur über das Ausgangsniveau charakterisiert wird, wobei der Anstieg dieser langgestreckten Kurve im allgemeinen steiler ist als der Abfall. SCHINDELKA[73]), FOTH[23]) u. a. halten ein geringes Einsinken der Kurve auf ihrer Höhe für charakte-

---

*) Nach FURTUNA[26]) sind die Merkmale der einzelnen Typen in Kürze folgende:

Große typische Reaktion. Der Temperaturanstieg beginnt 7 Stunden nach der Injektion und erreicht das Maximum von über 40° C nach weiteren 7 Stunden. Auf der Höhe macht die Temperatur einige Schwankungen und sinkt nach 21 Stunden ab, ohne jedoch die Norm zu erreichen. Am zweiten Tage erhebt sie sich von neuem auf 40° oder 39,5°, worauf sie allmählich abfällt, um nach 48 Stunden zur Norm zurückzukehren. Ungefähr gleichzeitig mit der thermischen Reaktion entsteht eine schmerzhafte lokale Geschwulst von mehr als 10 cm im Durchmesser, welche nicht vor Ablauf von 50 Stunden schwindet. Endlich werden Allgemeinerscheinungen von verschiedener Intensität beobachtet und zwar stärker bei frischem Rotz als bei chronischem.

Kleine typische Reaktion. Die Temperaturkurve trägt im Allgemeinen genau den gleichen Charakter, wie bei der großen typischen Reaktion, nur daß sie in keinem Momente die Höhe von 40° C erreicht.

Progressive Reaktion. Die Temperatursteigerung vollzieht sich nach dem Typus der großen typischen Reaktion, aber am zweiten Tage weist sie eine größere Höhe auf als am ersten Tage nach der Injektion.

Große atypische Reaktion. Die Temperatur steigt über 40°, hält sich aber nicht auf dieser Höhe, sondern sinkt nach einigen Stunden zur Norm zurück, ohne sich darnach wieder zu erheben.

Kleine atypische Reaktion. Es findet am ersten Tage eine Temperatursteigerung statt, welche jedoch in keinem Moment 40° erreicht.

ristisch, Semmer[79]), Babes[3]), Furtuna[26]) u. a. — einen erneuten Anstieg am 2. Tage nach der Malleïninjektion.

Auch die lokalen Veränderungen an der Injektionsstelle fanden lange Zeit keine einheitliche Beurteilung. Während die einen, wie oben erwähnt, sie als diagnostisch belanglos übersahen und andere ihnen nur eine sekundäre Bedeutung zuerkannten (Tátray scheint diesen Standpunkt auch jetzt noch einzunehmen), stellt gegenwärtig die Mehrzahl an eine typische Malleïnreaktion die Anforderung, daß sie von einer großen, schmerzhaften und tagelang persistierenden Geschwulst begleitet sei. Nach unseren Erfahrungen stellt die Geschwulstbildung durchaus einen integrierenden Bestandteil der Malleïnreaktion dar, denn wir haben sie bei rotzkranken Pferden auch dann auftreten sehen, wenn die Temperatursteigerung mangelhaft war oder ganz ausblieb, sei es weil eine zu geringe Malleïndosis zur Anwendung kam, sei es weil die Pferde sich bereits an Malleïn gewöhnt hatten oder aus anderen Gründen unfähig waren, thermisch zu reagieren. Daher müssen wir Mac Fadyean[51]), Stubbe und Furtuna[26]) durchaus beipflichten, welche der Impfgeschwulst unter Umständen eine selbständige diagnostische Bedeutung vindizieren.

Die typische Malleïnreaktion setzt sich somit aus zwei Komponenten zusammen: 1. aus einer Temperatursteigerung auf nicht weniger als 40° C und von mindestens 24 Stunden langer Dauer, 2. aus einer mehrere Tage sich haltenden Geschwulst an der Impfstelle von wenigstens 15 cm Durchmesser, meist aber bedeutend größeren Dimensionen. Auftreten einer typischen Reaktion stellt die Diagnose „Rotz“ vollkommen sicher.

Völliges Ausbleiben jeglicher Reaktionserscheinungen (wobei kurz dauernde minime Temperaturerhöhungen und ebensolche Hautschwellungen praktisch überhaupt nicht in Anschlag zu bringen sind) schließt in der erdrückenden Majorität der Fälle das Vorhandensein einer Rotzinfektion aus. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß frisch infizierte Pferde während der Inkubationszeit ein negatives Malleïnresultat ergeben können, weil sie noch keine Reaktionsfähigkeit erworben haben*). Aus diesem Grunde ist prinzipiell nichts einzuwenden gegen die besonders von der rumänischen Rotztilgungskommission befürwortete Widerholung der Prüfung nach reaktionslosem Verlauf einer ersten Malleïnisation.

Atypische Reaktionen irgend welcher Art berechtigen zu keiner Diagnosenstellung. Der Grund für die Abweichungen vom Typus ist in den meisten Fällen in fehlerhafter Ausführung der Malleïnisation zu suchen. In einem anderen Teile der Fälle beruhen sie darauf, daß die betreffenden Pferde, obwohl rotzkrank, nicht imstande sind, mit ihrer Körpertemperatur typisch auf das Malleïn zu reagieren. Letzteres wird bisweilen bei weit vorgeschrittenem Rotz beobachtet (Nocard, Semmer, Cochrane, Schlegel u. a.), der meist auch ohne Hilfe von Malleïn erkannt werden kann, sodann bei Tieren, welche zur Zeit der Einspritzung bereits fiebern und schon deshalb von der Malleïnprüfung auszuschließen sind. Ferner ist auch ein stark reduzierter Ernährungszustand der Ausbildung einer typischen Reaktion hinderlich, wie Foth[23]) in praxi, Riegler[26]) experimentell konstatiert hat und wir auf Grund von Beobachtungen Matweïeffs im Hungergebiet bestätigen können. Endlich

*) Ob die beiden von Constant mitgeteilten Fälle in diese Kategorie von Ausnahmen fallen, ist aus seinem kurzen Bericht nicht ersichtlich. Es handelte sich um Pferde, bei denen neun Tage nach zweimaliger negativ ausgefallener Malleïnprüfung der Rotz klinisch manifest wurde.

kann auch durch gewisse Medikamente, wie Chinin und Karbol (subkutan) noch den Versuchen von JEWSEÏENKO die Reaktionsfähigkeit zeitweilig beeinträchtigt werden. In den meisten Fällen kann der Zweifel durch eine lege artis ausgeführte zweite Einspritzung gehoben werden, jedoch hat man sich vor einer zu frühzeitigen Wiederholung zu hüten. Obwohl BABES u. a. eine Pause von acht Tagen zwischen den Injektionen für ausreichend halten, wird man doch besser tun, 2—3—4 Wochen zuzuwarten, da eine Gewöhnung an das Rotztoxin nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Eine Erhöhung der Malleïndosis bei der Wiederholung, wie dies FOTH, JOHNE[36]) u. a. anraten, ist unseren Erfahrungen nach, die auch SCHLEGEL bestätigt, nicht erforderlich.

Die Frage von der Aufstellung einheitlicher Grundsätze für die Beurteilung der Malleïnreaktion ist auch Gegenstand der Verhandlungen des letzten tierärztlichen Kongresses zu Budapest (1905) gewesen, welcher unter anderem folgende Resolutionen gefaßt hat:

1. Um eine vom Malleïn hervorgerufene Reaktion als diagnostisch positiv (konfirmativ) bezeichnen zu können, ist es notwendig, daß sie die Charaktere einer typischen Reaktion trägt.

2. Unter typischer Reaktion hat man eine Temperatursteigerung von wenigstens zwei Graden zu verstehen, die über 40° reicht und die im Laufe des ersten Tages gewöhnlich ein Plateau oder zwei Kulminationen, ferner am zweiten, zuweilen selbst noch am dritten Tage eine mehr oder minder hohe Ansteigung aufweist und von einer lokalen sowie einer allgemeinen Reaktion begleitet ist.

3. Jede Temperatursteigerung bis unter 40° sowie höhere atypische Reaktionen erfordern eine Nachprüfung.

4. Eine allmählich ansteigende und dann hochbleibende Temperatur ist ein Zeichen von Rotz, wenn sie auch vom gewöhnlichen Typus der diagnostichen Reaktion abweicht

5. Die lokale typische Infiltration der Injektionsstelle ist ein sicherer Beweis des Vorhandenseins von Rotz, auch wenn die Temperatursteigerung und die allgemeine organische Reaktion ausbleibt.

6. Sämtliche malleïnisierte Tiere, gleichviel ob sie reagierten oder nicht, müssen stets zweimal dem Versuche unterzogen werden und zwar im Zeitraume von 10 bis 20 Tagen.

VII. Die praktische Bedeutung des Malleïns.

a) Die diagnostische Bedeutung des Malleïns.

Wollte man die diagnostische Bedeutung des Malleïns auf statistischem Wege feststellen, so müßte man über ein bedeutend ausgedehnteres Material und einheitlicher geführte Beobachtungen disponieren als diejenigen, welche bisher in der Literatur vorliegen. In dem Widerstreit der Meinungen, auf den einzugehen hier nicht der Ort ist, haben die Malleïngegner ihr Hauptaugenmerk auf diejenigen Fehldiagnosen gerichtet, bei denen angeblich nicht rotzige Pferde auf das Malleïn reagiert haben sollten, anstatt, wie BOROWSKY noch neuerdings betont, von der Frage nach der reaktionslosen Malleïnisation notorisch rotzkranker Pferde auszugehen.

Die Zahl der Fälle, in denen von einer Fehldiagnose die Rede sein könnte, schrumpft immer mehr ein, je mehr wir unsere Kritik gegenüber der Malleïnreaktion, der Malleïnisationstechnik und den Obduktions-

befunden an nach der Reaktion getöteten Pferden schärfen. Wie mehrfach hervorgehoben, berechtigt nur eine typische Reaktion zur Diagnosenstellung; wenn Abweichungen vom Typus bestehen, welche ja zum Teil auf technischen Fehlern beruhen können, so muß die Diagnose in suspenso bleiben.

Selbstverständlich kann von einer Fehldiagnose überhaupt nicht gesprochen werden, solange das fragliche Objekt nicht obduziert worden ist. Nun ist es freilich durchaus zutreffend, daß bei weitem nicht immer in den Organen von Pferden, welche typisch reagiert haben, zweifellos frische malleöse Veränderungen getroffen werden, selbst bei äußerst gewissenhafter und sorgfältiger Ausführung der Sektion. In einem Teil dieser Fälle werden alte, der regressiven Metamorphose verfallene Knoten und Knötchen gefunden, deren Charakter anatomisch und histologisch nicht mehr festgestellt werden kann. Es darf natürlich nicht dem Gutdünken des Beobachters überlassen bleiben, dieselben für rotzig oder für nicht rotzig zu erklären, sondern es müssen weitere Untersuchungen vorgenommen werden (vor allem das Tierexperiment), denen es dann auch bisweilen gelingt, die Frage zu lösen. Hierbei ist die wohlkonstatierte Tatsache wohl im Auge zu behalten, daß in alten notorischen Rotzknoten oft keine lebensfähigen Bazillen mehr vorhanden sind, während die spezifische Empfindlichkeit ihres Trägers gegen das Malleïn noch nicht geschwunden ist. In einem Teil der Fälle fehlen selbst solche zweifelhafte Knoten, welche als Anhaltspunkt dienen könnten, so daß die Gegner des Malleïns recht zu haben scheinen. Meiner Überzeugung nach haben wir jedoch sodann die Pflicht, eher die Vollkommenheit unserer Untersuchungsmethoden als die Richtigkeit der Malleïnangaben in Frage zu ziehen, denn bei einer ganzen Reihe von derartigen scheinbar negativen Befunden ist es uns dennoch gelungen, die Anwesenheit von Rotzbazillen nachzuweisen, indem wir aus fast sämtlichen größeren Lymphdrüsengruppen Verimpfungen am Meerschweinchen vornahmen. Bald waren es die makroskopisch unveränderten (höchstens etwas saftigeren) submaxillaren, bald die bronchialen oder inguinalen, in mehreren Fällen die subperitonealen Lymphdrüsen, welche das infektiöse Material enthielten. Mithin müssen am Kopf, in der Lunge, an den Extremitäten, im Darm usw. malleöse Prozesse bestanden haben, welche sich entweder ihrer Kleinheit wegen unserer Beobachtung entzogen hatten oder bereits selbst ausgeheilt waren.

Vielfach ist als Grund von Fehldiagnosen die vermeintliche Tatsache herangezogen worden, daß auch andere Krankheiten sich dem Malleïn gegenüber wie Rotz verhalten; und zwar wurden als solche vor allem genannt: Druse, Lungenemphysem, chronische Pneumonien, Katarrhe der Luftwege, Pleuritis, bösartige Geschwülste, Melanose, Botryomykose, Aktinomykose (Schindelka[73 74]), Liautard, Tröster[86]), Krajewsky). Dem gegenüber ist hervorzuheben erstens, daß in solchen Fällen die Reaktion nur in einer Temperatursteigerung bestand und bei Wiederholung der Injektion ganz ausblieb (Humbert, Jaworsky, Wirtz, Nocard[59 63]); und zweitens, daß bei ebendenselben Krankheiten das Malleïn von anderen Beobachtern ganz wirkungslos gefunden wurde (Dieckerhoff und Lothes, Kitt, Pruschkowsky, Schlegel).

Aus allen angeführten Gründen dürfte wohl der Prozentsatz an Fehldiagnosen durch Malleïn auf eine so minime Zahl heruntersinken, daß demselben kaum noch eine praktische Bedeutung beizumessen ist. Hierbei ist Voraussetzung, daß alle atypischen Reaktionen überhaupt

nicht zur Diagnosenstellung verwertet werden. Ihnen kommt eine praktische Bedeutung nur in sofern zu, als sie bei der Rotztilgung gewisse Maßnahmen indizieren, wovon weiter unten die Rede sein wird.

b) Die therapeutische Bedeutung des Malleïns.

Die therapeutische Bedeutung des Malleïns läßt sich nicht mit Sicherheit nachweisen wegen der Möglichkeit einer Spontanheilung des Rotzes. Die früher viel umstrittene Frage, ob beim Rotz überhaupt eine spontane völlige Genesung vorkommt, ist bereits von den älteren Beobachtern vielfach (Curtis, Haubner, Bouley, Johne[37]), Debrade, Noniewicz usw.) bejahend beantwortet worden. Unter gewissen klimatischen Verhältnissen, z. B. in Ägypten (Meyrick) und in Südrußland (Semmer[78]), scheint der Ausgang des chronischen Rotzes der Pferde in Heilung ein nicht eben seltenes Vorkommnis zu sein. Häufig genug wird ferner von erfolgreicher therapeutischer Bekämpfung der Krankheit gemeldet; so verdient u. a. die Aussage Neimanns Beachtung, dem es bei 16 nachgewiesenermaßen rotzkranken Perden durch geeignete Behandlung gelungen ist, vollständige (experimentell konstatierte) Wiederherstellung zu erzielen. Seit der diagnostischen Anwendung des Malleïns mehrt sich beständig die Zahl derartiger Mitteilungen (Nocard[60 61 62 63]). Da somit unter günstigen Bedingungen Rotz auch spontan mit Genesung endet, so besitzen wir keine unzweifelhaften Kriterien, um den Heileffekt des Malleïns zu bemessen. Andererseits dürfen wir nicht in Abrede stellen, daß durch wiederholte Einspritzungen dieses Mittels eine gewisse Giftfestigkeit erzeugt werden kann, welche auf den Ausgang der Rotzinfektion eventuell einen günstigen Einfluß ausübt. Babes[3]), Pilavios, Mac Fadyean[52]) empfehlen zu diesem Zweck bei Pferden die häufige Applikation steigender Dosen. Aber auch bei weniger intensiver Malleïnbehandlung (Hueppe, Leclainche[47]), Jewseïenko u. a.) sind Rotzheilungen beobachtet worden. Bonome[7]) gibt an, bei einem Menschen Malleïn mit gutem therapeutischen Erfolg angewendet zu haben.

c) Die Bedeutung des Malleïns für die Tilgung des Rotzes.

Wir besitzen kein anderes Mittel, welches mit gleicher Sicherheit, Schnelligkeit und Leichtigkeit den okulten Rotz der Pferde aufzudecken gestattet wie das Malleïn. Hierauf eben beruht seine Bedeutung für die Tilgung des Rotzes. In früheren Zeiten war aus Pferdebeständen, in denen sich Rotz manifestiert hatte, die Krankheit kaum auszumerzen, weil wir keinerlei Anhaltspunkte dafür hatten, die bereits infizierten Tiere auszuscheiden, bevor sie offenkundige Symptome zeigten und somit bereits zur Infektionsquelle für ihre Stallgenossen geworden waren. Endlose Absperrmaßregeln, denen natürlich auch die völlig gesunden Pferde des Bestandes unterlagen, fügten außerdem den Besitzern enormen materiellen Schaden zu. Gegenwärtig kann mit Hilfe des Malleïns die Sichtung in kürzester Frist vollzogen sein. Diejenigen Pferde, welche die Injektion reaktionslos vertragen haben, werden sofort (oder gemäß der Resolution des Budapester Kongresses nach Remalleïnisation mit gleichem negativen Resultat) als unverdächtig freigegeben, diejenigen, welche in typischer Weise reagiert haben für rotzkrank erklärt. Was die Tiere anbetrifft, bei denen eine atypische Reaktion zutage tritt, so sind sie als „verdächtig“ zu betrachten und unterliegen einer resp. mehreren erneuten Malleïnisationen, um je nach deren Ausfall in die entsprechende Kategorie eingereiht zu werden. Die durch das Malleïn als rotzkrank

bezeichneten Pferde werden in praxi meistens unverzüglich getötet; wie wir jedoch sogleich sehen werden, kann die Zahl der Opfer bei planmäßigem Vorgehen bedeutend verringert werden.

Es ist das unzweifelhafte Verdienst Nocards[62]), zuerst einen planmäßigen Kampf gegen den Rotz mit Hilfe des Malleïns organisiert zu haben. Sein Programm ist in Kürze folgendes: 1. Jedes Pferd, welches irgendwelche rotzverdächtigen Symptome aufweist, ist zu malleïnisieren und unterliegt, falls es typisch reagiert, der Tötung; reagiert es nicht, ist es als gesund freizugeben. 2. Sobald ein Pferd als rotzig erkannt ist, sind alle Pferde desselben Bestandes mit Malleïn zu prüfen, worauf sie in zwei Gruppen geteilt werden. In die Gruppe I kommen diejenigen Tiere, welche keinerlei Reaktion gezeigt haben: sie stehen als gesund zur freien Verfügung des Besitzers, nur müssen sie in desinfizierte Stallungen übergeführt werden, und es wird zu ihnen kein neues Pferd hinzugestellt, welches nicht zuvor die Malleïnprobe bestanden hat. Die Gruppe II umfaßt alle Pferde, welche, ohne klinische Rotzsymptome aufzuweisen, mehr oder weniger typisch reagiert haben. Auch diese werden gesondert aber unter strenger Kontrolle in desinfizierte Stallräume untergebracht und alle 1—2 Monate von neuem einer Malleïninjektion unterworfen. Jedes Pferd, welches während dieser Beobachtungszeit außer der Reaktion noch irgend ein Anzeichen von Rotz verraten sollte, wird unverzüglich getötet; dagegen können diejenigen Pferde, welche zwei aufeinanderfolgende Injektionen reaktionslos bestanden haben, als gesund freigegeben (in die Gruppe I übergeführt) werden.

Auf diese Weise wird einerseits der Rotz mit Sicherheit aus dem Bestande ausgemerzt und andererseits ein Teil der zur Zeit der ersten Prüfung an okkultem Rotz leidenden Tiere dem Besitzer erhalten, indem man sie unter Bedingungen genesen läßt, welche für den zweifellos gesunden Teil des Bestandes keine Gefahr involvieren.

Diese Tilgungsmethode ist nicht nur von Nocard selbst vielfach in großem Maßstabe (z. B. bei den Fiakerkompagnien von Paris) sondern häufig auch von anderen mit glänzendem Erfolge angewandt worden. Zweifellos ist sie noch weiter vervollkommnungsfähig. Schon Johne[38]) erklärte es für ratsam, wenn irgend möglich die Diagnose auf eine zweimalige Maleïnisation zu stützen. Die von der rumänischen Regierung zur Erforschung des Malleïns eingesetzte Kommission [Babes[3]), Furtuna[25])] erklärte sich für eine noch häufigere Applikation des Malleïns vor der Diagnosestellung und erweiterte den Rotztilgungsplan auch in anderweitiger Beziehung. Sie verlangte, daß alle ins Land eingeführten Pferde gleich nach ihrer Ankunft malleïnisiert werden. Dieselbe Maßregel sollen die Besitzer bei jedem neu gekauften Pferde anwenden. Systematische Malleïnisierungen und Remalleïnisierungen sind in jedem Pferdebestande auszuführen, welcher mit einem rotzkranken Tiere in Berührung gekommen ist.

Was die Einzelheiten der in jedem Falle zu befolgenden Regeln anbetrifft, so faßt sie Babes[3]) folgendermaßen zusammen: „Auf Grund unserer Untersuchungen empfehlen wir einstweilen folgendes Vorgehen zum Zecke der Bekämpfung des Rotzes: Vernichtung der manifest rotzigen Pferde, zweimalige Malleïnisierung in Zwischenräumen von 1—2 Wochen behufs Sicherung der Reaktion, Separieren der Pferde, welche wenigstens einmal typisch reagiert haben, in dem gründlich desinfizierten Stalle, sowie Entfernung und Freigeben der nicht reagierenden oder bloß atypisch reagierenden Pferde aus demselben, Vernichtung jener Pferde,

welche irgend ein verdächtiges Symptom und typische Reaktion gezeigt haben, individuelle Trinkgefäße und Utensilien für die reagierenden Pferde, welche bloß unter bestimmten Vorsichtsmaßregeln zur Arbeit benutzt werden dürfen, systematische Malleïnisierung dieser Pferde mit steigenden Dosen während eines Monates; nach Verlauf des zweiten Monates zwei Malleïnisierungen mit der gewöhnlichen Dosis: jene Pferde, welche noch typisch reagieren, werden entweder getötet oder, wenn zu zahlreich oder wertvoll, von neuem behandelt und nach einem weiteren Monat auf ihre Reaktion hin untersucht, worauf die Tötung der dennoch reagierenden Pferde angezeigt ist. Wertvollere Pferde kann man allerdings noch längere Zeit in Behandlung lassen, nachdem diese Pferde, wie wir gesehen haben, in den meisteu Fällen keinerlei offene rotzige Veränderungen aufweisen. Die Pferde können ohne große Ansteckungsgefahr um so mehr in Beobachtung bleiben, als die reagierenden und, ohne klinische Symptome aufzuweisen, getöteten Pferde in 80 % kein infektiöses Material mehr erkennen lassen."

Es muß vorab weiteren praktischen Erfahrungen überlassen bleiben zu entscheiden, ob die komplizierte rumänische Methode, welche jedenfalls mit größerem Aufwand an Zeit und Kosten verbunden ist, so wesentliche Vorteile bietet, daß sie in praktischer Beziehung den Vorzug vor dem NOCARDschen Verfahren beanspruchen kann.

Nachträge.

I. Darstellung des Malleïns im Laboratorium des Bureau of Animal Industry zu Washington*). Rotzkulturen auf Glyzerinbouillon werden 4—5 Monate im Thermostaten kultiviert, worauf sie bei Zimmertemperatur bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt werden. Letztere besteht darin, daß die Kulturen zunächst im Trockenschrank bei 140° eine halbe Stunde lang zum Kochen gebracht, darauf mindestens eine Woche kühl aufbewahrt, dann dekantiert und ohne Zusatz von Desinfizientien bis zur Filtration im Eisschrank gehalten werden. Die Filtration geschieht durch Tonkerzen, entweder unter Benutzung des Vakuums, was sehr viel Zeit in Anspruch nimmt, oder aber unter hydraulischem Druck, wobei eine Geschwindigkeit von 100 ccm Filtrat pro Stunde erzielt werden kann. Weiterhin wird das Filtrat im Wasserbade auf $^1/_3$ des ursprünglichen Kulturquantums eingedampft; die auf diese Weise entzogenen $^2/_3$ Flüssigkeitsmenge werden dann wieder ersetzt, und zwar $^1/_6$ durch Glyzerin und $^3/_6$ durch 1 % Karbollösung (Beispiel: Originalquantum 3000, Verdampfungsrückstand 1000, Glyzerinzusatz 500, Karbollösung 1500). Die Einzeldosis für ein Pferd beträgt 1 ccm. Der Ablaß geschieht in Fläschchen unter Kork- und Siegelverschluß zu 1—6 Dosen.

II. Ophthalmoreaktion. Die ersten Versuche über Ophthalmoreaktion bei Rotz sind von CHOROMANSKY**) ausgeführt worden und haben zu dem Resultate geführt, daß Pferde, welche auf eine subkutane Injektion von Malleïn reagieren, auch auf Einführung des Malleïns in den Konjunktivalsack Reaktion geben. Wir haben diese Befunde im all-

---

*) Nach mündlicher Mitteilung, welche im Laboratorium zu Washington dem Verfasser gemacht worden ist.

**) K. CHOROMANSKY, Wirkung des Malleïns auf die Konjunktiva des Auges, Archiv für Veterinärwisssensch. 1907 (russisch).

gemeinen durchaus bestätigen können*), sind dabei aber auf die Tatsache gestoßen, daß die Ophthalmoreaktion auch bei solchen Pferden positiv ausfallen kann, welche ursprünglich in typischer Weise thermisch und lokal auf subkutane Malleïnisation reagiert haben, in der Folge aber — vom Rotz geheilt — die Fähigkeit, thermisch zu reagieren, verloren haben, während eine Geschwulst am Orte der Injektion noch auftritt.

Aus diesem Grunde neige ich zu der Ansicht, daß die Fähigkeit, auf Einträufelung ins Auge positiv zu reagieren (ganz ebenso wie die Agglutinationsfähigkeit), die Krankheit selbst um ein Bedeutendes überdauern kann. Somit dürfte die Ophthalmoreaktion nur als sekundäres diagnostisches Hilfsmittel neben der üblichen Malleïneinspritzung in Betracht kommen. Bei positivem Ausfall ist sie kein sicheres Anzeichen von noch vorhandenen okkulten malleösen Prozessen; bei negativem Ausfall (und Abwesenheit klinischer Symptome) kann schon eher ein Schluß gezogen werden, und zwar auf Fehlen von Rotzinfektion, insofern nicht Grund zur Vermutung vorliegt, daß die geprüften Tiere sich noch im Anfang der Inkubation befinden.

Die von Choromansky und uns angewandte Technik bestand darin, daß den Pferden 0,1 ccm unseres russischen Malleïns unverdünnt in den rechten Konjunktivalsack eingeträufelt wurde. Geschah die Instillation am Abend, so war schon am nächsten Morgen der Ausfall der Reaktion den Pferden von weitem anzusehen. War der Ausfall positiv, so bestand an dem rechten Auge (und nur an diesem) das Bild einer Konjunktivitis, deren Intensität in den einzelnen Fällen von leichter Rötung und Tränenträufeln bis zu starker Gefäßinjektion und Absonderung eines eiterartigen Sekretes schwankte.

Literatur.

1) Babes, A., Note sur une substance isolée du bacille de la morve. Arch. de méd. erpér. 1892.
2) Babes, V., Observation sur la morve. Ibid. 1892, Tome III.
3) Ders., Die Bekämpfung der Rotzkrankheit des Pferdes. Zeitschr. für Hyg. und Infekt. 1902, Bd. XXXIX.
4) Bang, B., Forsög med Malleïn. Tidskrift for Veterinaerer 1892, Bd. XXII. (Baumgartens Jahrbericht.)
5) Beinarowitsch, S. K., Über die Dosierung des Tuberkulins usw. Bote für öffentl. Veterinärwesen 1903 (russisch).
6) Besredka, Etudes sur le bac. typhique etc. Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, Tome XIX.,
7) Bonome, A., Nuove osservazioni sull' efficacia diagn. et curat. dei prodotti del bac. della morva etc. Riforma med. 1894, No. 2. — Deutsche med. Wochenschrift 1894.
8) Bonome, A. e Vivaldi, M., Sull' importanza della malleina etc. Riforma med. 1892.
9) Borowsky, P. J., Die Genauigkeitsgrenzen der Malleïnangaben. Vet.-Chronik des Chersonschen Gouvernements 1906 (russisch).
10) Bouley, Recueil de méd. vétér. 1861 (zitiert nach Noniewicz).
11) Bromberg, P., De l'influence des plus hautes températures etc. Compt. rend. de traveaux de l'Inst. vétér. à Kharkow, Tome III, 1889 et 1890 (russisch).
12) Cadiot et Roger, Action de la tuberculine et de la malléine sur la sécretion sudorale. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1893.
13) Cochrane, Cecil R., Glanders in South Africa. Journ. comp. Path. and Therapeut. 1902.
14) Constant, VIII. Intern. Tierärztl. Kongreß in Budapest 1905, Bd. III.

*) A. Wladimiroff, Über Ophthalmoreaktion bei Rotz, Berliner Tierärztl. Wochenschr. (im Druck).

15) CURTIS, The Veterinarian 1840 (zitiert nach NONIEWICZ).
16) DEBRADE, Arch. vétér. 1883 (zitiert nach NONIEWICZ).
17) DIECKERHOFF und LOTHES, Beiträge zur Beurteilung des Malleïns. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1891 und 1892.
18) FINGER, ERNEST, Zur Frage der Immunität und Phagocytose beim Rotz. Zieglers Beiträge 1889, Bd. VI.
19) FOTH, H., Untersuchungen über die wirksamen Bestandteile des Malleïns. — Über Malleïn. Zeitschr. für Veterinärkunde 1892, Bd. IV.
20) Ders., Über die praktische Bedeutung des trockenen Malleïns (Malleïnum siccum). Zeitschr. für Tiermedizin 1893, Bd. XIX.
21) Ders., Gleicher Titel, Ebenda 1894, Bd. XX.
22) Ders., Über die Gewinnung eines festen Malleïns und über seine Bedeutung usw. Berlin 1896.
23) Ders., Feststellung einheitlicher Grundsätze für die Beurteilung des Malleïns. VIII. Intern. Tierärztl. Kongreß in Budapest 1905, Bd. I.
24) FREDERIKSE, Sur l'usage de la malléine. Recueil de méd. vétér. 1895.
25) FURTUNA, S. ST., Das Resultat der in Rumänien mit Malleïn gemachten Experimente. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1901.
26) Ders., Etablissement de principes uniformes pour l'estimation de la réaction de la tuberculine et de la malléine. VIII. Intern. Tierärztl. Kongreß in Budapest 1905, Bd. I und III.
27) GALTIER, V., Action de l'essence térébenthine sur les virus. Journ. de méd. vétér. 1901.
28) GUINARD, L. et ARTAUD, J., Étude comparée de certaines modifications cardiovasculaires produites par la malléine etc. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1895.
29) GUTZEIT, Über Malleïn. Zeitschr. für Veterinärkunde 1892, Bd. IV.
30) HAUBNER, Magazin von Gurlt und Hertwig 1895 (zitiert nach NONIEWICZ).
31) HELMANN, CH., Diagnose des Rotzes mittels subkutaner Injektion von Rotzbazillenextrakt. Bote für öffentl. Veterinärwesen 1891 (russisch).
32) HUEPPE, FERD., Einige Betrachtungen über die Wirkung des Malleïns. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1894.
33) HUMBERT, Bull. de la Soc. centr. vétér. 1894.
34) HUTYRA, FR. und PREISZ, H., Über den diagnostischen Wert des Malleïns. Deutsche Zeitschr. für Tiermedizin 1894, Bd. XX.
35) JAWORSKY, P., Zur Frage von der diagnostischen Bedeutung des Malleïns. Arch. für Veterinärwissensch. 1895 (russisch).
36) JEWSEÏENKO, S., Rotz und seine diagnostischen Mittel. Bote für öffentl. Veterinärwesen 1896 (russisch).
37) JOHNE, A., Bericht über das Veterinärwesen im Königreich Sachsen 1870 (zitiert nach NONIEWICZ).
38) Ders., Ebenda 1891. (Ellenb. und Schütz Jahresb.)
39) KALNING, O., Zur Diagnose des Rotzes. Arch. für Veterinärwissensch. 1891 (russ).
40) KITT, TH., Malleïnprüfungen in Bayern. Wochenschr. für Tierheilkunde 1901. (Ellenb. und Schütz Jahresber.)
41) KLEINE, F. K., Über Rotz. Zeitschr. für Hygiene und Infekt. 1903, Bd. XLIV.
42) KLEPZOFF, K. S., Immunisierung mit Proteinen des Bac. malleï. Veter.-Rundschau 1899 (russisch).
43) KRAJEWSKY, A. A., Material zur Malleïnfrage. Arch. für Veterinärwissensch. 1899 (russisch).
44) KRESLING, K., Sur la préparation et la composition de la malléine. Arch. des sciences biol. 1892, Tome I.
45) Ders., Zur Biologie und Chemie des Tuberkel- und Rotzbazillus. Pharmac. Zeitschr. für Rußland 1894.
46) LECLAINCHE, Études sur la malléine. Rev. vétér. 1892.
47) Ders., Notes sur la malléine. Ebenda 1894.
48) LIAUTARD, A., Some experimental researches on the use of malleine. Amer. veter. Review 1895, Vol. XVIII.
49) LÖFFLER, Die Ätiologie der Rotzkrankheit. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundh.-Amt 1886, Bd. I.
50) MAC FADYEAN, Malleïn as an aid to the diagnosis of glanders. Journ. comp. Path and Therap. 1893, Vol. VI.
51) Ders., The diagnostic value of the local reaction after malleïn. Ebenda 1894, Vol. VII.
52) Ders., The curability of glanders. Ebenda 1900, Vol. XIII.
53) MAKOLDY, A., Veterinarius 1892 und 1893 (ungarisch). (Ellenb. u. Sch. Jahresber.)
54) MALM, Feststellung einheitlicher Grundsätze für die Beurteilung der Tuberkulin- und Malleïn-Reaktion. VIII. Intern. Tierärztl. Kongreß in Budapest 1905, Bd. I.
55) MALZEFF, M., Versuche mit Malleïn. Arch. für Veterinärwissensch. 1892 (russ.).

56) Meyrick, The veter. journ. 1883 (zitiert nach Noniewicz).
57) Neimann, Au sujet du traitement de la morve. Bull. de la Soc. centr. vétér. 1890.
58) Nocard, Ed., Application de la malléine au diagnostic de la morve latente. Bull. de la Soc. cent. vétér. 1892.
59) Ders., Sur la malléine. Ebenda 1894, pag. 180.
60) Ders., Sur les tubercules translucides etc. Ebenda 1896.
61) Ders., Autopsie de chevaux morveux guéris. Recueil de méd. vétér. 1897.
62) Ders., La prophylaxie de la morve du cheval. Ebenda 1897.
63) Nocard, Ed., et Leclainche, E., Les maladies microbiennes des animaux. Paris 1903, 3. édit.
64) Noniewicz, Zur Spontanheilung bei Rotz. Arch. für Veterinärwissensch. 1890. (Russisch.)
64a) Pearson, Leonard, Recent experiments with malleïn etc. Journ. of comp. med. and veter. Archiv 1891, Bd. XII.
65) Peters, Das Rotztilgungsverfahren etc. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1894.
66) Pilavios, Das Malleïn als Heilmittel gegen Rotz. Ebenda 1893.
67) Preusse, M., Versuche mit Rotzlymphe. Ebenda 1891.
68) Ders., Die Beurteilung der Malleïnreaktion. Ebenda 1894.
69) Pruschkowsky, Malleïn- und Tuberkulininjektionen etc. Archiv für Veterinärwissenschaft (russ.) 1896.
70) Sacharoff, P. A., Malleïn und seine Anwendung etc. Ebenda 1893.
71) Ders., Wirkung der Stoffwechselprodukte der Rotzbakterien etc. Ebenda 1893.
72) Sadowsky, Immunisierungsversuche mit Rotzkulturen. Rußkaïa Medic. (russ.) 1891.
73) Schindelka, Einige Erfahrungen über die Anwendung des Malleïns als diagnostisches Mittel. Österr. Zeitschr. für wissenschaftl. Veterinärkunde 1894, Bd. V (Ellenb. u. Sch. Jahresber.).
74) Ders., Einige Versuche über die Wirkung des Malleïns anderen Bakterienproteinen gegenüber. Ebenda 1895, Bd. VI (Ellenb. u. Sch. Jahresber.).
75) Schlegel, M., Die Rotzbekämpfung nach der Malleïnprobe beim Pferde. Stuttgart 1905.
76) Schroeder, Wirkung einiger Desinfizientien auf Reinkulturen von Rotzbazillen. Dissert. (russ.). Jurjeff 1895.
77) de Schweinitz, E. A. and Kilborne, L. F., The use of Malleïn etc. Journ. of comp. med. and veter. Archiv 1892.
78) Semmer, E., Über die gutartige heilbare Form des Rotzes. Deutsche Zeitschr. für Tiermedizin 1894, Bd. XX.
79) Ders., Über die diagnostische Bedeutung des Malleïns etc. Österr. Monatsschrift für Tierheilkunde 1895.
80) Smith, On the influence of slight modifications of culture media etc. Journ. of comp. med. and veter. Archiv 1890.
81) Stepanoff, N. D., Malleïn als Diagnostikum bei Rotz. Gelehrte Notizen des Kasanschen Veter.-Inst. (russ.) 1893.
82) Stubbe, VIII. Intern. Tierärztl. Kongreß in Budapest 1905, Bd. III.
83) Tátray, Festsellung einheitlicher Grundsätze für die Beurteilung der Malleïnreaktion. Ebenda 1905, Bd. I.
84) Thomassen, J. P., De Malleïne als Diagnosticum. Tijdschrift voor Veeartsenijkunde en Veeteelt 1894 (Ellenb. u. Sch. Jahresber.).
85) Tröster, O. R., Zeitschr. für Veterinärkunde 1892, Bd. IV und briefliche Mitteilung an den Verfasser.
86) Ders., Über Malleïnimpfungen bei Truppenpferden. Milit. Veter.-Zeitschr. 1895, Bd. VII (Ellenb. u. Sch. Jahresber.).
87) Ders., Bericht über die mit Malleïnimpfungen . . . . gemachten Erfahrungen. Zeitschr. für Veterinärkunde 1896, Bd. VIII.
88) Wirtz, A. W. H., Allgemeiner Bericht über Versuche mit Malleïn . . . . 1896 auf Befehl der Regierung. Holländ. Zeitschr. 1898 (Ellenb. u. Sch. Jahresber.).
89) Wladimiroff, Sur la sensibilité des animaux à la toxine de la morve. Archiv des sciences biol. 1896, Tome IV.
90) Ders., Rotz. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann 1903, Bd. II.
91) Ders., Immunität bei Rotz (Malleïn). Ebenda 1904, Bd. IV.
92) Woronzoff, W., Eckert, N., Rudenko, A. und Arefin, K., Versuche mit der Anwendung des Malleïns in der russischen Armee. (Deutsche Ausgabe). St. Petersburg 1894.

Sachregister*).

A.

*) Bearbeitet von Dr. VIKTOR K. RUSS (Wien).

B.

I.

J.

K.

M.

N.

O.

S.

T.

W.

X.

Z.

Druck von Ant. Kämpfe in Jena.

HANDBUCH
DER
TECHNIK UND METHODIK
DER
IMMUNITÄTSFORSCHUNG

Unter Mitwirkung von

Dr. A. Boehme, Frankfurt a. M.; Prof. Dr. Calmette, Lille; Prof. Dr. Casper, Breslau; Dr. J. Citron, Berlin; Reg.-Arzt Privatdozent Dr. R. Doerr, Wien; Geh. Obermedizinalrat Prof. Dr. P. Ehrlich, Frankfurt a. M.; Dr. M. v. Eisler, Wien; Prof. Dr. E. Friedberger, Berlin; Prof. Dr. R. Graßberger, Wien; Stabsarzt Dr. E. Hübener, Berlin; Prof. Dr. M. Jacoby, Berlin; Prof. Dr. E. Joest, Dresden; Privatdozent Dr. W. Knoepfelmacher, Wien; Prof. Dr. W. Kolle, Bern; Prof. Dr. R. Kraus, Wien; Dr. B. Kreissl, Wien; Prof. Dr. R. Kretz, Prag; Dr. Krumbein, Bern; Dr. Inmann, London; Dr. C. Levaditi, Paris; Dr. J. Leuchs, Berlin; Dr. E. Loewenstein, Beelitz b. Berlin; Dr. Th. Madsen, Kopenhagen; Prof. E. Metschnikoff, Paris; Prof. Dr. M. Neißer, Frankfurt a. M.; Hofrat Prof. Dr. R. Paltauf, Wien; Dr. W. Paul, Wien; Privatdozent Dr. E. P. Pick, Wien; Privatdozent Dr. Cl. v. Pirquet, Wien; Dr. O. Porges, Wien; Dr. C. Prausnitz, London; Dr. E. Přibram, Wien; Dr. Raebiger, Halle a. S.; Prof. Dr. Roemer, Marburg a. L.; Reg.-Arzt Dr. V. K. Ruß, Wien; Prof. Dr. H. Sachs, Frankfurt a. M.; Prof. Dr. A. Schattenfroh, Wien; Dr. Cl. Schilling, Berlin; Dr. J. Schwoner, Wien; Prof. Dr. Sobernheim, Berlin; Dr. R. v. Stenitzer, Wien; Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Uhlenhuth, Berlin; Dr. R. Volk, Wien; Geh. Medizinalrat Dr. A. Wassermann, Berlin; Dr. Weidanz, Berlin; Dr. A. Wladimiroff, Petersburg

herausgegeben von

PROF. DR. R. KRAUS in Wien UND DR. C. LEVADITI in Paris.

Zweiter Band.

ANTIKÖRPER.

Mit 2 Kurven, 1 Tafel und 131 teils farbigen Abbildungen im Text.

SEMPER BONIS ARTIBUS

VERLAG VON GUSTAV FISCHER IN JENA
1909

Inhaltsverzeichnis.

Allgemeiner Teil.

I.

Technik der Antikörpererzeugung an großen Tieren.

(Diphtherieserumgewinnung vom Pferde.)

Von

Prof. Dr. R. Kretz

in Prag.

I. Injektionstechnik.

Zur Einverleibung der Substanzen, welche im Tierkörper Antikörper erzeugen sollen, bedient man sich im allgemeinen einer Lösung oder zumindest einer Suspension derselben. Die Einverleibung wird entweder subkutan oder intraperitoneal oder intravenös gemacht.

Zur subkutanen Injektion verwendet man mit Hohlnadeln armierte Spritzen, bei denen entweder ein Stempel oder wie bei der Kochschen Spritze ein kleiner, ziemlich kräftiger Gummiballon die Flüssigkeit direkt oder durch Luftkompression austreibt; Stempelspritzen haben den Vorteil, daß man kleine Flüssigkeitsmengen, insbesondere auch solche mit suspendierten Geweben und ähnlichem unter hohem Druck durch die enge Nadel oder in festes Gewebe eintreiben kann; sie sind aber weniger leicht dicht zu halten und für oft wiederholte Sterilisierung empfindlicher als die Kochschen Spritzen, die darum für Injektionsmengen zwischen $^1/_2$ und 10—20 ccm zumeist angewendet werden. Für die Injektion größerer Flüssigkeitsmengen etwa bis 250—300 ccm empfiehlt es sich zwischen graduierten Flüssigkeitszylinder und Hohlnadel einen starkwandigen Kautschukschlauch von 30—50 cm Länge mit einem Hahnstück vor die Nadel einzuschalten; der Gummiballon wird am zweckmäßigsten durch ein kräftiges Gebläse (Klysopompe) ersetzt (Fig. 1). Diese Injektionszylinder bieten vor allem den Vorteil, daß man bei unerwarteten, selbst ziemlich heftigen Bewegungen, welche z. B. neu verwendete Pferde nicht selten machen, in der Regel die Injektion doch, ohne Nadel- oder Glasbruch zu riskieren, vollenden kann. Die Dosierung kann ganz gut mit etwa $5\,^0/_0$iger Genauigkeit eingehalten werden und unter Zuhilfenahme von entsprechenden Verdünnungen mit einer indifferenten

Flüssigkeit (1:10, 1:20, 1:100) kann man bei einer Skalenstufung von 10 ccm im 300 ccm Zylinder leicht und sicher auch Bruchteile eines Kubikzentimetess der originalen Flüssigkeit dosieren. Die Injektionsnadeln werden am zweckmäßigsten aus nahtlosen Stahlrohren angefertigt und in das Ansatzstück eingeschraubt und an der Verschraubungsstelle verlötet; die Nadeln sollen für die kleinen Spritzen etwa 35—40, für die großen 75—100 mm lang sein; ihre Stärke mag etwa $^1/_2$ resp. $2^1/_2$ mm betragen, das Lumen $^3/_4$—$^5/_6$ des äußeren Durchmessers; die schräg angeschliffene Spitze soll beiderseits fazettiert werden und dadurch dreischneidig wirken; das Ansatzstück soll kräftig gehalten sein, um ein sicheres Anfassen beim Einstechen zu gestatten. Zweckmäßig ist es, sämtliche Coni der Nadeln, Hahnstücke und bei den Kochschen Spritzen auch die Ballonansätze mittels Lehren ganz gleich herstellen zu lassen; man kann dann je nach Bedarf die einzelnen Stücke ohne weiteres wechseln. Zur Sterilisierung der Nadeln genügt bei keimfreiem oder wenigstens sporenfreiem Materiale mechanische Reinigung sofort nach Gebrauch, sorgfältiges Trocknen in der Wärme und Einziehen eines entsprechend langen und starken Messingdrahtes, der über die Spitze hinausragt; die so armierte Nadel wird mit der Spitze nach unten in einer sterilen und mit Watte verschlossenen Eprouvette auf-

Fig. 1.

Fig. 2.

gehoben; vor dem neuerlichen Gebrauch kommt sie auf eine halbe Stunde in 5 %iges Karbolwasser. Nach Injektion von sporenhaltigem Materiale werden Stahlnadeln am besten in gespanntem Dampfe desinfiziert. Die teuren Plattin-Iridiumnadeln können einfach durch Ausglühen sterilisiert werden. Für Glas- und Kautschukteile der Spritzen gilt bezüglich der Desinfektion das später über die Aderlaßinstrumente zu sagende.

Wenn es auch nicht im Rahmen der Aufgabe dieses technischen Handbuches liegt, eine ausführliche Geschichte der Injektionsapparate zu geben, so glaube ich doch mit Rücksicht auf die zerstreute und manche Wiederholung zeigende Literatur des Gegenstandes folgendes anführen zu sollen: Die Pravazsche Spitze leidet in der ursprünglichen Form an dem

Nachteile der mangelhaften Sterilisierbarkeit der Lederdichtung des Kolbens; nach Hofmeister (Centralbl. für Chir. 1896, pag. 641) läßt sich dieser Übelstand durch Formalinbehandlung der Lederdichtung vor dem Auskochen vermeiden und Löffler hat speziell für bakteriologische Zwecke vorgeschlagen, die Lederdichtung durch eine übergezogene Gummiplatte zu ersetzen (Centralbl. für Bakt. 1897, Bd. XXII, pag. 597); weitaus die beste Modifikation der Stempelspritze für kleine Flüssigkeitsmengen stellt aber die „Schweizer"-Spritze dar, bei der ein Zylinder-Glasstempel die Flüssigkeit aspiriert und austreibt (Hägeler-Passavant, Centralbl. für Chir. 1896, pag. 1254); mit einer Spur steriler Vaseline am Kolben läßt sich auch eine gewisse Härte des Ganges leicht vermeiden; als Verbesserung wurde von Glücksmann (Centralbl. für Bakt. 1897, Bd. XXIII, pag. 18) eine Hohlrinne am oberen Ende des Zylindermantels angegeben, die ein Austreten von infektiösem Materiale aus dem Kapillarspalt, zwischen Zylinderstempel und Zylinderwand bei Gebrauch in ungefettetem Zustande, verhindert.

Noch größer ist die Zahl der Verbesserungen an der Kochschen Ballonspritze; zweckmäßig ist es, am gebräuchlichen Modelle das Hahnstück desselben etwas zu verlängern (Fig. 2), um den Hahn besser drehen zu können; ferner wurde die Hahnverbindung zwischen Ballon und Injektionszylinder noch mannigfach modifiziert (Ilkewitsch, Centralbl. für Bakt. 1895, Bd. XVIII, pag. 55, Centanni, Centralbl. für Bakt. 1897, Bd. XXIII, pag. 217), oder das Gebläse durch eine die Luft komprimierende Stempelspritze ersetzt (Curini cit. n. Baumgartens Jahresber. 1887, Bd. III, Tavel, Centralbl. für Bakt. 1889, Bd. V, pag. 550, Smith, ibid. 1891, Bd. X, pag. 178, Jughilleri, ibid. 1902, Bd. XXXI, Orig., pag. 171), ohne daß eine dieser Modifikationen in den allgemeinen Gebrauch übergegangen wäre. Nur die von Strohschein (Görbersdorf. Mitt., Wiesbaden 1889) angegebene Modifikation mit Ersatz des Ballons durch einen dem Kautschukringe aufgedichteten, übergestülpten, kleinen Glaszylinder hat wegen ihrer Handlichkeit und leichten Sterilisierbarkeit allgemeine Anerkennung gefunden.

Als Improvisationsbehelf ist natürlich noch eine mannigfache Variierung je nach Mitteln, Geschick des Experimentators möglich — die einfachste Pumpe ist ein glyzerinbefeuchteter dicker Glasstab in einem dickwandigen Kautschukschlauche — ; besonders allgemein verwendbar ist das „Spritzflaschen"-System von Gabritschewsky (Centralbl. für Bakt. 1896, Bd. XIX, pag. 551), das erlaubt, mit einem entsprechend durchbohrten Kork jeden Kolben, jede Epruovette oder Medizinflasche in ein Injektionsgefäß zu verwandeln.

Die subkutane Injektion wird so ausgeführt, daß man mit der linken Hand eine Hautfalte an der zu injizierenden Stelle aufhebt und die leere oder bei Verwendung kleiner Spritzen armierte Nadel durch die Haut durchstößt und im lockeren Subcutisgewebe ein Stück vorschiebt, dann wird unter Vermeidung jedes überflüssig hohen Druckes die gewünschte Flüssigkeitsmenge langsam eingetrieben und unter Kompression des Stichkanales in der Cutis die Nadel ausgezogen. Zur Vermeidung einer bakteriellen Verunreinigung des Stichkanales wird die Injektionsstelle ausrasiert oder wenigstens mit der Schere vom Haarwuchs befreit und mit sublimatgetränkter Watte desinfiziert. Die zur Injektion verwendete Hautstelle soll vor allem eine leicht abhebbare Haut besitzen; denn in die lockere Subcutis lassen sich selbst größere Flüssigkeitsmengen injizieren, ohne dem Tiere besonders Schmerzen zu bereiten

oder es durch ein starkes Spannungsgefühl zu fortwährenden Scheuer- und Kratzversuchen zu veranlassen, die viel leichter als der Stich einer scharfen Nadel bakterielle Infektion veranlassen. Bei Pferden dient zumeist die seitliche Halsfläche rechts und links zur Injektion, ebenso bei Rindern, Schafen und Ziegen; bei Kaninchen und Meerschweinchen die lockere, obere Bauchhaut, bei Vögeln die Haut über dem Brustmuskel. Bei Pferden kann man durch Ausbinden an den Standsäulen die Tiere am Scheuern des Halses an der Boxwand resp. Krippe verhindern.

Zu den häufigeren Fehlern bei der Injektion gehören zu wenig tiefes Einstechen; in diesem Falle resultiert durch die starke Gewebsspannung, welche die Flüssigkeitsinjektion bewirkt, leicht Nekrose der Hautstelle; eine solche Nekrose hinterläßt nach Abstoßung des Schorfes ein meist recht langsam heilendes Geschwür. Auch durch zu tiefes Einstoßen der Nadel kann der Injektionseffekt ungünstig beeinflußt werden: ähnlich der Cutis bildet das derbe Fasziengewebe einen großen Widerstand gegen die einzuspritzende Flüssigkeit und kommt es bei forciertem Drucke zur lokalen Gewebsnekrose, die entweder mit einem langdauernden, tiefem Infiltrate endet oder zu tiefliegender Abszedierung führt. Bei einiger Übung lassen sich diese Fehler ebenso wie eine unbeabsichtigte Venenverletzung ganz sicher vermeiden. Ein geringes Hautemphysem, das namentlich bei Verwendung der Kochschen Spritzen durch einen kleinen Ruck des Tieres gegen die injizierende Hand leicht entsteht, ist ohne Belang. Bei oft zu wiederholenden Injektionen an einem Tiere, wie sie die Antikörpererzeugung erfordert, bildet die sekundäre Verdichtung der Subcutis in manchen Fällen ein schweres und selbst durch große Injektionspausen nicht ganz zu beseitigendes Hindernis gegen die Weiterverwendung des Tieres; man muß also von Haus aus darauf bedacht sein, die Haut der Injektionsstellen möglichst zu schonen.

Die Injektion lebender Kulturen erfordert beim Ausziehen der Nadel, besondere Vorsicht um eine Verunreinigung der umgebenden Haut und des Bodens zu vermeiden; man verfährt am besten so, daß man die Spritze nur mit der auf einmal zu injizierenden Flüssigkeitsmenge füllt und die ganze Menge plus eine Spur Luft einspritzt; zieht man jetzt die Nadel unter Kompression des Stichkanales mit sublimatgetränkter Watte heraus, so läßt sich jeder Rücktritt von infektiösem Material vermeiden und die Lücke durch einen Tropfen Kollodium verschießen. Die von Tavel (Centralbl. für Bakt., 1889, Bd. V, pag. 550), angegebene Umstechungsnaht des Stichkanales scheint mir nicht besonders empfehlenswert; die verknüpften Nahtenden können durch Scheuerbewegungen des Pferdes leicht sekundär infiziert werden und bei Verwendung nur mittelstarker Kanüle läßt sich die Naht überflüssig machen, denn die elastische Cutis verschließt einen ca. 2—3 cm langen schiefen Stichkanal so vollständig, daß nicht ein Tropfen Flüssigkeit zurücktritt, sofern man unter geringem Druck in die Sucbutis injiziert und darauf achtet, den Injektionsstrom von den Ausziehen der Nadel ganz zu unterbrechen. Einer besonderen Kontrolle bedürfen diese Tiere hinsichtlich sich bildender Abszesse, der eventuell möglichen Bakterienausscheidung im Harne und bei der Entlassung aus dem Institute.

Die intravenöse Injektion erfordert als Voroperation die im nächsten Abschnitte näher zu besprechende Venenpunktion. Man injiziert nach Lösung der stauenden Kompression zentripetal; von der Injektion auf diesem Wege sind ausgeschlossen alle Suspensionen gröberer Partikel (wegen des Eintrittes von Embolien in den Lungenkapillaren) und er-

fordert das Einlaufenlassen jeder Flüssigkeit, die man bei Verwendung größerer Menge auf Bluttemperatur vor der Injektion erwärmt*), besondere Vorsicht, um nicht durch brüske Änderung der chemischen Zusammensetzung und der Temperatur des dem rechten Vorhof zuströmenden Blutes schwere Kollapse oder gar plötzlichen Herzstillstand und den Tod herbeizuführen. Bei der nötigen Vorsicht lassen sich übrigens erstaunliche Mengen einverleiben, z. B. injizierte ich einmal dem Pferde „Indus“ 900 ccm. Diphtheritoxin im Verlaufe von ca. 8 Minuten in die Jugularvene ohne üblen Zufall.

II. Aderlaßtechnik.

Die Blutentnahme wird je nach dem Zweck der Verwendung des Serums in verschiedener Form ausgeführt; handelt es sich nur um die Entnahme einer kleinen Menge Blut, welche zur Orientierung über den Antikörpergehalt sogleich im Tierexperimente verarbeitet wird, so genügt das Auffangen einiger Kubikzentimeter Blut aus einem Schnitt in die rasierte Haut an einer Stelle, wo eine kleine Hautvene durch den Schnitt oder Stich mitgetroffen wird; beim Pferd wählt man für diesen Zweck meist die Vena facialis antica, die etwa 6—8 cm unter dem unteren Augenrand mit einem Spitzbisturie in geschwelltem Zustande angestochen wird; das ausströmende Blut wird in einer angedrückten Eprouvette aufgefangen und dieselbe nach Einrinnen des gewünschten Quantums durch Absengen mit der Flamme am Rande sterilisiert und mit einem sterilen Pfropfen geschlossen; nach Aufhören der Kompression steht die Blutung meist von selbst oder ist durch kurzes Andrücken eines kleinen Wattebausches leicht zum Stehen bringen; bei der kräftigen Bakterizidie frischen Blutes resp. Serums sind derart einfach entnommene Proben ohne weiteres für den genannten Zweck tadellos verwendbar.

Für die Zwecke der Serumgewinnung in größerem Maße können natürlich nur die blutreicheren größeren Versuchstiere, vor allem das Pferd eventuell noch Esel, Rind, Ziege und Schaf in Frage kommen. Die Blutentnahme bei diesen Tieren erfolgt, von seltenen Ausnahmen abgesehen, durch Punktion der Jugularvene. Ich will für die folgenden Beschreibungen mich zunächst nur auf den weitaus häufigsten Fall beim Pferde beziehen.

Die Auswahl der Pferde für Zwecke der Serumdarstellung im Großen hat zunächst auf ihre vollständige Gesundheit mit Rücksicht auf Infektionen, die eventuell auf den Menschen übertragbar sind, zu erfolgen; nach den Erfahrungen über Antikörperproduktion, die später mitgeteilt werden, ist es zweckmäßig, keine jungen Tiere zu nehmen, sondern mindestens solche, die schon im 4. bis 5. Lebensjahre stehen, doch eignen sich ebensogut noch ältere, selbst 10—12 jährige Tiere; die dauernde, gute Fütterung im Vereine mit geringer Anstrengung läßt derartig alte Tiere immer noch acht bis zehn Jahre verwendungsfähig erscheinen, eine Zeit, die aus anderen Gründen ohnehin als weitaus genügend erscheint. Huf- und Fußgelenksaffektionen, die das Allgemeinbefinden der Tiere nicht alterieren (Rehhufe, Bärentatzigkeit, Spath, Ringbeine, alte Distor-

---

*) Neuerdings hat BROMSTEIN (Centralbl. für Bakt., I. Abt. Orig., Bd. XL, pag. 583) ein Injektionsgefäß mit einem wärmezuführenden Zylindermantel angegeben. Da größere Flüssigkeitsmengen ohnehin nicht sehr schnell sich nennenswert abkühlen, halte ich die Konstruktion für überflüssig.

sionen usw.) bilden kein Hindernis für die gedachten Zwecke, ja viele dieser Prozesse heilen unter dem Einfluß der Schonung der Gehwerkzeuge überraschend vollkommen aus. Der Injektionen wegen empfiehlt es sich sehr, nur Pferde mit feiner, leicht verschieblicher Haut also solche besserer Rassen zu nehmen.

Für die Auswahl ist natürlich die Untersuchung durch einen klinisch besonders tüchtigen Tierarzt unentbehrlich, wie auch seine ständige Kontrolle für den Betrieb dauernd benötigt wird. Neue Pferde werden bis zur Einreihung in den allgemeinen Stand auf sechs bis acht Wochen kontumaziert und empfiehlt es sich, um diese für einzelne Pferde bei der unbedingt nötigen Exaktheit der Durchführung teure Maßregel nicht übermäßig im Budget fühlbar zu machen, die Tiere gleich in größerer Anzahl (6—24 je nach der Größe des Bedarfes und dem Belagraum der isolierbaren Stallungen) auf einmal zu nehmen. Eine spezielle Kontrolle auf latenten Rotz oder die seltene Pferdetuberkulose durch Mallein bzw. Tuberkulininjektion macht die folgende Probeimmunisierung, die ja wohl allgemein in der Kontumazzeit schon vorgenommen wird, insoferne überflüssig, als alle Tiere, die unter dem Einflusse einer beliebigen chronischen Infektion stehen, eine ganz bedeutende Überempfindlichkeit gegen die eingreifenden Prozeduren der Toxininjektionen zeigen und bei ihnen auch die Schutzwirkung des Antitoxines diese Reaktion nicht vollständig verdeckt. Zur Erhaltung der Tiere bedarf es einer verhältnismäßig guten Fütterung (pro die 6—7 kg Hafer und 4 kg gutes Heu, sowie regelmäßig dreimalige Tränkung), reinlicher Stallungen, sorgfältiger Putzung und nicht zuletzt einer entsprechenden Bewegung im Freien (am besten leichter Trab unter dem Sattel oder als Handpferd), die wöchentlich mindestens fünfmal im Ausmaße von ungefähr einer Stunde dem Pferde für das dauernde Wohlbefinden fast unentbehrlich ist.

Das Pferd wird zur Vornahme des Aderlasses am besten in eine Operationsbox geführt; diese Box (Fig. 3), im wesentlichen zwei feste Wände von 115—120 cm Höhe, welche 2—3 m lang und 80 cm voneinander entfernt im Boden festgemacht sind, soll das Pferd hauptsächlich am seitlichen Ausweichen vor dem Operateur hindern; wenn die eine Seitenwand an der vorderen Standsäule drehbar ist, so kann eine kurze Wand hinten auch ein zu starkes Zurücktreten des Pferdes wirksam hemmen. Für Aderlässe an neuen oder wenig dressierbaren, ungebärdigen Tieren ist es gut, neben den vorderen Standsäulen, die in der Operationsbox die Wand nur um ca. 15 cm überragen sollen, jederseits zwei starke Eisenringe im Boden festgemacht zu haben; man kann dann das Pferd mit einer Art Kummet und Kette (Fig. 4) am Aufbäumen sehr wirksam verhindern, ohne im Operationsfeld behindert oder in Gefahr zu sein, daß das Pferd sich in der Box nach hinten überschlägt. Zumeist sind aber alle diese Maßregeln gar nicht notwendig und lassen sich die allermeisten Pferde schon bei den vorausgehenden Injektionen soweit dressieren, daß sie den Schmerz des Schnittes und Stiches ertragen ohne wesentlich störende Abwehrbewegungen zu machen. Bei einzelnen nervösen Tieren ist aber dieses Dressurresultat kein ganz verläßliches und nach einigen ruhig vorübergegangenen Aderlässen zeigt sich das Tier wieder sehr ungebärdig; in sehr seltenen Fällen sind Pferde so ungelehrig und direkt bösartig, daß man, wenn man das Tier nicht ausrangieren kann, am besten tut jedesmal von Haus aus alle Vorsichtsmaßregeln anzuwenden. Bei Pferden, die nur aus Ängstlichkeit unruhig sind, hat sich mir eine vorausgehende, anästhesierende Kokaininjektion recht gut bewährt; nicht zu

unterschätzen ist ferner eine im allgemeinen ruhige Behandlung der Pferde, sowohl im Stalle wie bei den operativen Eingriffen, sie macht die „Bremse“ wie den Kappzaun des öfteren sehr zum Vorteil für Tier und Operateur überflüssig. Bei Rindern fixiert man den Hals am besten durch Festbinden mit den Hörnern an einer Standsäule, bei Schafen und Ziegen durch einfaches Haltenlassen von einem Wärter.

Ist das Pferd nun in die Box gebracht und evt. mit dem Vorderzeug am Aufsteigen gehindert, so hebt der Pferdewärter den Kopf des Tieres soweit, daß Schädel und Halswirbelsäule ungefäh reinen rechten Winkel bilden; zugleich wird der Pferdekopf vom Operateur ganz leicht abgewendet, um die Jugularis stärker vortreten zu lassen. Die stramme Füllung des Gefäßes wird nun durch Kompression der Vene im unteren Teile bewirkt; das kann durch manuellen Druck geschehen und ist die drückende Hand sicher das schonendste Mittel für das Tier, aber wegen der bald eintretenden Ermüdung des Komprimierenden durch die Druckschwankungen im Gefäß für das gleichmäßige kräftige Ausströmen des Blutes nicht besonders vorteilhaft; es wird darum die manuelle Kompression wohl allgemein durch eine Umschnürungskompression ersetzt. Entweder legt man eine kräftige Rebschnur ungefähr handbreit über dem unteren Halsende herum und leitet die Schnur durch den an einem Ende angebrachten Ring auf der dem Operateur abgewendeten Seite unter kräftigem Anziehen zurück und fixiert die Spannung in dieser Stellung durch Festhalten oder Knoten der Schnur; hat das Pferd den richtigen Grad der Kopfwendung, so wird die Jugularis an der dem Operateur zugewendeten konvexen Seite des Halses stärker gestaut, während im

Fig. 3.

Fig. 4.

Gefäß der anderen Seite eine hinreichende Blutabfuhr noch möglich ist. Der häufigst begangene Fehler bei dieser Kompressionsart ist zu starkes Anziehen der Schnur bei nahezu gerader Stellung des Pferdehalses; der fühlbare Druck auf die Trachea und die komplete Stauung im Gehirn machen das Tier ängstlich und können zu plötzlichen Abwehr- und Fluchtversuchen Anlaß geben. Im Wiener serotherapeutischen Institut ist deshalb seit langem die Verwendung einer durch einen schmalen, festen Riemen angedrückten Pelotte üblich; bei guter Halsstellung ist mit dieser einfachen Kompressionsvorrichtung, die an derselben Stelle des Halses und in derselben Weise wie die Schnur angelegt wird, ein ausreichender Druck auf die Vene zu erzielen, ohne daß die Trachea oder die zweite Jugularis überflüssig in Mitleidenschaft gezogen werden (Fig. 5). Bei gut ausgeführter Kompression tritt die Vene an der Operationsseite als fingerdicker, praller Strang deutlich hervor, während die der anderen Seite nur dem Tastgefühl erkennbar geschwellt ist.

Fig. 5.

Der Aderlaß aus der gestauten Vene wird durch Punktion des Gefäßes gemacht; dieses wird entweder direkt durch die Haut oder mit vorausgeschicktem Hautschnitt angestochen; im ersteren Falle ist das Punktionsinstrument eine 3—4 mm dicke, ca. 8 cm lange im Drittelkreis gebogene Hohlnadel; das eine Ende ist schreibfederartig zugespitzt, scharf geschliffen, das andere abgerundet und an der Grenze zwischen mittlerem und hinterem Ende eine kleine Metallplatte nach Art des Schildes bei der Trachealkanüle aufgelötet. Das Instrument wird durch die ausrasierte Haut in die obere Hälfte des unteren Drittels der Jugularis kräftig eingestossen; durch die gebogene Form und geeignete Größe der Hohlnadel wird erreicht, daß die fingerdick geschwellte Vene nur an der äußeren Seite perforiert werden kann und die Öffnung an der Spitze ins Gefäßlumen zu liegen kommt; daß im Strahle hervorquellende Blut wird in sterilisierten Glaszylindern aufgefangen und nach Bedecken derselben gerinnen gelassen.

Fig. 6a.

Die zweite Art der Venenpunktion mit einem geraden sog. NOCARD-schen Troikart und durch einen Hautschnitt wird in folgender Weise ausgeführt: an der Grenze zwischen mittlerem und oberem Drittel der geschwellten Jugularis wird ein etwa 5 cm langer und breiter Streifen der Haut ausrasiert und desinfiziert, der aber mit seiner Mittellinie nicht wie bei der direkten Venenpunktion über der Mitte des Gefäßes liegt, sondern um $1^1/_2$—2 cm nach vorn gegen den unteren Rand der Trachea verschoben. Der folgende Hautschnitt wird mit einem kurzen myrtenblattförmigen, sehr scharfen Messer unter dem Verziehen der ausrasierten Hautstelle gegen die Wirbelsäule so angelegt, daß durch die Mitte des rasierten Fleckes auf die Mitte der geschwellten Vene eine zentimeterlange Durchtrennung der Gewebe bis zur Gefäßscheide entsteht. Der Troikart, 12 cm lang, 4 mm dick, mit dreikantiger kurzer scharfer Spitze wird durch den über der Gefäßmitte liegenden Hautschnitt mit einem kurzen Ruck durch die äußere Venenwand gestoßen und unter Wendung des Instrumentes parallel zum Gefäß und leichtem Zurückziehen des Stachels bis zum Ansatzstück eingeschoben. Nach kompletem Ausziehen des Stachels strömt das Blut in vollem Strahle aus und wird durch einen angesteckten Gummischlauch (Fig. 6a) in die Auffangzylinder geleitet.

Ein Mißlingen des Aderlasses kann zunächst durch zu geringe Stauung des Blutes in der Vene veranlaßt sein; die Gefäßwand ist dann selbst für ein tadellos scharfes Instrument zu nachgiebig und der Troikart gleitet im lockeren perivaskulären Gewebe neben dem Gefäß in die Tiefe; Abhülfe bietet stärkeres Anziehen des Kompressionsriemens, eventuell richtigere Lagerung der verschobenen Pelotte; durch eine unerwartete Bewegung des Pferdes kann auch ein geschickter Operateur die Venenwand durchstechen, ohne im Lumen des Gefäßes zu bleiben. Es entsteht rasch ein perivaskuläres Hämatom, das weitere Aderlaßversuche momentan sehr erschwert; in diesem Falle ist es am besten, die Stauung sofort aufzuheben und den Aderlaß am nächsten Tage an der anderen Halsseite zu machen. Endlich kann bei richtig ausgeführtem Aderlaß an einem gesunden Pferde die ausfließende Blutmenge unverhältnismäßig klein sein; manchmal hilft in einem solchen Falle ein geringes Nachlassen der strangulierenden Schnur, ein andermal Auslösen von Kaubewegungen des Pferdes durch Verschieben der Trense im Maul oder durch Füttern mit Näschereien, wie Zucker oder Rübenschnitzel. Die Verabreichung von mit Wein getränktem Brot hat beim Aderlaß an einem Pferd mit schlechtem Puls nur wenig Effekt.

Die Blutstillung nach Abnahme der gewünschten Blutmenge ist sehr einfach, der komprimierende Riemen wird gelöst und der Troikart aus der Vene entfernt; die in ihre normale Lage zurücktretende Haut bewirkt ein Bedecken der Gefäßwunde und der beim stehenden Pferde normalerweise negative Druck in der Jugularis macht jede blutstillende Kompression der Wunde überflüssig; das Pferd wird während 1—2 Stunden im Stande zwischen den Säulen ausgebunden und die inzwischen eintretende Verklebung der Gefäße und Hautverletzung genügt immer zum dauernden tadellosen Verschluß der Wunde; auch bei der direkt perkutanen Punktion der Vene genügt die differente Lage der Haut und Gefäßwunde zum Verschluß, höchstens verheftet man die Hautlücke durch eine Nadel. Nähen der Venenwunde ist zu vermeiden, da die Narben im Gefäß bei späteren Punktionen recht unangenehm sein können. Ungenähte Venenstichwunden geben dagegen sehr kleine feste Narben, wie die in Fig. 6b abgebildete Halsvene des Pferdes „Ritus“ mit 24 Stichen zeigt.

Die Menge des bei einem Aderlasse zu entnehmenden Blutes kann ohne wesentliche Schädigung des Pferdes bei einem Tiere von 450—550 Kilo Gewicht monatlich ungefähr 6 Kilo, ja auch 8—10 Kilo betragen: allerdings bekommen die Tiere bei Entnahme dieser großen Menge schon nach einem Dutzend Aderlässe Zeichen sekundärer Anämie, während bei der Entnahme der geringen Menge die Tiere bis zu 50, ja einzelne 70 und noch mehr Aderlässe aushalten. Die Entscheidung, auf welche Art das Pferd am besten ausgenützt wird, hängt ab von der Dauer der notwendigen Vorbehandlung zur Antikörperbildung, von der Variation des Serumwertes im Verlaufe der Weiterbehandlung und von den Beziehungen der erzielbaren Einnahmen für Antisera zu den Auslagen für die Pferdeerhaltung.

Fig. 6b.

Soll der Aderlaß bis zur vollkommenen Verblutung führen, so kann man ihn entweder am geworfenen Pferde ausführen oder das Pferd mit angelegten Schellen und angeschnallter Aufzuggurtung zuerst wie gewöhnlich im Stehen zur Ader lassen und sobald das Tier durch den Blutverlust ohnmächtig wird, es in den Gurten unter Anziehen dse Wurfseiles niederlassen; dabei empfiehlt es sich, den für diesen Zweck sterilen Troikart in der frei präparierten Vene durch eine Ligatur zu fixieren. Der letzte Blutrest muß dann aus der Carotis genommen werden. Die gesammte Menge des so zu gewinnenden Blutes beträgt kaum mehr als das 2—$2^1/_2$ fache des durch den forcierten einfachen Aderlaß zu erzielenden und ist es für die Gesamtmenge des zu gewinnenden Blutes vorteilhaft, wenn möglich dem Verblutungsaderlasse 1—2 Tage früher eine stärkere Blutentziehung vorauszusenden.

Das aus der Vene ausströmende Blut wird zumeist in sterilen Glaszylindern von verhältnismäßig großer Höhe und einem Inhalte von $^3/_4$ bis 2 Litern aufgefangen; man füllt die Gläser nur bis auf Handbreite vom oberen Rande, verschließt sie mit steriler Watte oder mit sterilen Deckeln. Um ein für die spätere Sterilität des Serums ungünstiges Benetzen des Zylinderrandes mit Blut zu vermeiden, läßt man besser das aus dem Troikart ausströmende Blut statt es in freiem Strahl in den Auffangzylinder sich ergießen zu lassen durch einen Kautschukschlauch und ein Glasrohr, der bis in die Nähe des Zylinderbodens reicht, einfließen. Recht bewährt hat sich für diesen Zweck eine von Dr. O. Jelinek ausprobierte Zusammenstellung: die Zylinder sind 38 cm hoch und haben einen lichten Durchmesser von 7 cm (ca. 1300 ccm Inhalt) mit 1 cm breiten abgeschliffenem Rande; die freie Öffnung wird dreifach geschlossen, zu unterst durch ein Stück Kalmuk (filzartiger Stoff) dann mit einem übergreifenden Blechdeckel und schließlich mit einem darübergebundenen derben Filtrierpapier; alle drei Bedeckungen sind exzentrisch so durchbohrt, daß nahe der Zylinderwand ein ca. 40 cm langes, 5 mm weites, oben rechtwinkelig abgebogenes Glasrohr, an der Durchschnitt-

stelle mit Papier umwickelt eingeschoben werden kann; das freie Ende dieses Rohres wird gleichfalls in Papier eingeschlagen und das Ganze sterilisiert (Fig. 7a). Beim Aderlaß wird in das Mundstück des Troikarts ein kleiner Konus eingesetzt, der in einem 5 mm weiten, ca. 150—200 cm langen sterilen Kautschukschlauch steckt; das freie Ende wird über das in den Zylinder führende Glasrohrende gestülpt und so das Blut aus der Vene in den Auffangzylinder sicher steril eingefüllt; nach hinreichender Füllung des Zylinders wird der Schlauch abgezogen und an einen neuen angesteckt; das Glasrohr wird aus dem gefüllten Zylinder ausgezogen und durch Drehung der drei Deckel die exzentrische Durchbohrung so verschoben, daß wieder ein kompleter, steriler Verschluß resultiert. (Fig. 7b). Ist das Personal auf diese Technik eingeschult, so stört die Wandgerinnung des Blutes in der verhältnismäßig langen Leitung bei Entnahme der gewöhnlichen Blutmengen gar nicht; bei Verblutungsaderlässen oder wenn beim Zylinderwechsel der Schlauch länger abgeklemmt wurde, empfiehlt es sich nach dem 8.—10. Zylinder den Schlauch einmal zu wechseln und auch aus dem Troikartlumen mit einem feinen Draht das Wandkoagulum herauszuziehen.

Fig. 7a. Fig. 7b.

III. Spezielle Sterilisierungstechnik.

Es ist selbstverständlich, daß die Keimfreiheit aller für Injektion, Aderlaß und Serumgewinnung verwendeten Utensilien im wesentlichen nach den allgemein bekannten Normen bakteriologischer Sterilisationstechnik ausgeführt wird, also Instrumente aus Metall in Sodalösung ausgekocht, Glasgegenstände im Trockensterilisator erhitzt und Kautschukwaren im Dampfstrom desinfiziert werden, alles natürlich nach vorausgegangener, gründlicher mechanischer Reinigung. Aber schon die Menge steriler Gegenstände, welche die Verarbeitung eines Aderlasses von 10—12 Pferden braucht, läßt sich nicht mehr durch einfache Vergrößerung z. B. der Trockensterilisatoren ausgleichen, denn ein solcher Apparat nach den gewöhnlichen Grundsätzen mit einem Kubikinhalt von einem halben Kubikmeter braucht zur wirksamen Durchwärmung in vollbeschicktem Zustande unverhältnismäßig lange Zeit und viel Heizkraft, wie z. B. eingepackte Maximalthermometer ergaben, 6—7 Stunden zur Erreichung von 165° C im Inneren trotz Heizung mit zwei großen $^3/_8''$ Kronenbrennern; dabei ist natürlich auch im Apparate selbst der Ausgleich der Temperaturen durch die große Zahl und Masse der zu desinfizierenden Objekte ein sehr viel unvollkommenerer als in den gangbaren kleinen Formaten. Eine zweite nicht unbeträchtliche Schwierigkeit bietet die vielfache Übertragungsmöglichkeit sehr widerstandsfähigen Keimmateriales wie der Sporen aus der Gruppe der Heu- und Mesentericusbazillen, welche die Pferde auch bei musterhafter Reinlichkeit im ganzen Betriebe via

Operationsraum zu den Utensilien bringen. Nach einigen Vorversuchen schien die Sterilisierung in gesättigtem, gespannten Dampf mit nachfolgendem Trocknen im Vakuum die beste Methode und hat sich in der Tat ein derartiger Apparat im Wiener serotherapeutischen Institut bewährt.

Der Dampfsterilisator, den die untenstehende Skizze illustriert (Fig. 8), besteht aus einem zylindrischen, horizontal gelagerten Kessel aus 5 mm starkem Eisenblech von 1 m Länge und 0,6 m Durchmesser und ist für einen Überdruck von 6 Atmosphären konstruiert. Einen zweiten der-

Fig 8.

artigen Kessel habe ich vertikal stellen lassen; für die Raumausnutzung hat diese Änderung einige Vorteile. An der einen Seite ist eine durch 16 Schraubenspindeln luftdicht anzudrückende, um eine vertikale Achse aufklappbare resp. drehbare Tür angebracht. In den Innenraum ist ein etwas kleinerer verzinkter Eisenblechzylinder eingeführt, der in seiner unteren Hälfte sowie in der hinteren Wand von zahlreichen kleinen Löchern perforiert ist, in welchen Zylinder auf kleinen Schubfächern die zu sterilisierenden Gegenstände eingeschoben werden. Ein aus perforiertem Blech hergestellter abhebbarer Deckel schließt den inneren Zylinder. Der

Kessel des Dampfsterilisators ist durch eine 5 cm dicke Kieselguhrschicht isoliert, um einerseits Dampf zu sparen, andererseits die lästige Wärmeausstrahlung einer so großen heißen Metallmasse zu vermindern. In den äußeren Kessel mündet an der oberen Seite des Bodens das durch ein Präzisionsventil verschlossene Dampfzuflußrohr *(a)*, ihm zunächst die Kondensleitung *(d)*, die, an die Kaltwasserleitung angeschlossen, als ein 9 m langes, $1^1/_2$ cm weites Kupferrohr in dem Hohlraum zwischen äußerer und innerer Kesselwand verläuft und an der Unterseite den äußeren Kessel wieder durchbohrend in den Kanal abgeleitet wird. Die dritte Durchbohrung des äußeren Kessels trägt einen durch ein Ventil absperrbaren Trichter *(c)*, in dem auf ein Drahtnetz Watte aufgelegt werden kann, um in den Kessel nach der Kondensierung filtrierte Luft einlassen zu können. In der vierten Durchbohrung steckt eine eiserne Schutzhülle, durch welche das Thermometer zum Ablesen der Temperaturen ins Kesselinnere eingesenkt ist; über der fünften befindet sich ein auf $3^1/_2$ Atmosphären eingestelltes Sicherheitsventil, an der sechsten Durchbohrung ist ein Manometer zum Ablesen eines Druckes über wie unter dem Atmosphärendruck angebracht; an der Unterseite des Kessels befindet sich am Kesselboden zu unterst ein Probierhahn, und unmittelbar vor der Kesseltür das Ablaßrohr *(b)* für Dampf- und Kondenswasser, mit einem Präzisionsventil abschließbar.

Der Gang der Sterilisation mit Dampf gestaltet sich folgendermaßen: Nach dem Öffnen der Tür und Ausheben des perforierten Deckels werden die zu sterilisierenden Gegenstände eingebracht, wobei besonders darauf zu achten ist, daß gläserne Gegenstände weder mit der Metallwand des Kessels noch untereinander sich unmittelbar berühren. Nach dem Vorsetzen des perforierten Deckels wird die äußere Tür geschlossen und werden die Verschlußschrauben gleichmäßig kräftig angezogen. In den nun ganz mit Luft gefüllten Apparat wird nach vollständigem Aufdrehen des Dampfablaßventils *(b)* durch Aufdrehen des Dampfeinlaßventils *(a)* langsam Dampf eingelassen. Sobald durch das Lufteinsaugrohr Dampf zu entweichen beginnt, wird dasselbe geschlossen und es werden dann bei nur mäßiger Geschwindigkeit des einströmenden Dampfes die im Desinfektor befindlichen Objekte vorgewärmt. Zu gleicher Zeit wird der größte Teil der im Kessel befindlichen Luft aus demselben verdrängt. Hat die Temperatur im Kesselinnern ungefähr 100 Grad C erreicht, so wird durch ganz langsames Drosseln des Ablaßventils *(b)* der Druck und die Temperatur im Apparat gesteigert. Nach ungefähr einer Viertelstunde vom Beginn des Dampfeinlasses werden bei einer Temperatur von 120 Grad C und einem Überdruck von ca. 1 Atmosphäre der Dampfablaß und die Dampfzufuhr geschlossen. Der Apparat ist jetzt zum größten Teil mit Dampf und in den zu sterilisierenden hohlen Objekten mit einem Gemenge von Luft und Dampf erfüllt, welch letzterer durch die Steigerung des Druckes am Schluß des Vorwärmens in die zu desinfizierenden Objekte eingedrungen ist. Es wird nun durch Einleiten von kaltem Wasser in die Kühlschlange der im Kessel enthaltene Dampf an den Kupferrohren zwischen äußerer Kesselwand und perforiertem Blecheinsatz niedergeschlagen und unter starkem Sinken des Drucks der letzte Rest von Luft aus dem Innern hohler Desinfektionsobjekte herausgesaugt. Durch mehrfache Proben wurde konstatiert, daß bei vollständig beschicktem Kessel durch die beschriebene Art der Vorwärmung die Luft so vollständig verdrängt wird, daß der Apparat nach dem Kondensieren fast als luftleer angesehen werden kann. (Das Mano-

meter zeigt am Ende der Kondensation minus 65 cm Quecksilber.) Durch Schließen des Ventils *d* wird die Kondensation beendet und durch ganz langsames Aufdrehen des Ventils *a* der Apparat wieder vorsichtig mit Dampf gefüllt und, sobald nach etwa 5 Minuten im Kessel ein Überdruck von 4—6 Zehntel Atmosphären herrscht, daß Ablaßventil *b* ein wenig geöffnet; durch dasselbe wird zuerst das am Boden des Kessels angesammelte Kondenswasser abgelassen; bis das laute Zischen am Ventil anzeigt, daß Dampf ausströmt, wird dasselbe wieder etwas zugedreht und durch gegenseitige Regulierung des Dampfzu- und Abflusses der Druck im Kessel langsam auf $3^1/_2$ Atmosphären gesteigert. Wenige Minuten, nachdem das Manometer diesen Druck erreicht hat, zeigt das Thermometer die entsprechende Dampftemperatur von 154 Grad C. Diese Temperatur wird durch Festhalten der Dampfspannung während 10 Minuten eingestellt erhalten. Nach Verlauf dieser Zeit wird der Dampfzufluß vollständig abgesperrt und der Dampf allmählich entweichen gelassen, bis das Manometer auf vier Zehntel Atmosphären Überdruck zurückgegangen ist, und dann auch der Dampfabfluß vollständig geschlossen. Hierauf wird durch Einleiten von kaltem Wasser in die Kühlschlange der Dampf kondensiert und zugleich werden die Gegenstände in dem luftleeren Raum getrocknet. Nach einer halben Stunde sind selbst poröse und etwas hygroskopische Gegenstände trocken und man läßt durch Öffnen des Ventils *c* in den Apparat Luft einströmen, welche vorher eine Schicht Baumwolle passiert hat.

Sobald das Manometer auf 0 gesunken ist, können nach Öffnen des Deckels die sterilisierten Gegenstände herausgenommen werden.

Die Dauer der Sterilisation ist verschieden nach Art der zu desinfizierenden Objekte. Gegenstände, die, ohne Schaden zu leiden, einen raschen Wechsel der Temperatur und des Druckes ertragen (Metall, Wäsche usw.), können in einer halben Stunde sterilisiert werden, denn diese Zeit ist ausreichend, um rasch vorzuwärmen, einmal zu kondensieren, den Druck und die Temperatur auf die vorangegebene Höhe zu bringen und den Dampf wieder auszulassen. Wie diesbezügliche Versuche gezeigt haben, genügt diese Zeit, um einen Literkolben voll Wasser auf die Dampftemperatur zu erwärmen oder dieselbe in ein 16fach zusammengelegtes Leintuch eindringen zu machen.

Unterbleibt die zweite Kondensation, so sind nach dem Öffnen des Kessels bei einer Temperatur von etwa 115° C Wäschestücke feucht, Metall oder Glasgegenstände an der Außenseite vollkommen trocken, während in Hohlräumen sich eine geringe Menge Kondenswasser angesammelt hat.

Wasser oder wässerige Flüssigkeiten in hohe Bechergläser gefüllt, dunsten bei der zweiten Kondensation, wenn man die Temperatur auf 50° C absinken läßt, bevor nach dem Lufteinlassen der Kessel geöffnet wird, auf ca. $^4/_5$ des Volumens ab.

Handelt es sich um die Desinfektion von großen Glaszylindern, wie sie zur Blutentnahme, oder großen Glaskolben, wie sie zum Abziehen des Serums verwendet werden, so müssen Vorwärmen, Kondensieren, Erhitzen und Abkühlen langsamer geschehen, da sonst einerseits die starken Temperaturschwankungen, die der sich kondensierende Dampf den Gefäßwänden rasch mitteilt, das Glas springen machen, andererseits die schnellen Druckschwankungen die Wattepfropfen und Deckelverschlüsse herausreißen, respektive eintreiben würden. Erfahrungsgemäß bedarf man zu einer solchen Sterilisation größerer gläserner Objekte ungefähr $1^1/_2$ Stunden.

Ein Punkt erfordert bei der Verwendung hoher Spannung und Temperatur allerdings besondere Beobachtung: der Dampf wirkt dann auch in höherem Grade schädigend auf die zu desinfizierenden Objekte ein. Handelt es sich um Gegenstände, bei denen vorauszusehen ist, daß sie der Desinfektion zu unterwerfen sind, so kann man auf die schädigende Wirkung des Desinfektionsprozesses Rücksicht nehmen und widerstandsfähiges Material wählen. Andererseits gestattet jeder Dampfdesinfektor, von der Konstruktion des hier beschriebenen, mit einer Dampfquelle, die gesättigten Wasserdampf von mehreren Atmosphären Überdruck liefert, auch eine Desinfektion mit gesättigtem Dampf von 100° C; wird nämlich das Verhältnis zwischen Zufluß und Abfluß (bei Entlastung des Sicherheitsventiles) so eingestellt, daß im Desinfektionsraume ein Druck von nur wenig über einer Atmosphäre (ca. $1\,{}^1/_{10}$ Atm. = $^1/_{10}$ Atm. Überdruck) festgehalten wird, so vermehrt das Volumen des z. B. mit 6 Atmosphären Spannung eintretenden Dampfes sich um 5 Teile und seine Temperatur sinkt durch die bei der Ausdehnung geleistete äußere Arbeit auf 100° C herab. Durch die Einleitung der Kondensation kann ebenso ein Entfernen der Luft aus porösen Desinfektionsobjekten bewirkt werden, und wenn, der geringeren Druckschwankung wegen, die Wirkung einer einmaligen Kondensation keine befriedigende Luftfreiheit erzeugt, so wird die Wiederholung der Prozedur dies bewirken; besser und rascher als dieser Effekt beim strömenden Dampf von 100° C eintritt, ist er noch immer zu erzielen, und die Fälle, in denen Dampf von 100° C genügt, gestatten also die Anwendung dieses Sterilisators, auch wenn er an eine Dampfquelle mit hoher Spannung angeschlossen ist. (Österr. Sanitätswesen 1897, Nr. 9.)

Die Einführung dieser Desinfektionsmethode erfordert aber wie erwähnt gewisse Rücksichten in der Auswahl der zu sterilisierenden Objekte; so wird z. B. gewöhnliches Glas von dreiatmosphärem Dampf ziemlich intensiv angenagt und man muß darum alle Glasgegenstände aus einem Material machen lassen, das auf seine Widerstandsfähigkeit zuvor geprüft wurde; auch von Kautschuk hält nur die beste Sorte „Paragummi" die oftmalige Desinfektion (bis zu 100mal) aus. Als mit zu desinfizierende Hüllen der in Vorrat sterilisierten Objekte haben sich besonders Messingkapseln, die sich im Dampfe mit einer widerstandsfähigen, schwarzen Oxydschicht bedecken und Einhüllen in eine Sorte festen Filtrirpapieres bewährt (Pasteur-Institut: „fermeture au papier").

IV. Serumgewinnung.

Zur Serumgewinnung bleiben die beim Aderlaß mit Blut gefüllten Zylinder zwei Tage bei Temperatur zwischen 10 und 25° C ruhig stehen; nach dieser Zeit ist die Retraktion des Gerinnsel vollendet und dasselbe von einer wechselnden Menge bernsteingelben, klaren Serums überschichtet und umgeben; dasselbe wird mittels eines Glashebers, dessen einer Schenkel eine seitliche Einströmöffnung und ein rundes, geschlossenes Ende besitzt, während der andere durch einen 50 – 60 cm langen Kautschukschlauch mit kurzem, gläsernem Ausströmrohr gebildet wird, in sterile Kolben gesammelt. Das lange Glasrohr wird längs der Zylinderwand nach Abheben des Metalldeckels und Lüften des Kalmuks längs der Zylinderwand bis zur untersten Grenze der Flüssigkeit vorgeschoben und der Heber durch Ausquetschen der Luft aus dem Schlauch in Gang gesetzt und durch entsprechend tiefe Stellung der Sammelflasche im

Fließen erhalten; beim Zusammensaugen mehrerer Zylinder in ein Sammelgefäß läßt man den Fallschenkel durch Abklemmen mit der Hand nie auslaufen und kann dann der nächste Zylinder ohne neuerliches Luftausquetschen weitersaugen; Glasrohre und Schläuche werden in Papier eingeschlagen, resp. in Messingkapseln sterilisiert vorrätig gehalten. Diese von Dr. O. Jelinek eingeführte Methode des Serumabsaugens arbeitet so sicher steril, daß man die Koagula noch einmal zwei Tage stehen lassen und eine zweite etwa 5–8 % der ersten Ausbeute betragende Menge eines meist etwas mehr rötlich gefärbten, aber sonst tadellosen Serums gewinnen kann. Es hat beim Bestreben, namentlich hochwertige Sera in möglichst großer Ausbeute aus dem Blute zu gewinnen, nicht an verschiedenen Versuchen gefehlt, diese einfache Methode zu verbessern, im großen und ganzen mit recht wenig Erfolg. Einige Erfahrungen sind vielleicht einer kurzen Erwähnung wert; so ist eine auffallend venöse Beschaffenheit des Blutes für die Gerinnung und Menge des abgeschiedenen Serums ungünstig; man muß also beim Aderlaß alles vermeiden, was ein zu langsames Ausfließen des Blutes bewirken könnte: zu starke Jugulariskompression, Wandgerinnung im Troikart oder Blutschlauch. Sehr von Einfluß auf die Serumausscheidung ist auch der Gesundheitszustand des Pferdes; für therapeutische Zwecke ist ja ohnehin vollständige Gesundheit des Tieres erste Bedingung der Blutentnahme, aber Pferde die im gewöhnlichen Intervall nach der letzten Injektion ca. 10—12 Tage zum Aderlaß kommen, zeigen eine abgelaufene stärkere Reaktion auf Toxineinspritzung am allerpromptesten in einer Abnahme des ausgeschiedenen Serums an; forcierte körperliche Anstrengung der Tiere unmittelbar vor der Venenpunktion verleiht dem Serum leicht einen stärker rötlichen Farbenton, ebenso zeigt das Serum bei den später zu erwähnenden Leberblutungen neben der kennbaren ikterischen Nuance einen etwas rötlichen Stich. Temperaturen unter 10° C verlangsamen die Gerinnung merkbar und auch hier erscheint das abgeschiedene Serum leicht zu rot; dieselbe unerwünschte stärkere Färbung tritt auch bei Temperaturen über 25° leicht ein. Zentrifugieren des unabgesaugten Blutzylinders bis zu einer 50fach die Gravitation übertreffenden Zentrifugalkraft ist ohne wesentlichen Vorteil; dagegen lassen aus den zerquetschten Coagulis sich noch etwa 8—10 % Serum ausschleudern, eine Manipulation, die aber für die Sterilität des so zu gewinnenden Restes recht unvorteilhaft ist. Kalkreiche Nahrung und Salzzubuße sind auf die Blutgerinnung wie es scheint ohne maßgebenden Einfluß. Die sich ausscheidende Menge ist eine individuell und auch im Individuum zeitweise ziemlich schwankende und variiert von $^1/_5$ des Blutvolumens bis zu $^1/_3$, ja noch etwas darüber.

Das durch Absaugen aus den Blutzylindern gewonnene Rohserum setzt in einigen Tagen beim Stehen in mittlerer Temperatur eine wechselnde Menge rote Blutkörperchen ab, die beim Abdrängen des Kuchens von der Zylinderwand ausgequetscht und mitgerissen wurden; man saugt das Serum zur Trennung von ihnen noch einmal in frische sterile Kolben und kann es dann nach Sterilitätsprüfung und Wertbestimmung zur Verwendung abgeben. Besser ist es jedoch, derartig vorbehandeltes Serum längere Zeit bei niederer Temperatur (6—8° C) stehen zu lassen, es bildet sich dann ein weißlicher an den Wänden haftender Belag, öfter auch eine dünne Haut, die im wesentlichen aus Cholestearin (Blutfett) besteht; nach der Abscheidung dieses Körpers bleibt das Serum, das in dicker Schicht eine grünlich-gelbe Farbe im durchfallenden Licht, eine

schmutzigbraungrüne im auffallenden besitzt, jahrelang unverändert haltbar, namentlich bleibt es auch, in kleine Fläschchen verfüllt, klar und von lichter gelber Farbe.

Derart vorbehandeltes Serum muß nur vor dem abschwächenden Einflusse des Tageslichtes und vor bakterieller Verunreinigung geschützt werden; erstere Schädlichkeit ist durch Aufheben in geschlossenen Kästen leicht zu vermeiden, schwieriger ist eine nachträgliche Verunreinigung durch Keime hintanzuhalten. Schon der kapillare Spaltraum eines strammsitzenden Stoppels genügt, wenn er Flüssigkeiten enthält, um den ubiquitären Keimen mit der Zeit ein Einwachsen zu ermöglichen; der beste Verschluß ist zweifellos Zuschmelzen das Glases, wo dies nicht angeht, Absengen des Flaschenrandes und Eindrehen eines sterilen Kautschukpfropfens, der mit Salyzilsäure oder Sublimatlösung imprägnierten Pergament niedergebunden wird.

Von konservierenden Zusätzen ist man, trotzdem sie eigentlich ganz überflüssig sind und einen Fehler der Sterilität nur maskieren, doch noch nicht allgemein abgekommen; ich erwähne nur die Karbolisierung, die am füllfertigen Serum durch Zusatz von 0,3 Prozent reiner, flüssiger Karbolsäure gemacht wird; es entsteht durch diesen Zusatz eine weißliche, wolkige Trübung, von der zweckmäßig nach zweitägigem Stehenlassen durch Filtrieren mit dichtem, sterilem Filtrierpapier ein klares im Farbenton mehr grünliches Serum erhalten werden kann.

Zu den Konservierungsverfahren muß auch das Eintrocknen des Serums im Vakuum gerechnet werden. Diese Methode wurde zuerst von Ehrlich zur Konservierung der Testsera eingeführt; sie stellt aber eine allgemein anwendbare und wirksame Art der Aufbewahrung dar, die auch in größerem Maßstabe ausführbar und erprobt ist. Die Eintrocknung erfolgt auf flachen sterilen Schalen in einem Vakuumkessel mit sechs heizbaren Platten von ungefähr $^1/_2$ qm Oberfläche, wie sie zum Entfernen von Chloroform und ähnlichen Lösungsmitteln technisch verwendet werden; das Serum wird in millimeterdünner Schicht ausgegossen und bei einer Temperatur von 30, zum Schlusse 35° C in einem Vakuum von 3 cm Hg in 12 Stunden zu einer hornartig glänzenden, spröden, gelbrötlichen Masse eingetrocknet; abgelöst und in einem sterilen Mörser zerrieben resultiert ein gelbliches Pulver, das in der dem ursprünglichen Quantum entsprechenden Menge 30° Wasser zu einer leicht opalisierenden Flüssigkeit sich löst und in dieser Form wie das gewöhnliche Serum injiziert werden kann. Der große Vorteil dieser Methode liegt neben der Haltbarkeit der Antikörper auch gegen Temperaturen bis 40° C und mehr, in der sehr kompendiösen Form und in dem leichten und sicheren Sterilhalten der Trockenpräparate; ihr einziger Nachteil in der Manipulation des Lösens vor der Injektion. Für die Verwendung der Heil- und Schutzsera in den Tropen oder sonst unter Bedingungen, die eine größere Haltbarkeit notwendig machen, wird aber gerade diese Form der Konservierung als die beste immer mehr Bedeutung gewinnen.

Eine wichtige und nicht ganz einfache Aufgabe ist auch die Prüfung eines Serums auf Sterilität; naturgemäß ist anfangs die ausgesprochene bakterizide Fähigkeit des frischen tierischen Serum von wesentlich unterstützendem Werte, sie allein ermöglicht es wohl durch Auffangen des aus der Punktionsnadel frei ausströmenden Blutes steriles Serum zu gewinnen. Aber auf diese Eigenschaft ist doch nur kurze Zeit zu rechnen, und auch die peinlichste Sorgfalt in der Sterilität aller notwendigen, nachfolgenden Operationen muß bei Präparaten für Zwecke der Therapie

exakt kontrolliert werden. Diese Kontrolle, die natürlich vor einem eventuellen desinfizierenden Zusatz gemacht werden muß, wird neben der üblichen Probe mit Bouillonverdünnung und auf Anärobier am sichersten durch Einbringen der ganzen sonst füllfertigen in große Kolben oder Flaschen gebrachten Sera in Bruttemperatur für eine Zeit von wenigstens 3 Tagen ausgeführt; dabei ist die Spur gelösten Blutfarbstoffes, die sich bei der Bereitung nicht ganz vermeiden läßt, ein schätzenswerter Indikator für die Lebenstätigkeit von Keimen. In dieselbe Zeit der Serumpräparierung fällt dann die Entnahme der zweiten Probe für Wertbestimmung des Antikörpergehaltes (die erste wird gewöhnlich mit dem in einer Eprouvette aufgefangenem Reste des Blutes im Aderlaßschlauch ausgeführt) und der Schädlichkeit im Tierversuche.

Ist die Sterilität ergänzt durch eine exakte Antikörperbestimmung, so kann das Serum zur Abgabe gelangen und wird zu dem Zwecke in gebrauchsfertige Dosen abgefüllt. Je nach der Menge der Einzeldosis, die von Zweck und Antikörpergehalt des Serums abhängt, und je nach der Zahl der zu erzeugenden Fläschchen wird verschieden verfahren; bei großen Flüssigkeitsmengen pro dosi, z. B. bei sogenanntem Scharlachserum (richtiger Antiserum gegen Streptokokken aus Scarlatinafällen), wo die Injektionsdosis 50—100 ccm beträgt, ist es am einfachsten, die sterilisierten Einzelfläschchen von dem entsprechenden Fassungsraum als Maß zu benützen und gleich direkt mit einem dem Absaugheber analogen Füllheber abzufüllen; ganz kleine Mengen, etwa 1—2 ccm und Sera, von denen nur wenig abzugeben ist, dosiert man am besten mit sterilen Vollpipetten, die durch einen kleinen ziemlich kräftigen Gummiballon angesaugt und ausgeleert werden. Handelt es sich aber um die Verfüllung großer Serummengen in zahlreiche Einzeldosen, wie bei dem antitoxischen Diphtherieserum, wo viele Liter Serum auf 1000 und mehr Fläschchen verfüllt werden sollen, so verwendet man eigene Füllapparate.

Der einfachste Füllapparat ist eine graduierte Burette nach Art der Titrierburetten der Chemiker mit Nachfüllrohr (TRESKOW); die Einschaltung des das Niveau ergänzenden Serumzuflusses erfolgt entweder durch einen Umschalt- oder durch vier Hähne oder nach KUSSIANOW (Centralbl. für Bakt. 1894, Bd. XV, pag. 458) mit T-Rohr und Quetschhähnen; SCLAVO (Centralbl. für Bakt. 1895, Bd. XVIII, pag. 657) verwendet unter Graduierung der Vorratsflasche die GABRITSCHEWSKYsche Ausblasung statt des Ausrinnenlassen des abgemessenen Quantums, eine Modifikation, die wohl kaum als Verbesserung angesehen werden kann.

Die zweite Methode der Abmessung kleiner Flüssigkeitsmengen ist meines Wissens zuerst von LODE publiziert worden (Centralbl. für Bakt. 1896, Bd. XVIII, pag. 75); sie besteht im wesentlichen aus einer Burette mit Dreiweghahn, deren Füllhöhe durch einen im eingeschobenen Ventilrohre befindlichen Hohlschwimmer aus Glas fixiert wird. KERN beschrieb dann (Centralbl. für Bakt. 1899, Bd. XXV, pag. 75) einen wesentlich gleichen Apparat mit fixem Volumen, der ganz aus Glas angefertigt und darum gut sterilisierbar ist. Dieser Apparat ist wohl der am meisten in Verwendung stehende, soweit ich die Einrichtungen der Serum-Institute kenne (Fig. 9).

Die dritte Methode, der „intermittierende Heber“ als Abfüllmaß ist von mir angegeben (Centralbl. für Bakt. 1896, Bd. XVIII, pag. 53), arbeitet mit Serum zu wenig genau, bei Quantitäten um 10 ccm (ca. 8 % obere Fehlergrenze). Eine vierte prinzipiell verschiedene Füllmaschine

hat nach meinen Angaben Ing. Ehmann konstruiert. Dieser Apparat (Fig. 10) beruht im wesentlichen darauf, daß in einem Kautschukzylinder mit zwangsläufiger Strömungsrichtung durch zwei Kegelventile die enthaltene Flüssigkeit durch Volumschwankung einer außen in einem starren Mantel befindlichen anderen Flüssigkeit in gleichem Volum angesaugt und ausgespritzt wird; das Maß der Volumschwankung der Außenflüssigkeit wird durch das verschieden einstellbare Eintauchen eines Vollzylinders bewirkt; der Apparat mißt sehr genau (maxim. Fehler kleiner als 0,6 %₀) und gestattet die Verwendung langer und dünner Ausspritzrohre zur Füllung von Gefäßen nach Art der Phiolen für Subkutaninjektion.

Fig. 9.

Fig. 10.

Die zur therapeutischen Verwendung bestimmten Einzeldosen werden in der Regel in kleinen Glasfläschchen, die eine Signatur der Erzeugungsstätte tragen abgegeben; diese Fläschchen sollen verhältnismäßig weithalsig und niedrig sein, um ein leichtes Aufsaugen der Flüssigkeit in die Injektionsspritze zu ermöglichen. Man nimmt wegen der Lichtempfindlichkeit der Antisera meist gelbgefärbtes Glas; der Verschluß wird am besten durch festeingedrehte sterile Kautschukpfropfen, event. durch im Vakuum mit Paraffin imprägnierte Korkstöpsel bewirkt, die mit Pergamentpapier niedergebunden und als Zeichen der Institutsgarantie versiegelt und mit einer Inhaltssignatur versehen sind. Diese Form der Fertigstellung ist im allgemeinen bewährt und die gangbarste. Bei den für den Medikamentenhandel bestimmten Seris wird die Verfüllung immer in möglichst großen Serien gemacht und von jeder solchen zum Verkaufe hinausgegebenen Verfüllung ein Teil der Einzeldosen in originaler Fertigstellung zurückbehalten; diese Fläschchen werden von Zeit zu Zeit im Institute auf ihren Antikörpergehalt geprüft und wenn dieser, der ursprünglich immer etwas geringer als dem wirklichen Werte entspricht, angegeben wird, durch Zurückgehen wirklich erreicht wurde, so werden die Abnehmer der Serie (Depotstationen) von dem Gesunkensein des Antikörpergehaltes verständigt und ihnen der Rest unverbrauchter Fläschchen unentgeltlich gegen neue derselben Art ausgetauscht. Auf diese Weise ist die Erzeugungsstätte sicher, nur über- oder ganz vollwertige Präparate in die Hände der Ärzte gelangen zu zu lassen, denn da die Kontrollen nur unter den Bedingungen aufgehoben werden, die den Apothekern (Schutz vor Licht, zu großer Wärme oder Kälte und Feuchtigkeit) vorgeschrieben sind, so sichert die Institutskontrolle auch den Wert der ausgegebenen Fläschchen.

Bezüglich der Haltbarkeit des Antikörpergehaltes liegen jetzt schon ziemlich ausgedehnte Erfahrungen vor, die einiges von allgemeinerem Interesse enthalten; so sind z. B. die großen Mengen Serum, die in 10 Literflaschen im Kühlraum aufgehoben werden, bis zu den 200 bis 300fachen sehr lange, durch mehrere Jahre unveränderlich im Werte, die ganz hochwertigen 500—800fachen gehen dagegen regelmäßig im Werte zurück und zwar beträchtlich; dasselbe gilt in noch höherem Maße von den in kleinen Dosen verfüllten, so daß wegen der Notwendigkeit öfterer Kontrolle und des eventuellen Austausches die Regie der kleinen Dosen 500fachen und stärkeren Sera wesentlich höher ist; dieser praktisch unangenehm fühlbaren Differenz entspricht ein theoretisch sehr merkwürdiges Verhalten insofern als bei der fraktionierten Absättigung die extrem hochwertigen Sera sich anders verhalten*) — toxolabil sind im Gegensatz zu den gewöhnlichen toxostabilen. Bewährt sich diese Unterscheidung bei ausgedehnten Nachuntersuchungen, so hätte man in der Prüfung des Serums auf seine Toxostabilität durch fraktionierte Bindung ein Mittel in der Hand, die Haltbarkeit des Serums voraus bestimmen zu können. Da nach den bisherigen Erfahrungen die ganz hochwertigen Diphtheriesera in ihrem therapeutischen Effekt den gewöhnlichen 150—300fachen nicht überlegen sind, so ist es möglich, daß ihren Vorteilen — kleine Injektionsdosis und ökonomische Pferdeausnützung — nicht jenes Gewicht beizumessen ist, das den Nachteil der beschränkteren Haltbarkeit des Antitoxins aufwiegen soll. Es ist also immerhin möglich, daß in dem Punkt eine gewisse Verbesserung der handelsmäßigen Erzeugung durch ausgedehntere Anwendung der getrockneten Seren und im Sinne einer größeren Schätzung der garantierbaren Haltbarkeit eintreten wird.

Fig. 11.

Daß die Abgabe des Heilserums in verstoppelten Fläschchen, die vor dem Gebrauch geöffnet und in die Injektionsspritze aufgesaugt oder gar eingegossen werden müssen, kein Ideal der sterilen Manipulation darstellt, ist wohl fraglos und erscheint diesbezüglich der von Gabritschewsky vorgeschlagene Universal-Injektionsapparat viel empfehlenswerter. Zum selben Zwecke hat Paltauf vorgeschlagen, die Fläschchen durch Glaszylinder mit beiderseits kapillar ausgezogenen Enden zu ersetzen (Fig. 11); das eine Ende wird vor der Füllung zugeschmolzen, dann durch das andere mit einer noch feinern Kapillare die Serumdosis eingeblasen und auch dieses Ende zugeschmolzen; ein Diamantstrich markiert an den beiden Enden die Abbruchstelle. Beim Gebrauch wird der Zylinder äußerlich in starker Sublimatlösung desinfiziert, zuerst die eine Kapillare beim Diamantriß abgebrochen und eine beigegebene sterile Injektionsnadel mit liderndem Konus aufgesetzt (Konstruktion nach Csokor), dann die zweite Kapillare eröffnet und ein Druckgummiball aufgesetzt und mit ihm der Inhalt des Zylinders ohne weiteres Manipulieren dem Patienten eingespritzt.

Getrocknetes Serum wird in sterile Gläser eingewogen; für den Gebrauch in der Praxis ist es am besten, die entsprechende Dosis in

*) Versuche, welche Kraus und Schwoner durchgeführt haben, zeigen, daß auch niederwertige Sera diese Eigenschaft aufweisen können.

eine Eprouvette einwägen, deren Dimensionen so gehalten sind, daß sie zugleich das Maß des notwendigen Wasserzusatzes zur Lösung vor der Injektion geben; als Verschluß dienen Kautschukpropfen und Versiegelung.

Am Schlusse dieses Kapitels über Serumgewinnung will ich mit einigen Worten die Vermeidung der unangenehmen Serumnebenwirkungen besprechen, insoferne, als dies durch Einwirkung auf das Serum geschehen kann. Die Eigenschaft, bald nach der Injektion am Menschen lokale, ziemlich schmerzhafte Infiltrate und eventuell später allgemeine, mit Fieber auftretende Exantheme zu erzeugen, ist bekanntlich nicht von dem theurapeutischen Antikörpergehalte abhängig; sondern ein Effekt der Einspritzung des artfremden Serums als solchem; er hängt ab von einer gewissen individuellen Disposition des injizierten Menschen, denn die Erfahrung zeigt, daß von demselben Serum, mit dem mehrere Personen injiziert werden, durchaus nicht alle mit Infiltrat oder Exanthem erkranken. Aber nach sicheren Erfahrungen ist dieser unangenehme Nebeneffekt der Seruminjektion auch von der Individualität des Pferdes abhängig; so hatte z. B. in der Zeit, als die einzelnen Serien nur Serum eines Pferdes enthielten, das Serum von „Goliath“ oft, das von „Gigerl“ nur ausnahmsweise und ganz leichte Erscheinungen hervorgerufen. Man konnte damals ganz leicht konstatieren, daß ein und dasselbe Serum in seiner Exanthem erzeugenden Wirkung auch sehr beeinflußt wurde durch die Zeit, die zwischen Aderlaß und Injektion lag, in dem Sinne, daß länger abgelagerte Sera ihre Exanthem erzeugende Komponente im Verlaufe von 6—8 Monaten ziemlich, ja selbst ganz einbüßten. Es lag nahe und hat sich in der Praxis des Wiener Institutes bewährt für therapeutische Zwecke wo möglich nur länger abgelagerte Sera zu verwenden und so die Exantheme nach einer therapeutischen oder gar nach einer prophylaktischen Antitoxininjektion fast ganz zu vermeiden. Prof. Paltauf versuchte auch mit gutem Erfolg die lange Ablagerung des Serums durch ein 24stündiges Erwärmen auf 55° C nach Spronck*) zu ersetzen**).

V. Technik der Antikörpererzeugung.

Das reichliche Auftreten von Antikörpern im Blute eines Tieres hat zur Voraussetzung, daß von der antigenen Substanz größere Dosen durch längere Zeit einverleibt wurden. Diese Voraussetzung ist anscheinend am einfachsten bei ungiftigen Antigenen zu erfüllen; weit häufiger und wichtiger sind aber die Fälle, in denen die Antigene starke Gifte für die zu behandelnden Tiere bilden und man darum gezwungen ist, den Antikörperlieferanten zunächst giftfest zu machen, damit ihm größere Mengen der Antigene injiziert werden können.

Für die Beschreibung dieser Technik will ich mich zunächst nur auf die praktisch wichtigste, die Diphtherie-Antitoxinproduktion beziehen und im Anschluß daran die Erzeugung anderer Antikörper, insofern sie allgemein wichtige oder interessante Gesichtspunkte bietet, kurz erwähnen.

Zur Gewinnung des Diphtherieantitoxins dienen Pferde als Blut- resp. Serumspender; für sie stellt ungefähr ein halber Kubikzentimeter

---

*) Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, Tome XII, pag. 196.

**) Über Anaphylaxie s. bei Madsen über Diphtherieantitoxin und bei Dörr über Anaphylaxie.

eines Giftes von 0,03 dosis letalis minima für 250 g Meerschweinchen die kleinste tödliche Dosis dar, d. h. mit anderen Worten das Pferd ist etwa hundertmal so empfindlich gegen Diphtherietoxin als das Meerschweinchen (auf dasselbe Körpergewicht bezogen). Die erste Aufgabe einer Diphtherieantitoxinerzeugung ist also das Pferd zum Ertragen der Giftzufuhr zu bringen, es giftfest, aktiv immun zu machen; sie wird etwas erschwert durch recht ausgesprochene individuelle Differenzen in der Giftempfindlichkeit der Pferde, insbesondere sind jüngere Tiere vielleicht doppelt so empfindlich als vollkommen ausgewachsene 4—5jährige; während andererseits einzelne Pferde ohne ersichtlichen Grund entschieden mehr Gift vertragen. So hat z. B. der $2^1/_2$jährige Hengst „Faust" auf 1 ccm 0,5 Toxin (= $^1/_7$ dlm für das Pferd) mit schwerer Infiltratbildung und dreitägigem Fieber geantwortet, während der 6jährige Wallach „Pascha" die doppelte Giftdosis ohne jede lokale und mit ganz geringer Fieberreaktion ertrug. Man hat diese Schwierigkeit der Dosierung der ersten Gifteinspritzung durch die Einführung abschwächender Zusätze zum Diphtherietoxin zu umgehen getrachtet und haben Jod-Jodkalilösung (Roux) und Jodtrichlorid (Behring) sich für diesen Zweck praktisch bewährt; ganz ausgeglichen wurde durch derartige Zusätze die Ungleichmäßigkeit der ersten Reaktion allerdings nicht und zeigten z. B. der 5jährige Wallach „Bachus" auf 1,5 ccm 0,1 Toxin + Jod-Jodkali aa. p. ä. keine krankhafte Reaktion, die 5jährige Stute „Grete" gleichzeitig mit derselben Menge desselben Toxins injiziert, schwere Infiltratbildung und dreitägiges Fieber. Diese ungleiche Wirkung des Giftes in verschiedenen Tieren tritt aber nicht nur bei der ersten Injektion, sondern auch bei späteren Gifteinspritzungen in oft recht störender Weise zu Tage; es gibt allerdings Pferde, die eine Woche nach der ersten Toxindosis ohne weiteres eine zweite Giftinjektion mit der doppelten Menge und nach einer weiteren Woche das vierfache der Anfangsdosis vertragen; es kann so gelingen, einem Tiere in 10—12 Wochen 700 und mehr Kubikzentimeter Toxin einzuspritzen ohne außer mäßigen Temperatursteigerungen irgend welche unangenehme Zufälle zu erleben. Solche glattimmunisierbare Tiere finden sich anscheinend etwas häufiger unter älteren Pferden und ist ein solcher Typus die von Paltauf (Jahrbuch der Wiener k. k. Krankenanstalten IV 1895) angeführte Stute „Margit", die im angegebenen Zeitraum ein 85faches Serum lieferte. Andererseits verlaufen, wie erwähnt, durchaus nicht alle Immunisierungen so glatt und seien als Beispiele dafür auf die Pferde „Fanny" und „Bacillus" derselben Publikation hingewiesen; das therapeutisch wichtigste, absolut infauste Symptom ist bei solchen Fällen ein unregelmäßiger wenig gespannter Puls. Diese Tiere gingen in relativ früheren Perioden der Giftzufuhr zugrunde. In anderer Hinsicht sehr lehrreich war die mißlungene Immunisierung der 8jährigen Stute „Irene"; dieses Pferd erhielt in zwei Monaten etwa 700 ccm Toxin von 0,06—0,1 direkten Giftwert; Antitoxingehalt zirka 50fach; das Tier erhielt nach einer dreiwöchentlichen Pause wegen Infiltratbildung die Hälfte der letzten Giftdosis, 50 ccm 0,06 Toxin und reagierte darauf mit schwerem Infiltrat, mäßigem Fieber und starker Mattigkeit, schlechtem Puls; ein Heilversuch durch Einspritzung von 20000 Antitoxineinheiten brachte keine ausgiebige Besserung und das Pferd wurde nahe dem natürlichen Tode verblutet; das Serum des Entblutungsaderlasses war 35fach; die Antikörpermenge in diesem Tiere betrug trotz des sicher nachgewiesenen Sinkens in der Reaktionszeit wenigstens 454000 AE, es wurde durch eine Toxindosis, deren neutralisierender Antitoxinbedarf

in max. auf 8—10 AE zu schätzen ist, totkrank. Das Pferd reagierte also augenfällig „paradox“ und diese von Behring beschriebene paradoxe Reaktion trat hier ein ohne überstürzte Giftzufuhr, sondern bei einem Tiere, das anscheinend vollständig erholt war von den Nachwehen früherer Toxingaben. Diese Beobachtung im Vereine mit anderen Erfahrungen über die Inkongruenz von krankhafter Reaktion nach Toxineinspritzung (aktiver Giftfestigkeit) und Antikörpergehalt ließen die Antikörpererzeugung, die ja das eigentliche Ziel der Toxinzufuhr ist, unter wesentlich anderen Gesichtspunkten erscheinen als Anfangs, wo Behring wie Roux das Antitoxin als Prinzip der Giftresistenz ansahen. Behrings Annahme der chemischen Entgiftung, Rouxs Hypothese der Zellbeeinflussung durch Schutzsubstanzen, wurden durch Ehrlich zur Theorie der histogenen, aktiven und der chemisch-antitoxischen, passiven Serumimmunität ausgebaut.

Wenn nach den Erfahrungen aller Autoren, die solche Experimente in größerer Anzahl zu machen Gelegenheit hatten, der erzielbare Antitoxingehalt des Pferdeserums wesentlich eine Funktion der einverleibten Giftmenge darstellt, so mußte dieses Postulat mehr in den Vordergrund der Erzeugungstechnik treten; in der Tat erwies sich diese Argumentation bis zu einem gewissen Grade als praktisch verwertbar. Die Injektionstechnik wurde im allgemeinen auf die Vermeidung starker Einzelreaktionen modifiziert; dies gelingt in der Tat durch die Einhaltung größerer Pausen namentlich bis zur Erreichung einer höheren aktiven Giftfestigkeit des Tieres, etwa bis zur anstandslosen Ertragung der 2—300fach letalen Dosis = 30 DTNE*) Behrings; diese aktive Immunität läßt sich nach den Erfahrungen am Wiener Institut — und wenn auch über diesen Punkt die Publikationen recht spärlich sind, scheint das ziemlich allgemein so gemacht zu werden —, in ungefähr 8 Wochen erreichen. Dann folgt eine Periode von ca. 2—3 Wochen, in der die erreichte letzte Dosis unter jedesmaliger Verkürzung der Injektionspause um einen Tag bis zu dreitägigen Intervallen wiederholt wird; 10—12 Tage nach der letzten Injektion kommt der erste Aderlaß und, wenn das Serum einen für die Praxis entsprechenden Antitoxingehalt hat, darnach wieder 6—8 Toxineinspritzungen der letzten Dosis mit 3—4tägigem Intervall; Pause, neuer Aderlaß usw. Die hier kurz skizzierte Methode liefert bei etwa der Hälfte der Pferde in 3 Monaten ein 100faches, bei einem weiteren Viertel ein 70—85faches Serum; von den Tieren, die gleich in der ersten Periode ein 100faches Serum erreichten, steigt der größere Teil im weiteren Verlauf recht ansehnlich und unter 15—20 Pferden kann man sicher rechnen im Verlauf von weiteren 3 Monaten einige mit ganz hohen Werten 500 und mehr zu haben; bei dieser Behandlung bleiben die meisten Tiere 2—4 Jahre in guter Kondition und erhalten ihren Antitoxingehalt ziemlich auf der erreichten Höhe. Selten ist ein Pferd so empfindlich, daß die geforderte Toxinmenge restringiert werden muß und bei einigermaßen sorgfältiger Kontrolle der einzelnen Injektionen und entsprechendem Vergrößern der Pausen bei merkbar stärkeren Reaktionen, gelingt es auch, solche Tiere ohne Verlust weiter zu injizieren.

Gelingt es also nach der geschilderten einfachen Methode die Pferde sicher aktiv immun zu machen, so ist, wie erwähnt, der Effekt der Antikörperproduktion in einem für therapeutische Zwecke verwertbarem Ausmaß von ca. 100fachem Serum schon weniger allgemein sicher erreichbar.

---

*) DTNE = 1 ccm eines Diphtherietoxines von 0,01 dlm (Behring).

Das Nächstliegende ist natürlich solchen Tieren mit zu geringem Antikörpergehalt mehr Toxin zu geben; subkutan ist es technisch ganz gut ausführbar, ca. dreimal so viel zu injizieren; noch größere Mengen lassen sich wie schon erwähnt intravenös infundieren und vertragen manche Pferde heroische Dosen bis zu 900 cm. 0,03 Gift = 300 DTNE = 1800-fache Dosis let.! Nach vielfältigen vergeblichen Versuchen mit teilweise kolossalen Giftmengen öfter bis zu Monatsmengen von 300 DTNE subkutan oder intravenös, den Serumwert minderwertiger Thiere zu steigern, kam ich dazu, für die Praxis der Antitoxinerzeugung im Fabrikationsbetrieb die Pferde ausschließlich dann zu verwenden, wenn eine ungefähre dreimonatliche Probeimmunisierung mit einer Gesamtgiftdosis von 250—300 DTNE einen Antitoxingehalt von wenigstens 100, in den letzten fünf Jahren von wenigstens 150 AE beim ersten Probeaderlaß ergibt.

Unter den Versuchen, die zu dieser Praxis führten sind einige von allgemeinerem Interesse; ich will sie darum kurz anführen. Die Beobachtung, daß eine krankhafte Reaktion für das Steigen des Serumwertes so ganz ohne Einfluß ist, veranlaßte mich im Winter 1895 einen Versuch zu machen, den schädlichen Anteil der Toxinwirkung durch Neutralisierung mit Antitoxin auszuschalten. Dafür, daß solche Versuche nicht ganz widersinnig seien, lag damals in der kurzen Mitteilung von Babes (Acad. méd. de Paris, Juli 1895) schon ein Anhaltspunkt vor. In der Tat lieferten die ersten Experimente mit den Pferden „Faust“ und „Einsiedlerin“ (Jahrb. der W. Krankenanst. B. V, 2. Teil) gute Resultate, d. h. die beiden Pferde, bei denen wegen häufiger Infiltrate die Toxininjektionen eingeschränkt resp. auf länger ausgesetzt werden mußten und deren Serumwert von ca. 85 auf unter 60 gesunken war, gaben nach einem Monat der Behandlung mit durch Antitoxin überneutralisiertem Toxin (Gift und Serum vor der subkutanen Injektion gemengt) ohne wesentliche Steigerung der Giftdosis über das sonst übliche Maß ein 100- resp. 120faches Serum. Über eine Schwierigkeit hat allerdings dieser Kunstgriff nicht hinweggeholfen: Pferde, die überhaupt nur auf ein 50—60faches Serum zu bringen waren, lieferten auch bei der Methode nachträglicher Injektion überkompensierter Gemenge keine wesentliche Steigerung ihres Antitoxingehaltes (z. B. „Aranka“ und „Grethe“ der zit. Publication).

Beim nächsten größeren Pferdekauf im Mai 1896 versuchte ich natürlich, frische Pferde nach demselben Prinzip zu immunisieren und in immunisiertem Zustande durch stärkere, rasch wiederholte Gifteinspritzungen hochwertige Sera zu erhalten. Ausgehend von der Idee eines sicheren Schutzes bei präventiver Antitoxingabe wurden diese Tiere einen halben Tag vor der Toxineinspritzung mit etwa 5—7000 AE injiziert; sie erhielten dann gleich als erste Toxindosis 10 ccm 0,05 Gift (= 15fache dlm für das Pferd), nach einer Woche neuerlich dieselbe Serumgabe und darnach die doppelte Toxinmenge und sofort bis zur Erreichung von ca. 30—50 DTNE pro dosi, die dann, unter Intervallverkürzung bis auf 3 Tage, wiederholt wurden. Die Methode ergab in doppelter Hinsicht befriedigende Resultate; zunächst war sie für die Pferde sehr schonend und ich habe seit ihrer allgemeinen Anwendung unter den vielen neu zu immunisierenden Tieren des Wiener serotherapeutischen Institutes nicht ein Pferd durch Diphterietoxinwirkung mehr verloren und zweitens war der durchschnittliche Anitoxinwert, der mit ihr erzielt werden konnte, entschieden besser als nach der alten Injektionsweise. Es wurde trotz des Hinaufschiebens der unteren Verwendungsgrenze von 70 auf 100 und 150 AE pro Kubikzentimeter der Prozentsatz

der verwenbaren Pferde nicht geringer (etwa $^3/_4$ bis $^5/_6$ aller probeimmunisierten) und dann wurden die hohen Werte früher erreicht als ohne die Heranziehung des Serumschutzes. Eine im Prinzip gleiche und in der Ausführung sehr ähnliche Methode haben Pawlowski und Maksutow ungefähr gleichzeitig ausgeprobt und noch 1896 publiziert (Zeitschr. für Hyg. und Inf., Bd. XXI, pag. 485). Für die Institutspraxis bin ich bei der zuerst geschilderten Methodik geblieben, da man durch das öftere Aussetzen zu Probeaderlässen nur Zeit verliert und die rasch steigenden Pferde das Zuwarten bis zum Ende des dritten Monats durch beträchtliche Wertsteigerung reichlich ausgleichen; man kann unter einer Serie von 15—20 neuen Pferden ziemlich sicher auf 2—3 mit Serumwerten um 500fach rechnen, und mehr als die Hälfte hat gewöhnlich ein etwa 180—200faches Serum. Im weiteren Verlaufe kann man dann den Serumschutz ruhig weglassen und erst, wenn ein Tier über Gebühr stark reagiert, wieder zu ihm greifen; es macht auch gar nichts bei weniger empfindlichen Pferden die präventive Antitoxingabe schon bei 20—25 DTNE wegzulassen, wenn man die Reaktionen sorgfältig kontrolliert und namentlich bei dem ersten Auftreten auch nur leichter und flüchtiger Infiltrate ihn sofort wieder anwendet. Die prompte Schonung der Haut, die durch öftere Infiltrate, auch wenn man im Abwarten ihrer Rückbildung sorgsam ist, in der Resorptionsfähigkeit dauernd geschädigt wird, ist auch ein kleiner Vorteil der kombinierten Injektionstechnik, der in der Praxis des Großbetriebes schätzenswert erscheint. Der Versuch, unter dem Antitoxinschutz die Toxindose wesentlich zu steigern, um so den Wert stärker in die Höhe zu treiben, mißlang wiederholt; man ruiniert das Pferdematerial vor der Zeit ohne wesentlichen Gewinn. Nebenbei bemerkt gehören Serumwerte viel über 5—600 AE pro cc überhaupt zu den Seltenheiten und wenn ich auch mehrfach Werte an 1000, ja bis zu 1450 sah, so gehören diese Sera wegen der Unsicherheit, mit der man sie bekommt, und der kurzen Zeit, in der sie sich beim einzelnen Pferde halten, nicht zu den in die Praxis einführbaren.

Neben den praktisch guten Resultaten, welche die Anwendung des Serumschutzes für die Technik der Antikörpererzeugung mit sich brachte, hat die „kombinierte“ Methode, wie dieses Verfahren gewöhnlich genannt wird, auch theoretisch manches Interessante zutage gefördet. Zu den merkwürdigen Erfahrungen in der Hinsicht gehört die Ungleichheit der Wirkung der neutralen und überkompensierten Toxin-Antitoxin-Gemenge in neuen und in mit Diphtheriegift vorbehandelten Tieren. Ich hatte ursprünglich nach den Beobachtungen an „Faust“, „Einsiedlerin“ und etwa 30 weiteren analog behandelten Pferden neben dem Immunisierungseffekt der Pferde „Remus“ und der gleich behandelten „R“- und „S“-Tiere die Mengungswirkung von Toxin-Antitoxin-Gemischen und der Schutzwirkung präventiver Serumgaben für identisch gehalten und auf die Unvereinbarkeit dieser Befunde mit der Ehrlichschen Theorie hingewiesen. Über Veranlassung Ehrlichs wiederholte ich die Versuche an vier Pferden der „D“-Gruppe. Die Tiere wurden mit Toxin XV und Serum 143 behandelt; „Draga“ erhielt ein abgelagertes überkompensiertes Gemisch intravenös, „Donar“ das gleiche subkutan; „Demagog“, „Dandy“ erhielten dieselben Quanta Serum präventiv und das entsprechende Toxin intravenös resp. subkutan; alle vertrugen diese Probeimmunisierung ohne weitere Reaktion bis auf mäßiges Fieber bei „Dandy“; die Prüfung des ersten Probeaderlasses ergab: „Draga“ nicht zweifach, „Donar“ dreifach, „Demagog“ ca. 20fach und „Dandy“ 500fach. (Zeitschrift für Heilk.

Bd. XXII, H. 4, 1901.) Die Versuche zeigen evident die Richtigkeit der Annahme Ehrlichs und wurden mir die Veranlassung zu einem Erklärungsversuche der „paradoxen“ Reaktion die Antitoxinproduktion durch überkompensierte Gemische im vorbehandelten Pferd, z. B. „Einsiedlerin“ ist ein sicheres Zeichen einer Toxinwirkung, ergo muß im vorbehandelten Tier die Bindung Toxin-Antitoxin gelöst werden und das wäre möglich durch größere Affinität der Rezeptoren. Eine solche Aviditätssteigerung könnte nach chemischen Analogien auch durch lokale Rezeptorenvermehrung eintreten und diese ist nichts anderes als die von Ehrlich postulierte „Seitenketten“-Vermehrung an der Zelle, welche der Antitoxinproduktion vorausgehen soll, für deren Eintritt aber kein plausibler Anhaltspunkt bis dahin vorlag. In diesem Sinne betrachtet würde die gesteigerte Giftempfindlichkeit im Verlaufe der Reaktion ein Ereignis darstellen, das notwendig vor der Abgabe der Serumkette durch das Blut dann eintreten muß, wenn auch giftempfindliche und nicht nur giftbindende unempfindliche Zellen Toxin verankern; in der Tat kann durch wiederholte Injektion ohne Steigen in der Dosis des Toxins jedes Pferd ohne weiteres dahin gebracht werden, daß Mengen, die schon reaktionslos ertragen wurden, schwere lokale wie allgemeine Reaktionen hervorrufen, d. h. mit Rücksicht auf den erreichten Grad aktiver Immunität eine Verminderung der erworbenen Giftfestigkeit und im Hinblick auf die in ihrem Blute angehäuften Antiköper eine direkt paradoxe Reaktion zeigen. Für die Praxis der Antikörpererzeugung stimmt mit diesen Anschauungen, daß der wesentlichste Punkt in der Serumproduktion eine entsprechende Toxinzufuhr mit Vermeidung krankhafter Reaktionen ist. Diese Ausführung scheint mir jedoch in zwei Punkten, die allerdings ohne theoretisches Gewicht sind, einer Ergänzung zu bedürfen: einmal hat die Menge des zugeführten Giftes nicht nur in der Injektionsquantität bei der weit wirkungsvolleren subkutanen Injektion eine obere Grenze, sondern, wie ich schon erwähnte, ist, über 30—40 DTNE pro dosi jeden dritten bis vierten Tag injiziert, beim Pferde ein antikörpererzeugender Einfluß nicht mehr zu konstatieren, und zweitens scheint eine Temperaturreaktion des Tieres in den Fällen, wo das Serum einen um 100 oder höheren Wert erreichte, nie zu fehlen; es ist auffallenderweise diese Fieberreaktion durch sehr hohe Antitoxinmengen, die präventiv gegeben werden, nicht zu verhindern, und ich halte sie deshalb für ein Phänomen der Antikörperbildung; damit würde stimmen, daß Pferde, die exzessiv tolerant gegen Diphtherietoxin sind — z. B. „Indus“ und „Orlow“ — nie ein Serum von verwertbarem Antitoxingehalt produzierten, trotzdem gerade diese zwei Tiere die allergrößten Giftdosen erhielten, die ich je gegeben habe. „Orlow“ enthielt, nebenbei bemerkt, in seinem Serum vor jeder Behandlung nahezu eine AE pro Kubikzentimeter eine Menge, die nach späteren Untersuchungen anderer Pferde als exorbitant bezeichnet werden muß; leider habe ich in dem Punkt keine weiteren verwertbaren Erfahrungen, die gestattet würden, aus dem hohen Antitoxingehalt vor der Behandlung, der auffallenden Gifttoleranz und der geringen Antitoxinproduktion wechselweise Beziehungen abzuleiten. Die Antitoxinproduktion durch überkompensierte Toxin-Antitoxin-Gemenge ist ferner eine wichtige Reaktion, die den Nachweis gebundener Gifte ermöglicht.

Bezüglich des Toxins scheint mir noch erwähnenswert, daß es für die Antikörpererzeugung gar nicht so sehr auf den direkten Giftwert als vielmehr auf das Antitoxinbindungsvermögen ankommt; so hat z. B. die elfjährige Stute „Zerline“ bei der Probeimmunisierung im Jahre 1898

in absolutem Maße dieselbe Menge Toxin erhalten wie die übrigen Pferde der „Z“-Gruppe; sie erhielt ein nach der Konstitutionsbestimmung drittelwertiges Gift mit der dlm 0,09 für 250 g Meerschweinchen; die anderen Tiere erhielten frische Gifte von durchschnittlich 0,03 dlm; nach 10 Wochen war „Zerline“ mit 500fachem Serum das antikörperreichste Pferd der Gruppe; ich habe seither vielfach mit spontan abgeschwächten Giften immunisiert und war mit dem Erfolge stets ebenso zufrieden, wie bei Verwendung frischer Gifte. Ich glaube ferner hier die Methode der Immunisierung mit Toxonen, welche Dreyer und Madsen (Zeitschr. für Hyg. u. Inf.-Krankh., Bd. XXVII, pag. 250) mitteilten, anführen zu sollen; das Verfahren, welches die Autoren auch auf Pferde anwendeten, besteht im wesentlichen in der Injektion eines nur bis zur Toxongrenze mit Serum abgesättigten Giftes; sie erhielten dadurch aktive Immunität und Antitoxin im Blute; das so entstehende Serum zeigt im Bindungsversuch dieselben Eigenschaften, wie ein mit den gewöhnlichen komplexen Giften erzeugtes, eine wichtige Stütze der Ehrlichschen Theorie über die Konstitution des Diphtheriegiftes, die für Toxoid, Toxin und Toxon eine gemeinsame haptophore Gruppe annimmt. Im übrigen bin ich der Meinung, daß das Toxon nur für den ersten Angriff im Tierkörper als solches in Betracht kommen dürfte, während im weiteren die verhältnismäßig kräftige Antikörperbildung im Pferde durch eine analoge Zerlegung des hier unterkompensierten Gemisches zustande kommen dürfte, wie dies früher für die Wirkung der überkompensierten Gemenge im vorbehandelten Pferde angenommen wurde.

Von großer praktischer Bedeutung ist die Dauer der Verwendbarkeit der antitoxinliefernden Pferde; es kommen diesbezüglich ziemlich weitgehende Differenzen vor, indem manche Tiere schon im zweiten Jahre im Werte merkbar sinken, andere drei bis vier Jahre gut bleiben, ja noch mehr Antitoxin produzieren und wieder andere — leider die Minderzahl — fünf — sechs Jahre und noch länger verwendbar bleiben. Da jedem Pferde jährlich durchschnittlich in 12 Aderlässen 70—75 l Blut entzogen werden, so kann man bei einer durchschnittlichen Verwendungsdauer von etwa dreieinhalb Jahren abzüglich drei Monate Probeimmunisierung auf etwa 180 l Blut resp. ca. 60 l Serum pro Pferd rechnen. Für diesen Durchschnitt sind die weniger erfolgreichen Injektionen der ersten Pferde mitgezählt und ist der Durchschnitt unter den kombiniert injizierten noch etwas günstiger. Ausnahmsweise kommt es vor, daß Diphtheriepferde mit 2—300fachem Serum über 70 Blutentziehungen ertragen, z. B. „Ritus“ und „Zeus“; solche Tiere liefern dann eine Gesamtblutmenge, die nahezu ihr Körpergewicht erreicht.

Die Hauptursache, warum die Diphtheriepferde in ihrer Verwendung zeitlich beschränkt sind, liegt nicht in der Menge des entzogenen Blutes; sie vertragen vielmehr eine allmonatliche Abzapfung von 6 l, ohne im Knochenmark rote Herde als Zeichen eines übernormalen Blutersatzes zu bekommen, und erst eine ungefähr doppelt so große Blutentziehung erzeugt in einem bis anderthalbem Jahre die Zeichen sekundärer Anämie, vor allem auffallende Fettleibigkeit; die Tiere gehen vielmehr typisch durch Leberblutung infolge der amyloiden Degeneration des Organes zugrunde. Die Degeneration tritt nicht immer gleich schnell auf und die ersten Anzeichen der eintretenden Folgen der chronischen Giftzufuhr sind zunächst meist auffallende, scheinbar unmotivierte Remissionen des Antitoxingehaltes. Das Tier macht sonst noch einen gesunden Eindruck, Körpergewicht unverändert, Freßlust erhalten; es ist nur leichter ermüd-

bar beim Bewegen; in diesem Stadium läßt sich durch temporäres Aussetzen der Injektionen auf 4—6 Wochen eine gewisse Besserung namentlich ein Steigen des Antitoxingehaltes nach neuerlicher vorsichtig dosierter Toxininjektion wieder erzielen. Ein halbes Jahr später tritt meist mit verminderter Freßlust ein schwacher Ikterus auf; diesmal ist der bessernde Effekt einer temporären Schonung schon fraglich und nach einer wechselnden, meist noch kürzeren Zeit als das erstemal tritt abermals Ikterus auf, diesmal verbunden mit den Zeichen akuter, schwerster Anämie. Die Sektion eines unter diesen Symptomen verendeten Tieres ergibt mächtigen Bluterguß in das Cavum peritoneale aus der meist mehrfach eingerissenen Leberkapsel; die Leber vergrößert, hellgelb, von Blutungen zertrümmert, Parenchym enorm zerreißlich (Fig. 12); oft erkennbare Residuen früherer Blutungen; daneben Milzamyloid, sonst nur mäßiger Ikterus und Zeichen einer hochgradigen Anämie. Dieser Verlauf zeigt wenig individuelle Schwankungen; so ist ein oder das andere Mal die Pause zwischen den einzelnen Stadien größer, ich sah das namentlich nach dem ersten Symptom, der Wertremission, und würde in den Fällen eine größere Pause mit nachfolgender kombinierter Giftserumeinspritzung für allgemein besser emp-

Fig. 12. Leberblutung.

fehlen als das Tier gleich ausbluten; Hat man einmal begründeten Verdacht auf den Beginn der Leberamyloidose, so ist es angezeigt, die Pferde nicht mehr unter dem Sattel, sondern nur an der Hand bewegen zu lassen, doch tritt dieses gefährliche Ereignis auch ohne Gurtenwirkung auf die Leber, bloß durch die Verschiebungen des Organs bei Bewegungen ein und scheint mir insbesondere das Aufstehen des liegenden Pferdes mehrmals eine schwere Blutung veranlaßt zu haben. Von therapeutischen Maßnahmen bei eingetretener Blutung ist im allgemeinen nicht viel zu erwarten, höchstens die Verabreichung einer ziemlichen Dosis Adrenalin, die ich einigemal auf Empfehlung von Prof. Schlesinger versuchte (5—10 ccm des Präparates von Parker, Davis & Co. auf einen halben Tränkeimer Wasser), scheint wohl wegen der starken Abschwächung des Blutstromes in der Pfortader durch die temporäre Anämisierung der Magen- und Darmschleimhaut die Verblutungsgefahr wesentlich zu mindern; im übrigen ist der Gewinn nur von kurzer Dauer und übersteht das Pferd die zweite Blutung, so geht es fast absolut sicher bei der bald folgenden dritten zugrunde. Das Serum der ikteri-

schen Pferde ist für therapeutische Zwecke wegen der stärkeren Gelbfärbung nicht verwendbar, dagegen sind die Sera vor auftretendem Ikterus tadellos; die Entblutung der Pferde bei eingetretener Leberblutung liefert unverhältnismäßig wenig, meist schlecht gerinnendes Blut, und auch im posthämorrhagischen Stadium der Anämie lohnt die Serumausbeute den Verblutungsaderlaß kaum.

Die deletäre Leberdegeneration ist wahrscheinlich nicht von dem Diphtheriegift als solchem abhängig, sondern nach den Erfahrungen, die ich seit etwa neun Jahren bei einer Reihe anderer Toxin- und Bakterieninjektionen machte, eine typische Reaktion auf die Einverleibung der verschiedensten Antigene; ihr Eintreten ist ein so allgemeines, daß man daran denken muß, ob nicht das verbreitetste Vehikel dieser Körper, die Bouillon der Kulturen unter ihren Bestandteilen (vielleicht den Peptonen?) einen die Amyloidose veranlassenden Körper enthält. Für eine solche Annahme würde mir auch der Umstand sprechen, daß mit durch Fällung gereinigtem Tetanusgift injizierte Pferde bisher schon acht Jahre frei von Amyloidosesymptomen blieben; analoge Versuche mit einem durch Ammonsulfatfällung dargestellten reinerem Diphtherietoxin werden diese Anschauung vielleicht in Jahren bestätigen können. Ganz irrelevant wird übrigens die forcierte Injektion mit körperfremden Antigenen wohl nie bleiben und selbst Substanzen, die so ungiftig erscheinen wie subkutan injiziertes Hühnereiweiß, erzeugen bei wiederholter Einspritzung im Pferde krankhafte Reaktion in Form mächtiger Infiltrate mit Fieber und ausgesprochener Störung des Allgemeinbefindens. Diese echte paradoxe Reaktion trat in dem von mir beobachteten Falle gleichzeitig mit den entsprechenden Präzipitinen auf und zwar bei Gaben, die wesentlich kleiner waren als die vom unbehandelten Pferde vertragenen: ein klassisches Beispiel der von Behring beschriebenen Steigerung der ererbten Giftempfindlichkeit oder richtiger der künstlich gesteigerten pathogenen Wirkung der Antigene; erwähnenswert scheint mir, daß auch in dem Falle die paradoxe Reaktion des „Eiger", die ich das erstemal irrtümlich einer bakteriellen Verunreinigung des injizierten Eiweiß in die Schuhe schob, entschiedene Abhängigkeit vom Injektionsintervall zeigte*).

Die Erzeugung anderer Antitoxine verläuft, so weit ich persönliche Erfahrungen besitze, ganz in der analogen Weise zur hier ausführlich geschilderten Diphtherieantitoxin-Erzeugung; ob man Tetanustoxin, Dysenterietoxin, Vibrionentoxin, Lustigs Pesttoxin injiziert, immer wieder ist der springende Punkt vorsichtiges Steigern bei größerem Injektionsintervall, bis man zu einer für das betreffende Gift auszuprobierenden Gabe kommt, die sich unter Verkürzung des Intervalles längere Zeit fort injizieren läßt**). Durch sorgfältige Beobachtung des Injektionseffektes und mit entsprechender Geduld kann man an dem kostspieligen Pferdemateriale mehr Vorsicht als an kleinen Versuchstieren aufwenden und sie lohnt sich auch durch gelungene Experimente. Dort, wo es sich nicht um den ersten Versuch der Erzeugung eines Antitoxins handelt, habe ich mich mehrfach einer kombinierten Giftserumbehandlung zur Antitoxinerzeugung bedient; da zumeist ein ganz mäßiger Antikörpergehalt als Giftschutz genügt, kann man auch dem ersten Tiere schon im weiteren Verlauf der Injektionen Serum vom eigenen Blut als Schutzmittel geben.

---

*) Diese Erscheinungen dürften jetzt mit der Anaphylaxie zu erklären sein.

**) Über Immunisierung mit Thyphusgiften, Meningokokkengiften s. v. Stenitzer. Hier wird auch die Frage der sogenannten Überempfindlichkeit gegen Gifte und der von dieser zu trennenden Anaphylaxie eingehend erörtert.

Auch über die Erzeugung agglutinierender, präzipitierender oder lytischer Sera ist vom technischen Standpunkt nichts wesentliches hinzuzufügen; ob man lebende oder abgetötete Kulturaufschwemmungen oder sonst wässerig gelöste Antigene injiziert, immer bleibt vorsichtige Steigerung der Einzelgabe und Beobachtung der Reaktion des Tieres die Hauptbedingung des Gelingens; nur bei Erzeugung polyvalenter Sera für Stämme einer Bakterienart kann man bei Neueinführung eines weiteren Stammes rasch und ohne Gefahr fortinjizieren. Bei lebendem Bakterienmaterial bildet unter Umständen ein ungewollter Infektionseffekt gewisse technische Schwierigkeiten; auch spielt die latente Persistenz lebender Krankheitserreger im Versuchstiere (Depots in der Milz und im Knochenmark) eine größere Rolle, als gewöhnlich angenommen wird; man muß darum bei Intervallverkürzung und Steigen der Gabe eine größere Reserve beobachten.

Weiterverwendung eines Tieres zur Erzeugung eines anderen Antikörpers nach Abschluß einer Injektionsbehandlung ist ganz gut möglich; von dem konkreten Falle der Erzeugung des Antikörpers der im Scharlach sich findenden Streptokokken scheint nach wiederholten Erfahrungen im Wiener Institute die vorausgehende Diphtherieinjektion entschieden von günstigem Einflusse.

Nachtrag.

Während des Druckes des vorliegenden Beitrages wurden im k. k. serotherapeutischen Institute in Wien vom mag. Pharm. H. Berger einige Versuche gemacht, die, allem Anscheine nach, Verbesserungen der angewendeten Methoden zutage fördern oder aber Ergänzungen zu denselben bilden, so daß sie verdienen nachgetragen zu werden.

Zu: IV. Serumgewinnung.

Bei der Trennung des Serums vom Blutkuchen durch einfaches Stehenlassen während 48 Stunden sind die Verluste an Serum oft dadurch sehr erhebliche, daß sich bei manchen Pferden der Blutkuchen sehr wenig zusammenzieht, weshalb große Mengen Serums innerhalb desselben eingeschlossen bleiben, die verloren gehen. Die Maximalausbeute beträgt ca. $^2/_5$ der Blutmenge, für gewöhnlich ist die Ausbeute wesentlich geringer, $^1/_5$ bis $^1/_3$ (s. pag. 16), ausnahmsweise aber nicht einmal $^1/_{20}$.

Einen einfachen Weg, der eine bessere Ausbeute versprach, mußte die Methode des Zusammenpressens des koagulierten Blutkuchens, wie es Spronck angegeben, bieten. Versuche im kleinen mit der Zentrifuge ergaben, daß sich ziemlich konstant $^2/_5$ der Blutmenge an Serum gewinnen lassen, wenn man den koagulierten Blutkuchen innerhalb drei Stunden nach der Blutentnahme zentrifugiert. Praktisch ließ sich die Methode nicht anwenden, weil es unmöglich ist, bei großen Mengen zu arbeiten.

Das Augenmerk richtete sich deshalb auf die Belastung des Blutkuchens, um aus demselben das inbibierte Serum auszupressen. Das einzige Material, das wegen seiner Widerstandsfähigkeit gegen chemische Umsetzungen, wegen seines Gewichtes und Preises hierzu in Betracht kam, war reines Zinn.

Es wurden sechseckige Zinnklötze (Fig. 13 *A*) von ca. $^1/_2$ kg an einem starken Zinndraht dadurch aufgehängt, daß ein Öse *B* durch ein Loch des Metalldeckels geschoben wurde. In der Öse steckt ein Stift *C*, der an einem starken Faden befestigt ist; über das Ganze kommt eine

mindestens dreifache Lage Filtrierpapier, um ein Durchreißen desselben zu verhindern. Die übrige Anordnung ist die gleiche, wie sie pag. 9 und 10, II. Aderlaßtechnik, beschrieben ist. Der Bindfaden *D*, der an dem Stifte *C* befestigt ist, hängt an der Seite des Glaszylinders zwischen Metalldeckel und Papierhülle herunter. Ca. 3 Stunden nach der Blutentnahme zieht man vorsichtig den Stift *C* aus der Öse *B*, so daß der Klotz *A* sich auf den Blutkuchen senkt. Dieser Zinnklotz *A* ist sechseckig, damit das Serum leicht nach aufwärts steigen und das Glasrohr, durch welches beim Aderlaß das Blut in den Zylinder einströmt, an ihm vorbei in die Tiefe gesenkt werden kann. Ebenso wird beim Absaugen des Serums das Glasrohr in das freie Segment bis knapp an den Blutkuchen, der den unteren Teil des Zylinders vollständig ausfüllt, eingesenkt. Damit der obere, sehr elastische Teil des Blutkuchens nicht über den Zinnklotz herauf schlüpfen kann, trägt dieser an der Unterseite drei Zacken, welche sich im Kuchen festhaken und ihn so fixieren.

Es ist auf diese Weise möglich, vollkommen steril zu arbeiten, und die Ausbeute an Serum beträgt mit ganz geringen Schwankungen, meistens nach oben, $^2/_5$ der Blutmenge.

Versuche, die im letzten Jahre am Institute durchgeführt worden sind, lassen hoffen, noch eine andere Schwierigkeit in der Serumgewinnung zu beseitigen, das ist die der Erzielung eines höheren Antitoxingehaltes namentlich aus Seris, die nur 100—150 fach sind, ohne den Eiweißgehalt im Endprodukte zu erhöhen. Alle Methoden, welche nur eine Eindickung herbeiführen: Frieren nach Bujwid oder Einengen im Vakuum stellen dadurch, daß dabei alle Eiweißkörper und festen Bestandteile erhalten bleiben, eigentlich nur eine Täuschung vor, wobei es sogar fraglich ist, ob ein derart eingedicktes Serum günstige Resorptionsbedingungen besitzt; ebenso leiden alle Fällungsverfahren mit Ammonsulfat an dem Nachteil, daß bei Konzentrierung durch Auflösung in geringeren Flüssigkeitsmengen, als das ursprüngliche Serum betrug, eine sehr wesentliche Anreicherung an Albuminen eintritt, die daher ihre Anwendung in der Praxis ebenso untunlich erscheinen läßt.

Ein Verfahren, das diesen Übelstand umgeht und überdies ein vollständig steriles Arbeiten ermöglicht, fanden J. Brunner und S. N. Pinkus (Biochem. Ztschr. Bd. V, 5. und 6. Hft. im Abschnitt „Darstellung der Antitoxine mit chem. u. phys. Methoden" v. E. Pribram in diesem Handbuche besprochen und kann daher hier vorausgesetzt werden), indem die Eigenschaft des Natriumsulfats, daß es bei 35° sein Lösungsoptimum hat, während es bei Abkühlung auf 5—6° bis zu 6% auskristallisiert, Anwendung findet. Diese Methode, im Versuche mit kleinen Mengen nachgeprüft, erweist sich vollkommen einwandsfrei; bei Anwendung für Konzentrierungen von etwa 20—30 l Serum, die in der Praxis einzig und allein in Betracht kommen würde, ergeben sich aber bedeutende Schwierigkeiten.

Das Verfahren wäre folgendes: 20—30 l Serum werden in Flaschen, die nicht ganz vollgefüllt sind, auf ca. 35° erwärmt und mit 20% vorgewärmtem Natrium sulfuricum dilapsum versetzt. Wenn man darauf achtet, daß keine größere Knollen in die Flaschen gelangen, so löst sich bei gründlichem Durchschütteln das Salz rasch vollkommen auf, und es bildet sich, in der ganzen Flüssigkeit verteilt, eine milchige Trübung. Diese ganze Masse ist eben noch so flüssig, daß sie durch sterilisierte Glasröhren und Kautschukschläuche auf sterilisierte Trichter mit Papierfilter übergesaugt werden kann. Man läßt so — alle diese Prozeduren werden

bei ca. 35° vorgenommen — den größten Teil der Sole abfiltrieren und bringt den dicken breiigen Filterrückstand mit den Trichtern in einen Kühlkasten (Fig. 14).

Der Kasten (Fig. 14) besteht aus einer doppelwandigen Kiste, der Raum zwischen den beiden Wänden ist mit einem isolierenden Material gefüllt; der Innenraum ist mit Zinkblech verkleidet und durch eine vertikale Blechwand die durchlocht ist, in einen größeren und einen kleineren Abschnitt geteilt. Der kleinere Raum dient zur Aufnahme des Eises, der größere enthält die Trichter mit der zu kühlenden Masse. Um eine möglichst rasche Durchkühlung zu erzielen, mußten Trichter beschafft werden, welche im Verhältnis zur Masse, die gekühlt werden sollte, eine große Angriffsfläche für die Kühlflüssigkeit boten. Das wurde durch die Verwendung möglichst hoher Trichter erreicht, die einen tunlichst kleinen Umfang des oberen Randes hatten. Eine Grenze wurde der Verschiebung dieser Verhältnisse gesetzt durch den Umstand,

Fig. 13.

Fig. 14.

daß die Filter mit der Verkleinerung des Winkels am Ausflußrohre in immer mehr Lagen übereinander geschichtet werden, wodurch die Filtration verschlechtert wird.

Es wurden Trichter von 50 cm Höhe und 30 cm oberem Durchmesser gewählt, die in den Boden des Kühlkastens durch Kautschukstopfen eingedichtet werden. Hierauf wird in den kleinen Abschnitt Wasser eingegossen und in dasselbe ein Eisblock gelegt, der von Zeit zu Zeit mit Kochsalz bestreut wird. In 10—15 Min. ist das ganze Wasser auf drei bis fünf Grad gekühlt und bleibt je nach der Größe des Eisblockes auf dieser Temperatur konstant. Die Firma Schleicher und Schüll verfertigte in bereitwilligster Weise Filter von 1 m Durchmesser, die sehr gut verwendbar sind.

Auf diese Weise läßt sich innerhalb 5—6 Tagen ein hundertfaches Serum, allerdings mit bedeutenden Verlusten, wenn man dabei vollkommen steril arbeitet, auf ein 500—600faches bringen, das zum Aufbessern anderer minderwertiger Sera verwendet werden könnte, so daß die schließliche Mischung keine nennenswerte Änderung in der Konsistenz und Viskosität aufweist.

II.

Methoden der Immunisierung bei kleinen Versuchstieren.

Von

Thorvald Madsen

in Kopenhagen.

I.

I. Injektion der Antigene (Immunisierung).

Unter den in den Laboratorien meistens gebrauchten kleineren Versuchstieren wird man in der Regel Ziegen, Hammel, Kaninchen, Meerschweinchen, Hunden*) den Vorzug geben, weil sie verhältnismäßig billig zu haben und billig zu füttern sind.

Es liegt im eigenen Interesse, wenn man sich die Pflege der immunisierten Tiere besonders angelegen sein läßt und für ihre regelmäßige Fütterung, Licht, Luft, Reinlichkeit und Bewegung Sorge trägt. Durch Versuche ist erwiesen, daß ein Tier, das hungert, alkoholvergiftet ist (ABBOTT und BERGEY[1]), P. TH. MÜLLER, FRIEDBERGER usw.) weniger Antikörper zu erzeugen vermag als ein normales.

Sehr wichtig ist es auch, daß die Temperatur in den Räumen, wo die Versuchstiere sich aufhalten, gleichmäßig und nicht zu niedrig ist. Bei vielen Toxinvergiftungen leidet die Wärmeregulation, und die Individuen werden sehr empfindlich gegen Kälte (namentlich im Herbst). Man muß vorher das Tier soweit wie möglich eine Zeitlang unter denselben Verhältnissen beobachten, unter denen es sich während der Immunisierung dann befindet, und bevor diese eingeleitet wird, muß man untersuchen, ob das Blut normal Stoffe enthält, welche hemmend auf das betreffende Antigen wirken, oder es gar aufheben. (Normaler Anti-

---

*) Zur Zucht sind am besten Meerschweinchen geeignet, da sie weniger Infektionen unterliegen als Kaninchen. Die Kaninchenzucht leidet stark unter der von BECK, KRAUS und VOLK beschriebenen Kaninchenseuche. Die gewöhnlich vorkommenden Infektionen bei Meerschweinchen sind puerperale Infektionen.

körper.*) Der Umstand, daß ein Tier unter normalen Verhältnissen Antikörper enthält, beweist durchaus nicht, daß es ein besonders guter Antikörperproduzent werden wird.

Während der Immunisierung muß man sich bemühen, die Reaktionsweise der Versuchstiere kennen zu lernen und darf nicht zu viel schematisieren.

Zur ersten Einspritzung bedient man sich einer so kleinen Menge, daß man sicher ist, daß das Tier keinen Schaden davon hat. In der Regel darf man dem Tiere keine neue Dosis Antigen verabreichen, ehe die Reaktion nicht geschwunden ist. Man beobachte zu diesem Zwecke das Allgemeinbefinden des Tieres, seine Stimmung, seinen Appetit und das Aussehen der Haare. Die Temperatur soll am besten stets 1—2mal täglich gemessen werden. Bei kleineren Tieren, z. B. bei Kaninchen, stellt man täglich das Gewicht fest. Dies muß aber mit der größten Schonung geschehen, ohne mit dem Tiere viel zu manipulieren. Soll das Wägen eine Bedeutung haben, so muß es genau zur selben Zeit des Tages, z. B. morgens vor dem Füttern und genau auf dieselbe Weise geschehen. Man darf nämlich nicht vergessen, daß das Gewicht eines z. B. 2000 g schweren Kaninchens unter normalen Umständen bis zu 200 g täglich schwanken kann. Sind mehrere Tiere zusammen, so muß man dafür sorgen, daß den immunisierten von den stärkeren kein Schaden zugefügt wird, und hat man Weibchen vor sich, so muß man die Männchen zur Verhütung der Gravidität, die störend in den Verlauf eingreifen kann, entfernen. Wurde die Einspritzung subkutan vorgenommen, so muß man seine Aufmerksamkeit auf etwaiges Ödem oder Infiltration richten. Diese Erscheinungen schwinden meistens am ehesten, wenn man dem Tiere Gelegenheit verschafft, sich viel zu bewegen. Eventuell auftretende Abszesse muß man entleeren.

In der Regel kann man weniger Gewicht auf lokale Prozesse, als auf das Allgemeinbefinden legen. Sobald die Immunisierung eine Zeitlang im Gange ist, macht man Probeaderlässe, um die Zunahme des Antikörpers genau zu bestimmen. Wünscht man, sobald der genügende Wert erreicht ist, eine größere Menge Antikörper zu bekommen, so empfiehlt es sich häufig, die letzte Injektion im Verhältnis zu den früheren recht kräftig zu machen und 6—8 Tage darnach eine größere Menge Blut abzuzapfen.

Was das Alter der Versuchstiere anlangt, so heißt es gewöhnlich, daß junge Individuen bessere Resultate ergeben. Indessen ist für diese Behauptung bis jetzt noch kein experimenteller Beweis erbracht, und es ist nicht selten, daß auch alte Tiere gute Antikörperproduzenten sind. Handelt es sich aber um ein Tier, das man längere Zeit zur Antikörperproduktion benutzen will, so ist es klar, daß man sich besser eines jungen Tieres bedient.

Art der Einverleibung des Antigens.

Die Art, wie das Antigen einverleibt wird, spielt eine große Rolle und ist bei den verschiedenen Tierarten etwas verschieden. Die gewöhnliche ist die subkutane, die intraperitoneale und die intra-

*) Hierbei muß man darauf Rücksicht nehmen, daß unter verschiedenen Bedingungen, namentlich in verschiedener Jahreszeit, der Gehalt von normalen Antikörpern (Komplement) schwankt.

venöse. Es ist derzeit unmöglich, allgemeine Regeln aufzustellen, welche Art der Einverleibung vorzuziehen ist.

In einigen Fällen ist es erwiesen, daß man viel ungünstigere Ergebnisse bei der intravenösen, als bei der subkutanen Einspritzung erzielt. (Diphtherietoxin DZIERGOWSKY.)

Ich habe seinerzeit eine Antitoxinkurve mitgeteilt, die zeigte, daß eine gewisse Menge Diphtheriegift in die Vena jugularis von einem diphtherieimmunisierten Pferd einverleibt, durchaus keine Reaktion bewirkte, während dieselbe Menge subkutan gegeben, bei demselben Pferde 14 Tage später eine typische Antitoxinkurve veranlaßte.

FORSSMANN[15]) fand, daß die Kurve nach intravenöser Einspritzung des Botulismusgiftes viel niedriger war als nach der subkutanen; gleichzeitig war ihre Form eine andere, indem die Akme viel früher eintrat, nämlich anstatt am 15. am 10. Tage.

Auch NEISSER und WECHSBERG[35]) machten die Erfahrung, daß die Ausbeute an Staphylokokkenantihämotoxin am größten bei subkutaner Injektion war, während sie nach der intravenösen unsicher war und nach der intraperitonealen Einspritzung ganz ausblieb.

Wahrscheinlich wird es sich zeigen, daß eine Änderung der Applikationsart oft eine Veränderung im Aussehen der Kurve veranlassen wird.

Ganz andere Umstände fanden PFEIFFER[36]) und seine Schüler hinsichtlich der Choleraimmunität bei Kaninchen. Von dem subkutanen Gewebe aus war die immunisatorische Wirkung viel geringer, als bei Einspritzungen in die Blutbahn. Bei intravenöser Injektion konnte noch durch Quantitäten sicher sterilisierter Cholerakulturen unter $^1/_{1000}$ mg ein ganz ausgesprochen immunisatorischer Effekt erzielt werden.

PRÖSCHER[39]) ist der Ansicht, daß die Gewinnung von Antistaphylokokkenserum auch viel besser durch intravenöse Einspritzungen gelingt, als durch die anderen Methoden.

Im Institut Pasteur hat man die Erfahrung gemacht, daß die Präparation von antitoxischem Cholera- und Pestserum am besten gelang, wenn die lebenden Mikroben in die Venen injiziert wurden, besser als nach subkutaner Einverleibung (BESREDKA).*)

Bei Vibriolysin hat TALLQUIST[48]) den eigentümlichen Umstand nachgewiesen, daß eine einzelne intravenöse Injektion eine spät auftretende Antikörperkurve mit Akme am 18. Tage (Fig. 1) und mit viel größeren Ausschlägen bewirkt, als diejenigen, welche man nach subkutaner Injektion mit derselben Menge Vibriolysin beobachtet.

Bei der intravenösen Einspritzung muß man selbstverständlich dafür Sorge tragen, daß der Injektionsstoff weder Partikel noch Luft enthält, da sonst leicht Embolien entstehen können.

Außerdem muß man sich vergegenwärtigen, daß es Stoffe gibt, die akut toxisch wirken, wenn sie in größerer Menge in die Venen gelangen, während sie subkutan einverleibt unschädlich sind. Dies gilt z. B. von den Vibriotoxinen (KRAUS) und von größeren Mengen heterologen Serums, z. B. Ziegen- oder Katzenserum auf Kaninchen. Auch müssen die anaphylaktischen Phaenomene berücksichtigt werden.**)

Die Immunisierung durch den Darmkanal wendet man ziemlich selten an, da auf diesem Wege nur einzelne Antigene aufgenommen werden. Bekanntlich hat EHRLICH[13]) nachgewiesen, daß Mäuse durch

*) Siehe v. STENITZER: Über Typhusantitoxin.
**) Siehe ds. Handbuch v. STENITZER l. c. und R. DOERR: Über Anaphylaxie.

Fütterung ricin- und abrinfest gemacht werden können. Auch hat man durch Fütterung mit den betreffenden Antigenen Typhusagglutinin und -Präzipitin erzielt, in der Regel ist aber die stomachale Immunisierung unsicher und führt meistens nicht zu hohen Antikörperwerten.

In gewissen Fällen hat man sich besonderer Methoden bedient, z. B. der pleuralen, der intracerebralen, der kutanen (Einreibung der rasierten Haut), der Eintröpfelung in den Konjunktivalsack und der Injektion in die vordere Augenkammer.

Fig. 1 (nach TALLQUIST). Aktive Immunisierung eines Kaninchens mit Vibriolysin. (Zeigt das späte Erscheinen des Antilysinmaximums nach einer am 29. VIII. vorgenommenen intravenösen Vibriolysininjektion.)

Die bei der Immunisierung anzuwendende **Technik** bietet keine besonderen Schwierigkeiten dar.

Man muß dafür Sorge tragen, daß der einzuspritzende Stoff keimfrei ist oder wenn nötig durch Chemikalien wie Toluol, Chloroform, Trikresol u. a. sterilisiert, durch Porzellankerzen filtriert.

Hat man einen großen Behälter mit einer Flüssigkeit, die zur Immunisierung benutzt werden soll, kann man, um die Gefahr der Infektion zu vermindern, jedesmal, wenn man sich der Flüssigkeit bedient, folgende Vorsichtsmaßregeln anwenden:

Man schließt den Behälter mit einem doppelt durchbohrten Kautschukkork; durch die eine Durchbohrung führt man eine kurze, mit Watte geschlossene Glasröhre so weit, daß sie nicht bis an die Oberfläche der Flüssigkeit reicht; durch die andere steckt man eine lange, heberförmige Glasröhre, deren Ende bis auf den Boden des Gefäßes und deren äußerer Teil etwas tiefer geht und in einen Gummischlauch mit Klemmhahn endigt. Durch diesen kann man, indem man eventuell durch das andere Glasrohr bläst, die gewünschte Menge Flüssigkeit abzapfen. Wenn man will, kann man sie in die Spritze, die man gebrauchen will, direkt hineinsaugen. Der Vorteil ist hierbei der, daß man den Behälter nicht zu öffnen braucht. Ist die Flüssigkeit, wie es wohl oft der Fall sein wird, mit Toluol bedeckt, so vermeidet man, daß dieser Stoff, welcher im subkutanen Gewebe außerordentlich schmerzhaft wirkt, mit eingeführt wird. Nach dem Gebrauch kann man den Gummischlauch usw. in einem Behälter mit Karbolwasser oder dgl. desinfizieren.

Arbeitet man mit Mikrobenkulturen, so hat man selbstverständlich darauf zu achten, daß sie rein sind. Es empfiehlt sich, Stoff für eine längere Periode der Immunisierung zu bereiten. Die Bouillon- oder Agarkultur wird mit einem Antiseptikum, z. B. Formol, Chloroform, welches durch Verdampfung entfernt werden können, in niedriger Temperatur aufbewahrt.

Ist der immunisierende Stoff keine Flüssigkeit, so muß man es z. B. durch Reiben in einem Mörser oder durch Quetschung in einem geeigneten Apparat zu homogenisieren suchen (z. B. Latapies broyeur[25]).

Gewebstücke kann man in eine Tasche unter der Haut legen, die man durch einen Schnitt herstellt und dann zusammennäht. Auf dieselbe Weise führt man Kollodiumsäckchen oder Schilfsäckchen subkutan oder peritoneal ein.

Zur Einspritzung nimmt man am besten eine leicht zu sterilisierende, kalibrierte gute Spritze. Bei größeren Tieren, wie Ziegen und Hammel, die zuweilen etwas unruhig sind, stecke man zuerst die Nadel durch die rasierte und mit Äther und Lysol, Karbol oder Sublimatwasser gewaschene Haut und setze dann den Konus der Spritze an die Kanüle. Bei diesen Tieren empfiehlt es sich ebenfalls, einen Schlauch von starkem Gummi (Cyclepumpenschlauch) zwischen die Kanüle und die Spritze einzuschieben, um auf diese Weise den Bewegungen des Tieres besser folgen zu können.

Bei kleineren Mengen unter $^1/_{10}$ ccm, die schwierig einzuspritzen sind, macht man in der Regel mittels einer Pipette eine passende Verdünnung in 0,9 $^0/_0$iger NaCl-Lösung.

Zur Injektion von großen Mengen gibt es besondere Apparate; z. B. benutzte man im Institut Pasteur einen graduierten Zylinder von nebenstehender Form (Fig. 2). Die Flüssigkeit wird durch *a* mittels einer kleinen Saug- und Druckpumpe, die mit *b* in Verbindung gebracht wird, gehoben und entleert.

Eine ähnlicher Apparat ist von Carini[6]) und eine neuere Modifikation von Bronstein[4]) beschrieben.

Größere Mengen muß man auf mehrere Stellen verteilen und die Partien vermeiden, an denen sich Infiltrate nach früheren Einspritzungen finden. Statt der Hals- und Schultergegend, welche bei Ziegen und Hammeln zur subkutanen Injektion am geeignetsten sind, kann man, wenn sie oft benutzt und Sitz einer Infiltration sind, verschiedene Stellen unter der Rückenhaut gebrauchen; man läuft aber oft hierbei Gefahr, größere bis unter den Bauch sich ausbreitende Infiltrationen hervorzurufen, die nicht so leicht wieder verschwinden. Die Injektion in die Partie über der Skapula führt häufig zu langwierigen Ödemen und Infiltrationen. Überhaupt soll man vermeiden, an solchen Stellen zu injizieren, von wo aus sich etwaige Ödeme in die Beine ausbreiten können, wodurch das Tier in seiner Beweglichkeit gehindert wird. Man muß mit der Kanüle vorfühlen, ob man im losen Bindegewebe ist, eventuell ein bischen zurückziehen; stößt man auf Widerstand, muß man die Kanüle vorsichtig in eine andere Schicht führen und unter Umständen eine andere Injektionsstelle wählen.

Bei kleineren Versuchstieren macht man die subkutanen Einspritzungen auf der Rücken- und Bauchhaut. Da diese sehr dünn ist, kann man leicht hindurchkommen; man muß aber aufpassen, daß die Flüssig-

keit nicht wieder herausfließt. Dies kann dadurch verhütet werden, daß man die Kanüle erst ein kleines Stück in die obere Schicht einführt und erst dann in eine tiefere Schicht steckt, in die man die Flüssigkeit hineinspritzt. Nach erfolgter Injektion ist es ratsam, die Flüssigkeit durch Massage zu verteilen.

Man muß darauf achten, daß man nicht in das Peritoneum kommt.

Bei Vögeln, wie Tauben und Hühner, kann man wegen der dünnen Haut nur nach Überwindung von größeren Schwierigkeiten größere Mengen subkutan einspritzen. Zuweilen macht man die Injektion in die großen Brustmuskel durch die von Federn nicht bedeckte Stelle, die man leicht findet, wenn man gegen die Haare bläst.

Überhaupt kommt die intramuskuläre Injektion der subkutanen sehr nahe. In der Regel ist jene für die Tiere mit größeren Unannehmlichkeiten verbunden als diese, da einem etwaigen Abzeß schwieriger beizukommen ist. Diese Applikationsart wahrscheinlich ungefähr wie die subkutane.

Fig. 2. Apparat zur Einspritzung von größeren Mengen Flüssigkeit.

Für die intravenösen Einspritzungen wählt man bei Ziegen und Hammeln die Vena jugularis, welche man an der Seite des rasierten Halses verlaufen sieht. Wenn man sie zentral komprimiert, so ist es leicht mit einem sichern Stich — von oben nach unten — eine scharfe, schräg geschliffene Kanüle in die Venenlichtung einzuführen. Man darf aber hierbei nicht zu viel Kraft anwenden, da man sonst leicht Gefahr läuft, durch die hintere Wandung der Venen hindurchzustechen. Wenn das Blut aus der Kanüle fließt, wird diese mit der Spritze angesetzt, man hört mit der Kompression der Vene auf und nimmt die Einspritzung langsam vor. Man darf nicht vergessen, daß die Injektionsflüssigkeit bis zur Körpertemperatur erwärmt werden muß und daß man sich selbstverständlich sorgfältig gegen Luftembolie zu schützen hat.

Bei Kaninchen wählt man mit Vorliebe die Randvene des Ohres. Bei Hunden kann man, wenn man die Halsader schonen will, die Vena saphena oder eine Schenkelvene benutzen.

Am sichersten geht man, wenn man das Tier aufbindet und dann den Kopf fixiert, namentlich ist dies zu empfehlen, wenn man größere Mengen einspritzen soll. Man rasiert die Haare ab, oder wäscht sie ganz einfach mit Alkohol und führt die Spritze, deren Kanüle nicht zu schräg abgeschnitten sein darf, in die Vene, welche, wenn sie nicht deutlich genug ist, noch zentral von der Injektionsstelle zusammengepreßt wird. Wenn man sich nicht ganz sicher in der Technik fühlt, so kann man zuerst die Kanüle einführen und sich davon überzeugen, daß einige Blutstropfen herausfließen, bevor man die Spritze darauf setzt. Das andere Verfahren ist aber schneller und bequemer.

Bei kleineren Versuchstieren muß man eine Kanüle in die Carotis oder in die Vena jugularis einbinden. Bei Meerschweinchen, bei denen Carotis und die Ohrvene schwer zugänglich sind, kann man direkt in ein Herzventrikel injizieren.

Dieses Verfahren beschreibt Morgenroth[33]) folgendermaßen:

Man sticht eine ziemlich dünne spitze Nadel links vom Sternum an der Stelle des stärksten Herzstoßes, die man durch Palpation bald zu finden lernt, ein, setzt dann die vorher gefüllte, sorgfältig kalibrierte Stempelspritze auf, injiziert sehr langsam, nimmt nach der Injektion die Spritze wieder ab, überzeugt sich durch das wieder ausfließende Blut, daß sich die Kanüle nicht in der Lage verschoben hat und zieht diese dann mit einem Ruck heraus. In dieser Weise können bis zu 1,5 ccm in das Blut injiziert werden.

Bei Meerschweinchen kann man die Vena jugularis mit einem Schnitt bloßlegen und eine dünne Spritzenkanüle einführen, ohne daß es notwendig ist, diese in die Vene einzubinden. Bei einiger Übung läßt sich ohne weiteres die Vena jugularis für intravenöse Injektion benutzen.

Bei Vögeln wählt man die Flügelvene, die an der Unterseite der Flügel leicht zugänglich ist oder die Halsgefäße, wo man die Kanüle einbindet.

Die intraperitoneale Injektion wendet man hauptsächlich bei Kaninchen und Meerschweinchen an und nimmt sie auf verschiedene Weise vor. Man faßt eine Falte der Bauchwand, überzeugt sich davon, daß sich darin kein Darm findet, stößt eine Kanüle ungefähr ganz hindurch und zieht sie wieder etwas zurück, damit man sicher geht, daß sie in der Peritonealhöhle freibeweglich ist.

Stevenson und Bruce[47]) benutzen als Kanüle eine gekrümmte Hohlnadel, deren Ausflußöffnung sich an der Konvexität befindet. Bei der Injektion hebt man eine Bauchfalte samt Peritoneum auf, stößt die Nadel durch, läßt die Bauchfalte los und vollzieht die Injektion, wobei die Flüssigkeit durch die in die Bauchhöhle freiragende Öffnung der Kanüle einströmt.

Friedberger[17]) empfiehlt folgende einfache Technik bei der intraperitonealen Injektion der Meerschweinchen, die jede persönliche und instrumentelle Assistenz entbehrlich macht:

Zur Fixation des Tieres wendet man eine linksseitige Brusttasche im Laboratoriumsmantel an, in die das Tier mit dem Kopfe nach unten, Bauchseite nach links vertikal bis über den Thorax hineingesteckt wird. Durch darauf folgende Horizontalstellung des Tieres unter leichter Drehung nach rechts werden Kopf und Vorderbein in der sich bildenden Taschenfalte gut fixiert. Die Hinterbeine werden in der Beckengegend zwischen Mittel- und Ringfinger der linken Hand gefaßt, und Daumen- und Zeigefinger bewerkstelligen die Fixation der mit der rechten Hand eingeführten Spritze in der Injektionsstelle.

Die Spritze unterscheidet sich von der gewöhnlichen Pravazspritze nur dadurch, daß das vordere Ende keinen Kanülenansatz hat, sondern etwa 2 cm lang dünn angezogen ist. Die Ausflußöffnung ist abgeschrägt, aber stumpf geschliffen. Mit einer derartigen Spritze gelingt es, nachdem die Bauchhaut durch einen kleinen Scherenschnitt eingeschnitten war, einerseits sehr leicht die Muskularis zu durchdringen, andererseits ist die Spitze doch so breit und stumpf, daß eine Darmverletzung ausgeschlossen scheint.

Da bei vollständiger Füllung des Spritzenrohres der Stempel aus dem ausgezogenen Endstücke die Flüssigkeit nicht mehr austreiben kann, so ist eine geringe Luftmenge in das Spritzenrohr einzuziehen, die genügt, den Inhalt auch aus diesem toten Raum auszutreiben.

Eine solche stumpfe Spritze kann man auch sehr gut bei Kaninchen anwenden.

Hält das Tier den Kopf nach unten, so senkt sich der Darm, und die Gefahr einer Verletzung derselben wird geringer.

Bei der Einverleibung per os empfiehlt es sich, das Tier dahin zu bringen, daß es das Antigen gutwillig nimmt, indem man dieses mit seinem Futter in einer Form vermischt, die ihm zusagt.

Die Rizinimmunisierungsversuche führte Ehrlich[13]) folgendermaßen aus:

Als Grundmaterial der Ernährung dienten Albert-Cakes von Thiele (von 6,75 g Normalgewicht). Dieselben wurden fein verrieben und mit dem gerade nötigen Minimum wässeriger Rizinlösung (3,2—3,5 ccm pro Cake) zu einem steifen Teig verrührt, der gerollt und in kleine Würfel geschnitten wurde, die auf Drahtgittern rasch austrockneten.

Dieses Verfahren ermöglicht eine kontinuierliche, gleichmäßige Zuführung toxischer Substanz auf lange Zeit.

Gelingt es nicht, das Tier zu veranlassen, die Substanz gutwillig zu nehmen, so muß diese mit der Sonde eingegeben werden, nachdem man erst einen kleinen hölzernen Knebel ins Maul gesteckt hat. Die Sonde, welche bei kleineren Tieren, wie Kaninchen usw., am besten ein halbweicher Katheter ist, muß vor dem Gebrauch feucht gemacht oder vaseliniert werden. Die Einführung muß vorsichtig geschehen, damit die Schleimhaut nicht verletzt werde. Die Flüssigkeit kann man entweder durch einen Trichter oder durch eine Spritze einführen.

Vögel kann man in der Regel, Kaninchen und Meerschweinchen zuweilen dazu bringen, Brotkügelchen zu schlucken, wenn man diese hinten auf die Zunge legt. Eine solche Brotpille oder ähnliches kann man mit einer Lösung oder Aufschwemmung von Antigen zusammenkneten.

Aderlaß.

Bei Ziegen, Schafen und ähnlichen Tieren nimmt man am besten Blut aus der Vena jugularis und zwar mittels einer scharfen, schräg geschliffenen Hohlnadel. Während das Tier steht, führt man die Nadel mit einem Ruck von unten nach oben in die zentral komprimierte Vene. Ein Troikart mit Poinçon ist schwerer zu hantieren, da er leicht die elastische Venenwand fängt und zusammenrollt.

Will man größere Menge Blut nehmen, so verbindet man die Kanüle durch einen Gummischlauch mit einem Glasrohr, das bis in den Behälter reicht. Dies muß schräg gehalten werden, um Schaumbildungen zu verhindern. Nach dem Aderlaß muß man die Kanüle mit einem Ruck aus der Wunde ziehen, worauf sich die Vene von selbst schließt. Man kann die Vena jugularis jahrelang täglich punktieren, ohne daß man andere Folgen als eine geringe Verdickung des Bindegewebes zu befürchten braucht, jedoch muß man so viel wie möglich dafür sorgen, daß man die Venen an der rechten und linken Seite abwechselnd benutzt.

Das Blut pflegt man in einem möglichst großen und schmalen Glasbehälter von der Form eines Reagenzglases aufzufangen. Man läßt es 24 Stunden in der Zimmertemperatur stehen, da sich das Blutgerinnsel so am schnellsten zusammenzieht, und bewahrt es dann in kaltem Raume auf.

Bleibt das Blutgerinnsel an der Wand kleben, so muß man es vorsichtig mit einem Metall- oder Glasstab ablösen. Nach 1—2 Tagen kann man das Serum mit einer Pipette abziehen oder einfach abgießen.

Von den kleineren Versuchstieren sind die Kaninchen diejenigen, welche man am bequemsten und zwar in der leicht zugänglichen Vene des Ohrrandes zur Ader lassen kann, weshalb man dieses Tier, sofern die Umstände es sonst gestatten, vorziehen sollte, wenn man von demselben Individuum oft Blut nehmen will.

Man rasiert die Haut über der Randvene, wäscht sie mit Alkohol und Äther, komprimiert die Vene zentral und punktiert mit einer kleinen, scharfen Lanzette oder Kanüle. Es ist unbedingt erforderlich, daß das Instrument scharf ist, da man sonst eine unregelmäßige Wunde bekommt und leicht Blutgerinnselbildung bewirkt. Der Schnitt ist längs der Venenwand zu führen, weil ein Querschnitt leicht zur Folge hat, daß diese sich zusammenrollt.

Anfänger werden zuweilen die Erfahrung machen, daß das Blut in dieser Weise nicht reichlich fließt. Oft zeigen sich die ersten Tropfen erst nach einigen Minuten. Bildet sich Gerinnsel in der Stichwunde, so muß es entfernt werden. Von einem kalten Ohre, dessen Gefäße kontrahiert sind, bekommt man nicht so viel Blut als von einem warmen. Zuweilen kann man das Ausfließen durch leichte Massage und Erwärmung des Ohres beschleunigen.

Ein sehr empfehlenwertes Verfahren ist die Kompression des Abdomens des Tieres. Dies kann einfach dadurch geschehen, daß man es manuell zusammendrückt, oder dadurch, daß man es mit einer festen Binde, die ganz hinten beginnt und über die Kurvatur geht, umwickelt. Auf diese Weise kann man von einem mittelgroßen Kaninchen 30—40 ccm bekommen.

Man muß darauf achten, daß das Tier nicht abgekühlt wird. Einige Untersucher, wie Wadsworth, empfehlen, daß man es auf einen mit warmem Wasser gefüllten Gummibeutel legt.

Wenn man die Antikörperschwankungen von Tag zu Tag zu beobachten wünscht, verfährt man folgendermaßen:

Man fängt 3—4 ccm Blut in einem ganz kleinen Reagenzglas von ca. 1 cm Durchmesser auf. Nach dem Aderlaß schließt man das Reagenzglas mit einem Wattepfropfen und läßt es einen Tag in der Zimmertemperatur stehen. Ist nicht genügend Serum ausgeschieden, so muß man das Blutgerinnsel mit einem sterilen Glasstäbchen, einer Platinnadel oder ähnlichem Instrument von der Wand loslösen und wieder eine zeitlang stehen lassen. Darauf muß der Blutkuchen entfernt werden, was entweder dadurch geschieht, daß das Gerinnsel mit einer krummen Platinnadel herausgeholt wird oder dadurch, daß man das Serum in ein anderes kleines Glas gießt, doch vorsichtig, damit der Bodensatz nicht mit folge. Das auf diese Weise gewonnene Serum hält sich oft sehr lange steril, vielleicht, weil sich ein großer Teil der Bakterien im Blutgerinnsel findet, und weil das Serum bakterizide Eigenschaften besitzt. Will man es aber aufbewahren, so ist es am besten, etwas Chloroform dem von Blutkörperchen befreiten Serum zuzusetzen und das Glas mit einem sterilen Gummipfropfen zu schließen, um die Verdunstung zu verhüten und es auf Eis stellen. Setzt man dem Serum auf einmal zu große Mengen Chloroform zu, so bekommt man leicht Niederschläge. Diese vermeidet man dadurch, daß man zuerst ein ganz geringes Quantum und am

nächsten Tage eine größere Menge hinzutut, so daß das Serum fast gesättigt wird. Handelt es sich, wie bei Probeaderlässen, um ganz geringe Serummengen, so tröpfelt man am besten das Chloroform durch eine ganz fein ausgezogene Pasteursche Pipette hinzu.

Auf diese Weise hält sich der Antikörper lange steril, ohne seine Eigenschaften zu verlieren. Allerdings kann man hierauf nicht mit absoluter Sicherheit rechnen, da der Antikörper in gewissen Fällen ohne nachweisbaren Grund abgeschwächt wird.

Wie gesagt, kann man der Ohrvene des Kaninchens eine größere Menge Blut entnehmen, ohne der Gesundheit des Tieres zu schaden, in der Regel aber muß man um größere Mengen zu gewinnen seine Zuflucht zur Vena jugularis oder zur Karotis nehmen. Man ätherisiert das Tier, bindet es auf, schneidet die Haare der Vorderfläche des Halses ab, event. rasiert man sie, wäscht mit Seife und Alkohol, wodurch zugleich die Haare der Umgebung feucht werden. Nach einem Schnitt in der Mittellinie präpariert man sich schnell stumpf bis an die Karotis, die in einer Ausdehnung von einigen Zentimetern bloßgelegt wird. Darauf legt man eine Ligatur oben an und bindet sie fest; unten legt man eine Arterienklemme an, und in der Mitte, wo die Kanüle hineingesteckt werden soll, legt man eine lose Schlinge um das Gefäß. Ist dies geschehen, so nimmt man dieses auf den Zeigefinger und schneidet mit einer scharfen, spitzen Schere ein dreieckiges Loch in die Gefäßwand, führt schnell eine Kanüle, am besten aus Glas, von passender Größe in zentraler Richtung ein (die Kanüle muß vorher mit warmer 1 $^0/_0$iger NaCl-Lösung befeuchtet sein). Alsdann bindet man die Schlinge zu, löst die zentrale Klemme, und das Blut strömt heraus. Es empfiehlt sich, die Kanüle durch einen Gummischlauch mit einer rechtwinklig gebogenen Glasröhre zu verbinden, die in den Auffangebehälter reicht.

Man muß darauf achten, daß das Blut nicht zu schnell herausfließt, um einen zu starken Fall des Blutdruckes zu vermeiden. Dadurch wird die Ausbeute am größten.

Wenn es gilt, eine möglichst große Menge Antikörper zu bekommen und wenn es nicht darauf ankommt, ob die Konzentration geringer wird, kann man, wenn der Blutstrom anfängt schwächer zu werden, 20—30 ccm warme 1 $^0/_0$ige NaCl-Lösung injizieren, einige Minuten warten und dann wieder Blut entleeren.

Auf ähnliche Weise entnimmt man auch anderen kleineren Tieren, wie Meerschweinchen, Katzen und Hunden, das Blut aus der Karotis. Bei Vögeln wählt man entweder die Halsgefäße oder einige der größeren Gefäße an den Flügeln.

Fig. 3. Latapies Apparat zur Gewinnung von sterilem Serum.

Ein vielbenutzter Apparat ist von Latapie[26]) angegeben (Fig. 3). Dieser besteht aus zwei Teilen; der eine Teil *A* dient zur Punktierung des Gefäßes und Teil *B* als Reservoir zur Aufnahme des Serums. *A* stellt ein gewöhnliches, an dem einen Ende offenes Reagenzglas dar; am andern Ende ist es ausgezogen in eine rechtwinklig gebogene feine zugeschmolzene Spitze.

Der Durchmesser des Reservoirs *B* ist etwas größer als *A* und das Reservoir ist auch ein Reagenzglas, das in der Mitte verengt, oben offen und unten geschlossen ist. Am Ende befindet sich eine lange, zweimal gebogene dünne und zugeschmolzene Röhre *E*. Eine mit Watte geschlossene Röhre *T* erlaubt den Eintritt der Luft in den Apparat.

Auf dem Boden von *B* sieht man eine kleine Ampulle *M*. Das offene Ende von *A* wird in *B* hineingesteckt, und *A* und *B* werden durch einen Gummischlauch *C* miteinander verbunden. Im Innern des Apparates befindet sich eine an mehreren Stellen durchlöcherte Glastube *V*, die an dem einen Ende geschlossen, am anderen Ende offen ist.

Der Apparat, in dem einige Tropfen Wasser zurückbleiben, wird bei 120° im Autoklaven sterilisiert. Das Tier wird in der Rückenlage aufgespannt; die Vorderfläche des Halses wird rasiert und desinfiziert. Man macht einen Schnitt in der Mittellinie und legt die Carotis bloß. Darauf isoliert man die Arterie in einer Ausdehnung von einigen Zentimetern, unterbindet sie peripheriewärts und bringt eine Arterienklemme etwa 2 cm von der oberen Ligatur an. Alsdann glüht man das spitzausgezogene Ende der Tube *A* ab, bricht es schräg ab mit einer sterilen Pinzette, führt die Spitze in die Arterie in zentraler Richtung, indem man das Gefäß mit der linken Hand durch eine Ligatur fixiert. Ein Assistent nimmt die Arterienklemme ab, und das Blut steigt im Apparat in die Höhe. Man hört auf, bevor *A* vollständig gefüllt ist. Die ausgezogene Spitze wird in der Flamme zugeschmolzen, zu welchem Zwecke man bei *T* leicht saugt, um zu verhindern, daß das Blut heraus fließt, solange das Zuschmelzen stattfindet. Endlich läßt man den Apparat mit *A* nach unten stehen. Das Koagulum sammelt sich um die Röhre *V* und zieht sich um diese zusammen, nachdem es sich von der Wand der Röhre *A* losgelöst hat. Sollte diese Retraktion nicht vollständig sein, so kann man durch Saugen bei *T* nachhelfen.

Ist die Koagulation eingetreten, so braucht man nur noch den Apparat umzukehren, wodurch das Serum in *B* hinabfließt. Etwaige rote Blutkörperchen sinken in die Ampulle *M*. Die dünne Röhre *E* wird abgebrannt, die Spitze abgebrochen und durch Blasen in *P* kann das Serum in einen anderen sterilen Behälter hinübergossen werden.

Durch diesen Apparat kann man bis zu 80% der Totalmenge Serum bekommen. Für die verschiedenen Tierarten muß man Behälter von entsprechender Größe haben. Auf diese Weise kann man mehrere Male Blut bekommen, selbst von Meerschweinen, Ratten und Vögeln, ohne sie zu töten.

Eine noch einfachere Methode als die oben beschriebene, ist die folgende, welche ebenfalls im Institut Pasteur geübt wird: Je nach der Größe des Tieres, welchem Blut genommen werden soll oder nach der Blutmenge werden kleinere oder größere Eprouvetten genommen und im Gebläse an dem geschlossenen Ende in Capillaren, die einen Winkel von ca. 115° mit der Eprouvette bilden, ausgezogen. Vor Gebrauch wird die Kapillare in der Flamme sterilisiert, scharf abgeschnitten und so wie eine Kanüle ins Gefäß eingeführt. Das Blut schießt in die Eprouvette ein und wie genügend Blut aufgefangen ist, wird rasch die Kapillare in der Flamme zugeschmolzen. Wenn sich Serum abgesetzt hat, kann man es von oben her, wenn man den Wattepropf entfernt, abpipettieren.

Von anderen Apparaten zur sterilen Auffangung von kleinen Mengen Blut nenne ich u. a. den von Stäubli[46]) empfohlenen. Das Blut wird aus der Vene in eine gebogene Pasteursche Pipette (Fig. 4) gesaugt, die bei >< >< zugeschmolzen wird. Nachdem das Serum ausgeschieden ist, wird die Röhre zentrifugiert, wodurch eine große Menge klaren Serum gewonnen wird. Eines ähnlichen Prinzipes bedient sich Wright[50]) zum Auffangen von Blut aus der Fingerpulpa.

Bronstein[4]) benutzte einen Zylinder, der unten einen Tubus hatte, durch den die Füllung geschah, und oben einen zweiten, durch den das ausgeschiedene Serum abgegossen wurde.

Es ist vorher[33]) erwähnt, wie man bei Meerschweinen kleinere Mengen Blut aus dem Herzen abzapfen kann.

Fig. 4. Stäublis Apparat zum sterilen Auffangen von kleineren Mengen Blut.

Um von den Ratten Blutserum in möglichst großer Menge zu erhalten, wurde von J. Kuprianow[24]) folgendes Verfahren eingeschlagen:

Die Ratten werden an den 4 Beinen auf einem Brette aufgespannt, dann wird die Haut auf der Brust nach beiden Seiten abpräpariert. Mit einer geschlossenen sterilisierten Schere macht man einen Einstich ins Herz und ohne die Schere herauszuziehen, schneidet man im Brustraum das Herz und die großen Gefäße vollkommen durch. Der Tod tritt momentan ein; die ganze Brust ist mit Blut gefüllt. Nach Herausnahme der Schere wird die Wunde mit einem sterilisierten gläsernen Schälchen bedeckt und der Kadaver in einem kühlen Raume aufbewahrt. Am folgenden Tage ist in der Brusthöhle nur das abgeschiedene Blutserum. Von einer Ratte erhielt man gewöhnlich 2—3½ ccm Blutserum. Alle anderen Methoden zur Gewinnung von Blutserum ergaben eine geringere Ausbeute.

Kleinere Mengen Blut kann man bequem aus dem Rattenschwanz entnehmen. Zur Befestigung der Ratten kann man das Rattenglas von Uhlenhuth oder den Rattenapparat von Woithe[51]) benutzen.

Ganz kleine Blutmengen gewinnt man (nach Czaplewski) dadurch, daß das aus irgend einer Gefäßverletzung kommende Blut mittels eines aufgedrückten Wattebausches aufgesaugt und dann wieder ausgelaugt wird.

In der Regel kann man ohne Bedenken von einem Tiere ein Fünftel bis ein Viertel der gesamten Blutmenge nehmen, eventuell kann das verlorene Blut durch physiologische Kochsalzlösung erstattet werden.

Die gewonnene Serumausbeute wechselt sehr. Selten erhält man mehr als 50% der abgelassenen Blutmenge, oft weniger.

Hat sich das Blutgerinnsel nicht genügend zusammengezogen, so muß es von der Wand losgelöst und unter Umständen mehrere Male durchschnitten werden. Wünscht man möglichst viel zu bekommen, so kann man versuchen, es auszupressen und die gewonnene, stark blutkörperhaltige Flüssigkeit zentrifugieren.

Von Apparaten, die Ähnlichkeit haben mit dem in einigen Instituten bei Großbetrieb angewendeten Egoutteur, mag der von Lincoln[28]) beschriebene erwähnt werden.

Das Blut wird in einer weiten Glasröhre aufgefangen. Wenn alles freiwillig ausgeschiedene Serum genommen ist, wird das Blutgerinnsel mit großer Vorsicht in einen Trichter gegossen, worin sich ein feines Drahtnetz befindet. Durch sein eigenes Gewicht wird das Serum aus dem Gerinnsel gepreßt und tröpfelt dann durch den Hals des Trichters.

Mit Sproncks Apparat bekommt man bis 60—70% Ausbeute.

Zur Blutentnahme bei Menschen hat Wright sehr einfache Apparate angegeben.

II.

Will man zum Zwecke der Antikörperproduktion Tiere immunisieren, so ist es unbedingt notwendig, die Gesetze zu kennen, denen diese Produktion im Organismus unterworfen ist. Sei es, daß man sich überzeugen will, ob ein Körper überhaupt ein Antigen ist, ob er also Antikörper hervorzubringen vermag, sei es, daß man verschiedene Antikörper mit Bezug auf ihre Produktionsfähigkeit vergleicht, oder sei es endlich, daß man von einem immunisierten Tiere Antikörper in größerer Menge zu gewinnen wünscht. Man wird um so sicherer und erfolgreicher arbeiten, je genauer man mit den von verschiedenen Bedingungen abhängigen Schwankungen der Antikörperproduktion vertraut ist. Legt man darauf nicht genügend Gewicht, so können sich Vergleiche über die Bedeutung verschiedener Eingriffe während des Immunisierungsprozesses und über das Immunisierungsvermögen verschiedener Stoffe völlig wertlos erweisen.

Über aktive Immunisierung.

Wenn der Organismus selbst den Antikörper produziert (aktive Immunisierung), so liegen die Verhältnisse viel komplizierter als bei der passiven Immunisierung.

Am einfachsten ist die Sache, wenn man einem aktiv immunisierten Tier, das seit langer Zeit keine Injektion erhalten hat, eine einzelne Antigendosis einverleibt.

Das Resultat sieht man am besten, wenn man es graphisch in einem rechtwinkeligen Koordinatensystem darstellt, wo die Abszissenachse die Zeit und die Ordinaten die Antikörperwerte angeben.

Als Beispiel möge die zuerst beobachtete Kurve dieser Art, die von Brieger und Ehrlich[3]) an der antikörperhaltigen Milch einer tetanusimmunisierten Ziege gefunden wurde, wiedergegeben werden. (Fig. 5.)

Nachdem sich der Wirkungswert der Milch wochenlang konstant gehalten hatte, wurde eine Tetanusgifteinspritzung vorgenommen und darnach die typischen wellenförmigen Antikörperschwankungen beobachtet. Diese könnte man in 4 Phasen einteilen:

1. Phase. Negativ. Sinken der Antikörperkonzentration die ersten 2—3 Tage nach der Injektion.
2. Phase. Ansteigen bis zum Maximum, worauf
3. Phase, die zweite negative mit einem zweiten Abfall, die in die
4. Phase — eine Periode des Konstantbleibens des Antikörpers — übergeht.

Später sind ähnliche Kurven für eine sehr große Menge anderer Antikörper gefunden: Diphtherieantitoxin bei Pferden (SALOMONSEN und MADSEN[42]), DEAN[8]), Antilab-Ziegen (MORGENROTH[34]), Ochsenbluthämolysin-Kaninchen (BULLOCH[5]), Botulismusantitoxin-Ziegen (FORSSMANN und LUNDSTRÖM[14], [15]), Eiweißpräzipitin-Kaninchen (v. DUNGERN[12]), Typhus-Choleraschutzstoffe-Kaninchen (PFEIFFER und MARX[36], L. DEUTSCH[10]), Typhusagglutinin-Mensch (COURMONT[17]), JÖRGENSEN[20]), WRIGHT[49]), Kaninchen, Ziegen (GOLDBERG[18]), JÖRGENSEN und MADSEN[19]), B. coli

Fig. 5. (Nach BRIEGER und EHRLICH.) Antitoxinschwankungen in der Milch von einer tetanusimmunisierten Ziege, die bei ↓ eine subkutane Tetanustoxininjektion bekommen hat.

und koliähnlichen Bakterien (JÖRGENSEN und MADSEN[19]), Levin[27]) u. a.), Dysenterie-Kaninchen (LÜDKE[29]), Rizin-Ziege (MADSEN und WALBUM[32]), Vibriolysin und Staphylolysin-Ziege, Kaninchen (MADSEN, FAMULENER[13a]), TALLQUIST[48]) u. a.), Opsoninen (WRIGHT).

Der wellenförmige Antikörperverlauf ist also für so viele verschiedene Antigene und so viele Organismen festgestellt, daß man ihn wohl als eine allgemeine Regel aufstellen kann, innerhalb welcher es aber viele Variationen gibt.

Was die 1. negative Phase angeht, so hat man ausgesprochenen Abfall der Antikörperkonzentration beobachtet bei Tetanus, Diphtherie,

Botulismus, Rizin, Hämolysin und Präzipitin. In der Regel beginnt der Abfall kurz nach der Injektion und erreicht sein Minimum 2—3 Tage darnach.

Bei den meisten Agglutininen tritt der Abfall in so geringem Maße auf, daß man ihn nur durch sehr sorgfältige Messungen feststellen kann. Hier trägt die 1. Phase das Gepräge einer Latenzperiode von 2—3tägiger Dauer.

Bei der 2. „positiven" Phase setzt das Steigen spätestens am 3.—4. Tage ein, nimmt am 5.—6. Tage zu, in welcher Zeit die Antikörperkonzentration zuweilen bedeutend über das doppelte pro Tag steigt und nimmt dann wieder etwas nach dem Maximum hin ab. Dieses ist am 8.—10. Tage beobachtet bei Diphtheriegift, den Agglutininen und Rizin, während es bei den Präzipitinen früher (ungefähr 7. Tag) und bei Botulismus und Tetanus später auftritt (15. und 17. Tag).

Der Abfall in der zweiten negativen Phase entpricht hinsichtlich der Form in der Regel dem Steigen: Auf ein schnelles Steigen folgt meistens ein schneller Abfall. Die absolute Verminderung der Stärke der Antikörper zeigt sich gewöhnlich am größten gleich nach dem Maximum und nimmt darnach allmählich ab. In vielen Fällen zeigt die Kurve nicht die spitzzackige Form, sondern eine mehr abgerundete. Indessen darf man nicht vergessen, daß das Aussehen der Kurve im hohen Grade davon abhängig ist, welchen Maßstab man für seine Koordinaten wählt.

Bei der Beantwortung der Frage, wie der Verlauf dieser eigentümlichen Immunität vor sich geht, muß man sich vergegenwärtigen, daß der im aktiv immunisierten Organismus vorhandene Antikörper ebenso wie bei der passiven Immunität einer Kraft ausgesetzt ist, die ihn umzusetzen strebt. Aller Wahrscheinlichkeit nach würde jeder Antikörper im Organismus bald verschwinden — wenn er nicht von neuem gebildet würde[30]).

Die erste negative Phase kann nicht, wie es sonst nahe gelegen hätte, durch die Annahme einer Neutralisation des eingeführten Antigens und darauf hingerichtete Versuche erklärt werden, wie eine einfache Berechnung (Salomonsen und Madsen[42]), Kraus und Lipschütz [Wien. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 35]) zeigen

Außerdem beobachtet man den niedrigsten Grad des Abfalls nicht von gleich, sondern erst 1—2 Tage nach der Injektion, was man doch nicht erwarten sollte, wenn es sich um eine Neutralisation handelte.

Eher könnte man eine Einwirkung auf die den Antikörper bildenden Zellen annehmen, wodurch die Produktion eine Zeitlang herabgesetzt würde. In dieser ersten negativen Phase scheint das Individuum dem betreffenden Antigen gegenüber empfindlicher und empfänglicher für Infektion mit dem betreffenden Mikroben zu sein als unter normalen Verhältnissen. Dies muß man in Betracht ziehen, wenn es sich um eine aktive Immunisierung unter Umständen handelt, wo die Gefahr der Ansteckung vorhanden ist. (Siehe auch das Wrightsche Vaccinationsverfahren*).)

2. Darnach nimmt die Produktion wieder zu: sie scheint am vierten bis sechsten Tage nach der Injektion besonders stark zu sein, wird dann wieder geringer. Oft scheint die Produktion plötzlich aufzuhören, und dann zeigt die dritte Phase einen steilen Abfall. In anderen Fällen geschieht die Abnahme der Produktion langsamer, und man erhält

---

*) Siehe dieses Handbuch: Levaditi, Opsonine.

dann statt der spitzzackigen Kurve eine flache, abgerundete, wo die Abnahme der Produktion einige Zeit das Gleichgewicht hält.

3. Der Abfall in der dritten Phase entspricht ganz dem, welcher bei der passiven Immunisierung beobachtet wird (Madsen[29]).

Der eben beschriebene Verlauf stimmt überein mit dem, wie er sich bei der Injektion einer einzelnen Dosis des Antigens findet und den man in seiner reinsten Form sieht, wenn man einem nicht vorbehandelten Tiere eine verhältnismäßig große Dosis z. B. Typhus-Colibazillen, Albuminstoffe u. dergl. einverleiben kann, oder wenn ein aktiv immunisiertes Tier längere Zeit nicht behandelt worden ist. Wird demselben Tiere mehrere Male in Zwischenräumen die gleiche Menge Antigen gegeben, so wird in der Regel ein immer geringerer Antikörperausschlag hervorgerufen, zuweilen beobachtet man aber das Gegenteil. Beispiele von beiden Erscheinungen sieht man in der Fig. 12.

Als die Antikörperkurve gefunden wurde, lag die Vermutung nahe, daß die beste Antikörperproduktion erreicht werden könnte, wenn das Antigen auf das Maximum der Kurve appliziert würde. Daß dies aber nicht zutrifft, geht aus Obigem hervor. Da die Latenzperiode drei Tage dauert und in der Regel weitere drei Tage vergehen, ehe die Produktion ihren Höhepunkt erreicht hat, so wird ein auf diese Weise immunisierter Organismus schon bedeutende Mengen Antikörper verloren haben, bevor eine Einspritzung in Akme ihre Wirkung auszuüben vermag. Bei der Injektionsweise, die Dean[8]) empfiehlt und die gewöhnlich angewendet wird, spritzt man ungefähr jeden dritten Tag ein. Man sieht dann, daß auf diese Weise ein Produktionsmaximum einsetzt, wo die vorhergehende aufhört.

Wie die Antikörperproduktion bei der am häufigsten angewendeten Methode vor sich geht, ersieht man am besten aus folgenden Kurven, von denen Fig. 6 eine Ziege betrifft, die mit Vibriolysin und Fig. 7 zwei Pferde, die mit Diphtheriegift immunisiert wurden. Wie aus Fig. 6 hervorgeht, beginnt man täglich mit ganz kleinen Mengen zu immunisieren; nach und nach, wie die Dosen größer werden, injiziert man nur jeden zweiten Tag. Bei dieser Behandlung steigt die Antikörperkurve anfangs ganz langsam, nachdem aber die Dosen bis über 5 ccm gestiegen sind, nimmt die Schnelligkeit der Produktion zu und erreicht nach einigen unregelmäßigen Schwankungen am 8. Tage nach der letzten Einspritzung von 35 ccm ihren Höhepunkt. Am 49. Tage, d. h. 12 Tage nach der letzten Einspritzung nimmt man 600 ccm, also eine verhältnismäßig große Menge Blut, worauf die Antikörpermenge schnell fällt mit einem etwas unregelmäßigen Verlauf. Fig. 7 zeigt die Antitoxinschwankungen bei zwei Pferden, die vorher im Laufe von 2 Monaten mit Dosen Diphtheriegift, die von 0,1 bis zu 25 ccm steigen, immunisiert waren. Nach der Einspritzung von 30, 50, 60, und 80 ccm stieg der Antitoxinwert von 70 I.-E. auf 600 bei dem einen und auf 630 I.-E. bei dem andern, um darauf schnell wieder zu sinken. Man sieht die große Ähnlichkeit mit der Vibriolysinkurve Fig. 6.

Über die Frage, durch welches Verfahren die größte Antikörperproduktion erzielt wird, herrscht Meinungsverschiedenheit.

Die einen meinen, man müsse durch rasch steigende große Dosen eine starke Reaktion bei den Tieren bewirken, die andern sind der Ansicht, daß ein mehr schonendes Verfahren den Vorzug verdiene. Jetzt dürften die meisten erfahrenen Immunisatoren zu der Ansicht gekommen sein, daß es am richtigsten ist, wenn man das Antigen so gibt, daß der

0,10 0,20 0,30 0,40 0,50 0,75 1,0 1,5 2,0 3,0 4,0 5,0 6,0 7,5 10,0 12,0 15,0 20,0 25,0 30,0 35,0

Nach Famulener:
Aktive Immunisierung von einer Zi
mit Vibriolysin.
Dosen von 0,1 cc. zu 35 cc. steig

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70

Fig. 6.

Organismus so wenig wie möglich darunter leidet. Man beachte an den hier wiedergegebenen Kurven, daß bei den allmählich steigenden Dosen keine negative Phase vorhanden ist. Indessen ist dies nicht immer der Fall, wie aus dem an der Fig. 8 wiedergegebenen Versuch hervorgeht, wo ein Kaninchen in einem Zeitraum von 75 Tagen regelmäßig jeden dritten Tag eine Einspritzung von einem Kubikzentimeter einer 24 Stunden alten Kultur von B. typh. bekam. Man sieht, daß die Agglutininmenge steigt, wenn auch mit tiefen Remissionen, und am 54. Tage ihr Maximum erreicht, um dann ebenfalls mit Remissionen abzunehmen.

Eine Frage von praktischer Bedeutung ist, den Zeitpunkt zu kennen, in welchem während einer solchen Immunisierung das Antikörpermaximum eintritt. In der Regel zeigt es sich in kürzerer Zeit nach der letzten Einspritzung als nach einer einmaligen Injektion, oft schon am 6.—7. Tage. Man muß auch den Umstand berücksichtigen, daß der Organismus zu diesem oder jenem Zeitpunkte trotz fortgesetzter Antigen-Injektion keine Antikörper mehr zu produzieren vermag. Es ist, als ob das Produktionsvermögen ermüdet sei. Ein Beispiel hierfür sieht man an der Fig. 9. Eine Ziege, die 40 ccm einer 24 Stunden alten Kultur von V.-Cholera eingespritzt erhielt, zeigte eine typische Agglutininkurve; darauf bekam sie vom 26. bis 61. Versuchstage täglich Einspritzungen einer ebenfalls 24 Stunden alten Kultur von Vb.-Cholera. Die Agglutininmenge stieg schnell bis zum 43. Versuchstage, um dann rasch wieder zu fallen, als ob die in den letzten 29 Versuchstagen gegebenen Dosen Cholerakultur völlig wirkungslos gewesen wären. Man sieht hieraus, wie notwendig es ist, den Status des Antikörpers bei den Versuchstieren zu kontrollieren, sonst läuft man Gefahr in einer Periode der Ermüdung, wo die Antikörpermenge in Abnahme begriffen ist, den Aderlaß zu machen. In der Zwischenzeit können sich die Tiere völlig wohl befinden, ohne irgendwelche krankhafte Symptome aufzuweisen. Trotz

Fig. 7. (Nach Madsen und Walbum.) Antitoxinschwankungen bei diphtherieimmunisierten Pferden. Am 30. XII. wurden 30, am 2. I. 50, am 5. I. 60 und am 11. I. 80 ccm Diphtherietoxin subkutan gegeben.

der vielen Gifteinspritzungen darf man bei aktiv immunisierten Tieren nicht vergessen, daß die Giftfestigkeit und der Gehalt an Antikörpern nicht parallel laufen und daß die Immunität nicht ohne weiteres an der Antikörpermenge gemessen werden kann. Andererseits ist es eine be-

Fig. 8. (Nach JÖRGENSEN.) Stellt die Antikörperschwankungen bei einem Kaninchen, das jeden dritten Tag (↓) Injektion von 1 ccm Typhuskultur erhielt, dar.

kannte Tatsache, daß aktiv immunisierte Tiere trotz steigender Antikörpermenge auf Gifteinspritzungen außerordentlich reagieren, ja sogar an ihnen sterben können (Überempfindlichkeit, Anaphylaxie).

Wenn die Antikörperkonzentration im Blute eine genügende Höhe erreicht hat, wird dem Tier Blut genommen und ihm nachher eine

Ruhe von einigen Wochen — je nach den Umständen — gewährt. In dieser Zeit pflegt die Antikörpermenge zu sinken. Wünscht man, daß die Produktion fortgesetzt werde, so gibt man dem Tiere wieder eine Reihe Antigendosen mit 2—4tägigen Zwischenräumen. Wie groß die erste dieser Dosen sein soll, mag davon abhängen, wie sehr das Tier auf die letzte reagiert hat. Oft kann man mit der Hälfte der letzten Dosis anfangen; aber hier muß man sehr individualisieren. Nicht selten ist es angebracht, die Schlußdosis etwas größer zu nehmen als die in der vorigen Seance gebrauchten. Der stärkste Ausschlag in der Produktion zeigt sich durchgehends in den ersten Monaten der Immunisierung mit hohen und spitzzackigen Kurven, Austrag und Abfälle. Bei den Tieren aber, die lange unter Behandlung gewesen sind, scheint die Fähigkeit einer kräftigen Reaktion geschwächt zu sein. Die Kurven werden, wie früher erwähnt, mehr abgerundet, so daß das Maximum sich über eine längere Zeit erstreckt. Bei diesen Tieren tritt nach der 3. Phase eine Art antitoxisches Gleichgewicht auf, indem sich die Antikörpermenge eine zeitlang ungefähr konstant hält. Eine neue Antigeninjektion ruft noch eine geringe Steigerung hervor, worauf die Antikörpermenge auf das frühere Niveau fällt.

Fig. 9. (Nach Jörgensen und Madsen.) Ziege. Am ersten Versuchstag Injektion (↓) von 40 ccm 24 Stunden Kultur von Vb.-Cholerae. Vom 26. bis 61. Verusuchstag täglich Injektion (↓—↓) vom 5 ccm 24 Stunden Kultur von Vb.-Cholerae.

Es scheint fast, als ob im Organismus eine Art Regulierung vor sich ginge, so daß Produktion und Abnahme einander das Gleichgewicht halten.

Bei Tieren, die lange unter Immunisierung gewesen sind, zeigen die Antikörperkurven oft bedeutende Unregelmäßigkeiten. In der dritten Phase, die bei Beginn der Immunisierung gewöhnlich regelmäßig ist, beobachtet man nicht selten Schwankungen nach oben und unten; zuweilen steigt die Antikörpermenge ohne ersichtlichen Grund, das „antitoxische Gleichgewicht“ ist in Wirklichkeit eine Reihe solcher ganz kleiner Schwankungen nach oben und unten. Es liegt auch auf der Hand, daß die neue Funktion, die Antikörperreaktion, von einer Menge verschiedener Faktoren abhängig sein kann. Daher kann man auch nie ein direktes Verhältnis zwischen der injizierten Antigenmenge und der dadurch bewirkten Antikörperreaktion erwarten.

Der eben beschriebene Verlauf betrifft hauptsächlich die Fälle, in denen toxische Stoffe angewendet worden sind. Es gibt aber andere Fälle, wo die langsame Gewöhnung an fortwährend steigende Dosen nicht nötig ist, wenn Stoffe ohne besondere Toxizität, wie Blutkörperchen, Proteïne u. a. verwendet werden.

Man muß vorsichtig sein, wenn man bei der Immunisierung das Giftpräparat wechseln will. Selbst wenn der Organismus ohne Nachteil eine gewisse Menge eines Giftes, an das er sich gewöhnt hat, vertragen kann, so ist man doch bei einem neuen Gift einer heftigen Reaktion ausgesetzt, selbst wenn es in einer Dosis angewendet wird, welche die gleiche Menge Toxineinheiten wie die andere enthält. Dies hat vielleicht seinen Grund darin, daß zwei Giftlösungen selten ganz gleich sind und außer dem eigentlichen Toxin eine Anzahl anderer Stoffe enthalten, an die sich der Organismus allmählich gewöhnen soll. Kennt man das neue Gift in dieser Beziehung nicht, so dürfte es sich empfehlen, die erste neue Dosis kleiner als die letzte des früheren zu nehmen.

Es ist ja bekannt, daß die Lösung, womit man immunisiert, häufig mehrere Antigene enthalten. Zieht man diesen Umstand nicht in Betracht, so setzt man sich falschen Schlüssen über die Spezifität der gebildeten Antikörper aus.

Fig. 10. (Nach Jörgensen.) Kaninchen. I. Erst wird B. coli und 4 Tage später B. typhi einverleibt. Die hierdurch hervorgerufene Koliagglutininreaktion ist kräftiger als die Typhusagglutininreaktion. — II. Sieben Monate später werden die Injektionen in umgekehrter Weise wiederholt: 1. B. tyhp., 2. B. coli. Diesmal ist die Typhusagglutininkurve viel höher als die Koliagglutininkurve. — ↓ Injekt. von B. coli. ⇣ Injekt. von B. typh. —⊙— Koliagglutininkurve. - -●- - Typhusagglutinink.

Wenn man die Immunisierung mit verschiedenen Antigenen vornehmen will, wie dies bei der Darstellung polyvalenter Sera der Fall ist, so gestalten sich die Verhältnisse ziemlich kompliziert. Injiziert man zwei Antigen ein Zwischenräumen von einigen Tagen, so wird die erste Einspritzung in der Regel die größte Antikörperkurve ergeben (s. z. B. Jörgensen[20]), Fig. 10).

Zuweilen ist es unmöglich zur Immunisierung das Antigen unverändert anzuwenden, da die Wirkung auf den Organismus zu stark ist. Man muß sich dann einer Modifikation des Giftes bedienen, wodurch man seine giftigen Eigenschaften zu schwächen sucht, ohne seine immunisierende Fähigkeit zu zerstören. Wir werden hier nicht ausführlich auf alle Methoden eingehen, die man zu diesem Zwecke angewendet hat, da ihre Besprechung in anderen Kapiteln dieses Handbuches behandelt wird.

Von chemischen Methoden findet besonders eine Behandlung des Giftes mit Jodpräparaten Anwendung.

BEHRING benutzt Jodtrichlorid (ca. 0,25 %); ROUX und VAILLARD fügen dem Toxin 1/3 seines Volumen Jod-Jodkaliumlösung (1 + 2 + 300) hinzu. Zu den folgenden Einspritzungen wird immer weniger Jod und zuletzt das reine Gift gebraucht.

Ziegen können nur sehr schwer mit im ursprünglichen Zustande benutzten Krotalusgift immunisiert werden, während dies mit Leichtigkeit geschieht, wenn das Gift vorher mit Salzsäure behandelt ist.

Ein anderes häufig angewendetes Verfahren ist die Schwächung des Giftes durch Erwärmen. Bei einer Temperatur von etwa 50 bis 60 ° wird nämlich ein Teil der Toxine in ungiftige Modifikationen (Toxoïde, EHRLICH) verwandelt, die zwar ihre toxische Eigenschaften verloren, ihre antitoxinbindende und immunisierende Fähigkeit aber bewahrt haben. Mittels solcher Toxoïde gelang EHRLICH die schwierige Immunisierung von Mäusen gegen Tetanus. Oft empfiehlt es sich bei besonders empfindlichen Tieren die Immunisierung mit diesen Toxoiden zu beginnen, sei es nun, daß sie durch Erwärmung, sei es, daß sie durch einfache Lagerung hergestellt sind. Dagegen dürfen diese in der Regel nicht angewendet werden, wenn es gilt, die Antikörperproduktionen hoch zu treiben. In diesem Falle sind Gifte von großer Toxizität am Platze.

Man kann auch ein anderes Mittel anwenden, wenn man die toxischen Eigenschaften eines Giftes hemmen will, ohne sein Immunisationsvermögen zu sehr zu schwächen, nämlich die partielle Sättigung mit Antikörpern. Mit einem nicht vollständig neutralisierten Diphtheriegifte (Diphtherietoxonen) konnten DREYER und MADSEN [11]) eine ebenso starke Produktion von Diphtherieantitoxin erzeugen wie mit einem entsprechenden Gifte allein.

Fig. 11. (Nach TALLQUIST.) Kaninchen. Am 25. IV. 15 ccm Antivibriolysin intravenös. Am 25. IV. 5 ccm Vibriolysin intraperitoneal.

Häufig leitet man die Behandlung durch eine Kombination der aktiven und passiven Immunisierung ein, indem man gleichzeitig an zwei verschiedenen Stellen Antikörper und Antigen einverleibt. Werden Antikörper und Antigen gleichzeitig jedes für sich an verschiedenen Stellen einverleibt, resultiert eine Kurve, wie die in Fig. 11 wiedergegebene. Einem Kaninchen wurde am 25. April 15 ccm Antivibriolysin intravenös injiziert, worauf die für die passive Immunisierung typische Kurve (mit Fall bis 28. April) beobachtet wurde. Jetzt begann die Wirkung der 5 ccm Vibriolysin, die auch am 25. April intraperitoneal appliziert wurden, und wodurch eine typisch aktive Immunisierungskurve mit Akme am 7 Tage hervorgebracht wurde.

Wenn erst die Anfangsschwierigkeiten durch eine der vorher genannten Methoden überwunden sind, kann man nach und nach dazu übergehen, das reine Antigen zu injizieren.

Von besonderer Wichtigkeit sind die bedeutenden individuellen Unterschiede bei den Tieren. Wie groß diese sein können, sieht man deutlich an der Kurve Fig. 12. Es handelt sich hier um drei Kaninchen von demselben Wurf und demselben Gewicht. Die Tiere hatten genau unter denselben Verhältnissen gelebt und waren gleichzeitig und genau auf dieselbe Weise mit B. typh. immunisiert worden. 5 Wochen nach der ersten Einspritzung enthielt das Serum des Kaninchens I 154, die des Kaninchens II 40 und die des Kanichens III 8 Agglutinineinheiten. Sie bekamen alle drei genau einen Kubikzentimeter von derselben 24 Stunden alten Typhusbouillonkultur intraperitoneal, worauf man die auf der Figur sichtbaren Agglutininschwingen erhielt.

Wie man sieht, ist die Kurve bei allen drei Tieren von gewöhnlichem Typus und zeigt ihr Maximum am 9. bis 11. Tage. Die höchste Konzentration war aber außerordentlich verschieden und zwar 500, 1820 und 30, und auffallend ist es, daß sich die größte Konzentration nicht etwa bei dem Tiere fand, das vor der Injektion die größte Menge Agglutinin enthielt.

Außerdem sieht man beim Kaninchen II und III die sehr verschiedene Reaktion bei wiederholten Einspritzungen: Kaninchen II gab nach der zweiten Einspritzung der Kultur am 25. Versuchstage (2 ccm) einen bedeutend geringeren Ausschlag als nach der ersten 1 ccm großen, während bei Kaninchen III die Ausschläge nach jeder folgenden Injektion — im ganzen waren es drei — immer größer wurden.

Fig. 12. (Nach Jörgensen und Madsen.) Am 1. Versuchstag bekamen I, II u. III 1 ccm einer 24 Std. Bouillonkultur v. B. typh. Am 25. Versuchstag bekamen II u. III 2 ccm einer 24 Std. Bouillonkultur v. B. typh. Am. 42. Versuchstag bekam III 2 ccm einer 24 Std. Bouillonkultur von B. typh.

Können wir aber bei diesen drei Tieren so große Verschiedenheiten wahrnehmen, so lehrt uns dieser Fall, wie vorsichtig wir sein müssen, wenn wir Schlüsse, z. B. über das Immunisierungsvermögen eines Antigens ziehen wollen.

Unter den Versuchstieren wird man alle Typen finden. Sehr häufig sieht man Tiere, die beim Beginn der Immunisierung große Ausschläge aufweisen, die aber dann schnell das Reaktionsvermögen verlieren, um es nicht wieder zu erlangen, während andere nach einer Ruhezeit wieder brauchbare Antikörperproduzenten werden können. Nicht selten findet man auch Individuen, die mit einer so geringen Antikörperproduktion reagieren, daß sie völlig unbrauchbar sind.

Wird man vor die Frage gestellt, ob ein Stoff Immunisierungsvermögen besitzt oder nicht, so darf man nicht allzu großes Gewicht auf die Versuche legen, die ein negatives Ergebnis haben. Man sieht nämlich nicht so selten, daß man durch Behandlung mit einem Stoff in einigen Fällen keine Antikörperbildung erreicht, der in andern Fällen positiv wirkt. Als Beispiel führe ich hier an, daß ich 20 Ziegen und 200 Kaninchen mit großen Mengen bzw. Pferdeserum und Hühnereiweiß behandelt habe, ohne eine Spur von Präzipitinbildung zu bekommen, was bekanntlich gewöhnlich sehr leicht gelingt. Auch ist es notwendig, die Tierart zu wechseln, wenn man bei einer anderen negative Resultate hat.

Im Laufe der aktiven Immunisierung läßt man häufig zur Ader, teils handelt es sich um kleinere Aderlässe — Probeaderlässe —, teils um größere zur Serumgewinnung.

Es dürfte sich deshalb empfehlen, sich darüber Klarheit zu verschaffen, wie der Aderlaß auf einen aktiv immunisierten Organismus wirkt.

Kleinere Probeaderlässe haben wohl kaum ein bedeutende Einwirkung, aber wenn monatelang täglich z. B. 10 ccm Blut von einem Kaninchen abgezapft werden, so liegt die Vermutung nahe, daß ein solcher Blutverlust schädlich wirkt.

Handelt es sich um einen größeren Blutverlust, so wird die Wirkung davon abhängen, in welchem Stadium der Immunisierung der Aderlaß erfolgt ist.

Wenn ein Tier, das sich im „antitoxischen Gleichgewicht" befindet, zur Ader gelassen wird, so wird die Antitoxinmenge ungefähr entsprechend dem erlittenen Antikörperverlust abnehmen, in den folgenden Tagen aber wieder steigen, doch in der Regel nicht bis zur ursprünglichen Höhe. Dies stimmt überein mit der früher erwähnten Annahme, daß in dem aktiv immunisierten Organismus eine Produktion und Destruktion der Antikörper vor sich geht, die in gewissen Stadien einander das Gleichgewicht halten. Wird bei dem Aderlaß etwas von dem Antikörper entfernt, so wird der größte Teil nach kurzer Zeit reproduziert (ROUX und VAILLARD[40]), SALOMONSEN und MADSEN[43]). Nimmt man den Aderlaß in der Akme vor, so sind die Folgen sehr verschieden. Häufig zeigt sich dann ein Abfall, ähnlich dem, den man sonst auch an der Kurve beobachten würde; zuweilen ist dieser Abfall sehr wenig ausgesprochen. Wenn es gilt in einem gewissen Zeitpunkt, wo die Antikörperkonzentration besonders hoch ist, eine sehr große Blutmenge zu bekommen, so könnte man wohl auf den Gedanken kommen, dies dadurch zu erreichen, daß man das Tier entblutet. Indessen bekommt man auf diese Weise nur selten mehr als 40—50 % der Blutmenge. Meistens erreicht man mehr, wenn man den einen Tag 20 % und am andern Tage dieselbe Menge nimmt oder so viel, daß der Tod eintritt. Bei Tieren, die eine flach abgerundete Kurve zeigen und die längere Zeit immunisiert worden sind, kann man mehrere Tage nacheinander Blut entnehmen.

Die Antikörperkonzentration zeigt sich bei den zweiten und den folgenden Blutproben oft geringer als bei der ersten; nimmt man aber den Aderlaß einige Tage nach der Akme in der dritten Phase vor, steigt die Antikörpermenge oft, und diese kann bei wiederholten Aderlässen zu einem Maximum gesteigert werden, welche über dem in der Akme erreichten liegt (Dreyer und Schröder),

Pfeiffer macht ebenfalls darauf aufmerksam, daß die Immunkörperproduktion durch kleine Aderlässe begünstigt wird.

Zu ähnlichem Resultate sind auch Dorner und Friedberger mit Rücksicht auf die Hämolysinbildung gekommen. Dagegen wirken wiederholte Aderlässe in der Regel sehr herabsetzend auf den Antitoxininhalt des Organismus[42]).

Bei einer großen Anzahl von Versuchen, welche in der Literatur vorliegen, welche den Einfluß verschiedener Eingriffe auf die Antikörperproduktion festzustellen versuchen, ist die Beweiskraft sehr gering, weil nicht genügend Rücksicht darauf genommen ist, in welcher Phase der Antikörperkurve der Eingriff erfolgt ist. Es ist fast immer notwendig, daß eine sorgfältige Bestimmung der Kurve während ihres ganzen Verlaufes vorgenommen wird.

Über passive Immunisierung.

Einem Kaninchen werden 10 ccm Typhus-Agglutinin in eine Vene des Ohrrandes injiziert. Darauf nimmt man von dem andern Ohre teils unmittelbar nach der Einspritzung, teils in größeren Intervallen Blutproben und untersucht sie auf Agglutinin.

Aus der Fig. 13 ersieht man, daß die Antikörperkonzentration des Blutes (d. i. Gehalt an Antikörpern pro Kubikzentimeter) mit der Zeit abnimmt und zwar in der Weise, daß der absolute Verlust in den ersten Tagen am größten ist und dann nach und nach geringer wird.

Diese Erscheinung tritt so regelmäßig auf, daß man sie durch eine einfache Formel —

Fig. 13. (Nach Madsen und Walbum.) Kaninchen. Passive Immunisierung mit Typhus-Agglutinin (intravenös).

entsprechend der Formel für die Reaktionsgeschwindigkeit — ausdrücken kann[30]). In der Figur stellt die Kurve die berechneten, die mit ● bezeichneten Zahlen die tatsächlich beobachteten Werte des Antikörpers dar.

Danach scheint das Verschwinden des Antikörpers aus dem Blute hauptsächlich eine Funktion seiner Konzentration im Blute und der Zeit zu sein.

Wegen des hyperbolischen Charakters der Kurve ist es ausgeschlossen, einen bestimmten Punkt anzugeben, wo aller einverleibte Antikörper verschwunden ist. Nach und nach lassen sich immer geringere Spuren von Antikörpern nachweisen oder diese werden durch vorhandene normale Antikörper verschleiert. Dieses Verschwinden des Antikörpers kann kaum auf eine Ausscheidung durch Sekrete (Milch, Harn, Schweiß usw.) zurückgeführt werden, vielmehr ist es wahrscheinlich, daß der Antikörper entweder im Blute selbst oder in den Organen als körperfremd umgesetzt wird. Der Antikörper ist nämlich ganz denselben Gesetzen unterworfen, wie jedes in den Kreislauf eingeführte Eiweiß, wie unsere diesbezüglichen Untersuchungen ergeben haben.

Das Verhältnis zwischen der Menge des eingeführten Antikörpers und der angenommenen gesamten Blutmenge scheint selten so zu sein, daß der Antikörper im Blute einfach verdünnt wird. Wenn man das Verhältnis zwischen dem eingeführten Antikörper und der ganzen Blutmenge des Tieres (bei Kaninchen ca. $^1/_{20}$ des Körpergewichts) berechnet, so zeigt sich, daß es bis zur Hälfte verschwindet, vielleicht sofort von den Körperzellen gebunden (Dreyer und Schröder, Kraus und Joachim).

Was die Schnelligkeit des Verschwindens betrifft, so ist sie abhängig von der Menge des injizierten Antikörpers und von der Art und der Individualität des Versuchsobjektes. Je mehr eingespritzt wird, desto länger wird er gewöhnlich im Blute bleiben, doch ist hier von keinem direkten Verhältnisse die Rede.

Häufig verschwindet auch der heterologe Antikörper schneller als derjenige, welcher von derselben Art (homologen) oder von einer dieser nahestehenden gewonnen ist (v. Behring[2]), Tizzoni).

Dieser homologe Antikörper kann zuweilen noch nach mehreren Monaten nachgewiesen werden, während jener nicht selten nach einigen Wochen und häufig schon nach viel kürzerer Zeit (nach wenigen Stunden) verschwunden ist. Ganz dasselbe beobachtet man beim Eiweiß. Bei Ziegen, die mit Hühnereiweiß injiziert waren, fand ich schon nach 24 Stunden nichts mehr davon, während ich in Ziegen eingespritztes Pferdeserum erst nach 14 Tagen nicht mehr im Blute nachweisen konnte.

Im allgemeinen trifft es wohl zu, daß das Serum desto schneller schwindet, je artfremder es ist, aber dies darf doch nicht als allgemeine Regel aufgestellt werden, denn nicht so ganz selten hält sich ein heterologer ebenso lange wie ein homologer.

So hält sich bei der Ziege das Ziegen-, Kaninchen- und Pferdeserum einen bis mehrere Monate; dasselbe gilt bei Kaninchen, die mit homologem Serum injiziert sind, während bei diesen Tieren das Ziegenserum schon nach 1—2 Wochen verschwindet[19]).

Stets muß man jeden Fall besonders prüfen.

Von praktischer Bedeutung ist die Tatsache, daß das Diphtherieantitoxin vom Pferde ungefähr 3 Wochen im menschlichen Organismus verbleibt, wie aus zahlreichen klinischen Erfahrungen hervorgeht und u. a. auch von Henderson-Smith experimentell nachgewiesen ist.

v. Dungern[12]) gibt an, daß das Krebsplasma (Maja squinado), wenn es mehrmals hintereinander eingespritzt wird, immer langsamer aus der Blutbahn verschwindet.

Im hiesigen Institut sind ähnliche Versuche mit Vibrioantilysin (Famulener[13a]) angestellt, die aber zu einem andern Ergebnis führten. Nach drei nacheinander vorgenommenen Antikörperinjektionen verschwand dieser Stoff ebenso schnell wie nach einer einmaligen Einspritzung.

Bei Tieren, die früher mit Serum behandelt sind, schwindet der injizierte Antikörper schneller als bei denen, die zum ersten Male in Behandlung sind (v. DUNGERN, DEHNE und HAMBURGER[9]), SACHAROFF[41])).

Nach SHIBAYAMA[45]) bleibt die passive Immunität in der ersten Woche fast unverändert, wenn man gleiche Dosen von Serum hintereinander an jedem dritten Tage einverleibt. Aber mit der Zeit wird die Immunität nach und nach schwächer, so daß man in der Mitte oder am Ende der dritten Woche den Antikörper im Serum nicht mehr nachweisen konnte.

Für die Schnelligkeit, womit die passive Immunität eintritt, ist die Applikationsweise des Antikörpers von wesentlicher Bedeutung. Die Resorption desselben ist nämlich verhältnismäßig langsam.

Dies wird am besten durch ein Beispiel erläutet (HENDERSON-SMITH): 3 Kaninchen von genau demselben Gewicht erhalten dieselbe

A intravenös.
B intraperitoneal.
C subkutan.

Fig. 14. (Nach HENDERSON-SMITH.) Passive Immunisierung von 3 Kaninchen A, B und C mit Koli-Agglutinin.

Dosis von demselben Koli-Agglutinin und zwar A intravenös, B intraperitoneal und C subkutan.

Wie Kurve Nr. 14 zeigt, erreicht ein intravenös injiziertes Kaninchen die Agglutininkonzentration des Blutes sofort im Maximum mit 541 Einheiten und sinkt dann nach dem früher angegebenen Typus. Bei dem intraperitoneal injizierten Tier wird das Maximum erst nach 30 Stunden mit 250 Einheiten und bei der subkutanen Applikation erst nach 53 Stunden mit nur 143 Einheiten erreicht. Die Antikörperkonzentration wird somit bei den beiden letzten Injektionsweisen viel geringer, als bei der direkten Einführung in die Blutbahn, was von großer praktischer Bedeutung sein kann. Nach Erreichung des Maximums sinkt der Antikörper in allen 3 Fällen in ungefähr derselben Weise.

Literatur.

1) Abbott and Bergey, The influence of alcoholic intoxication upon certain factors concerned in the phenomen of haemolysis. Centralbl. für Bakt. etc. 1902, Vol. XXXII, pag. 260.
2) Behring, E. v., Allgemeine Therapie der Infektionskrankheiten 1899, pag. 997 und pag. 1054.
3) Brieger und Ehrlich, Beiträge zur Kenntnis der Milch immunisierter Tiere. Zeitschr. für Hygiene etc. 1893, Bd. XIII, pag. 336.
4) Bronstein, Zur Technik der Serumgewinnung, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XL, pag. 583.
5) Bulloch, On the nature of haemolysis and its relations to bacteriolysis. Transact. of the Pathol. Society of London 1901.
6) Carini, Apparat für intravenöse Injektion größerer Mengen infektiöser Kultur. Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVI, pag. 318.
7) Courmont, Courbe agglutinante chez les typhiques. Revue de méd. 1897 u. 1900.
8) Dean, Problems of Diphtheria immunity. Transact. of the Pathol. Society of London 1900.
9) Dehne und Hamburger, Experimentelluntersuchungen über die Folgen parenteraler Einverleibung von Pferdeserum. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 29, pag. 807.
10) Deutsch, Contribution à l'étude de l'origine des anticorps typhiques. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899.
11) Dreyer und Madsen, Über Immunisierung mit den Toxonen des Diphtheriegiftes. Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVII, pag. 250.
12) Dungern, v., Die Antikörper. Jena 1903.
13) Ehrlich, Über Ricin — Über Abrin. Deutsche med. Wochenschr. 1891.
13a) Famulener, A report of immunisation curves derived from goats treated with certain haemolytic bacterial toxins. Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLIV, pag. 58.
14) Forsmann et Lundstroem, Sur la marche de la courbe d'antitoxine dans l'immunisation active contre le Botulismus. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Tome XVI, pag. 294.
15) Forsmann, Studien über die Antitoxinbildung bei aktiver Immunisierung gegen Botulismus. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII, pag. 463.
16) Friedberger und Dorner, Über die Hämolysinbildung durch Injektion kleinster Mengen von Blutkörperchen und über den Einfluß des Aderlasses auf die Intensität der Bildung hämolytischer Ambozeptoren beim Kaninchen. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII, pag. 544.
17) Friedberger, Zur Technik der intraperitonealen Injektion. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXIX, pag. 718.
18) Goldberg, Die Agglutinationsreaktion bei Injektionen verschiedenen Grades. Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXX pag. 605.
19) Jörgensen and Madsen, The fate of typhoid and cholera agglutinins during active and passive immunisation. Festschrift, Statens Seruminstitut Kopenhagen 1902.
20) Jörgensen, Schwankungen des Agglutinationsvermögens des Blutes im Verlaufe des Typhus abdominalis. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII, pag. 475.
21) Kraus und Eisenberg, Über Immunisierung mit Immunsubstanzen. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXI, pag. 208.
22) Kraus und Joachim, Zur Frage der passiven Immunisierung. Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 50.
23) Kraus und Lipschütz, Über Antihämolysine normaler Organe. Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 35.
24) Kuprianow, Experimentelle Beiträge zur Frage der Immunität bei Diphtherie. Centralbl. für Bakt. 1894, Bd. XVI, pag. 415.
25) Latapie, Nouveau broyeur pour la préparation de la pulpe d'organes. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, pag. 947.
26) Ders., Appareils à récolter le serum sanguin. Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, pag. 106.
27) Levin, Coliagglutinins and their course of formation. Festschrift, Statens Seruminstitut, Kopenhagen 1902.
28) Lincoln, Eine Methode, um verhältnismäßig möglichst viel Blutserum zu bekommen. Centralbl. für Bakt. Ref. 1906, Bd. XXXVII, pag. 367.
29) Luedke, Untersuchungen über die bazilläre Dysenterie. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XL, pag. 290.

30) MADSEN, The decrease of antibodies in the organism, indicated by a formula. Festschrift. Statens Seruminstitut, Kopenhagen 1902.
31) Ders., Compte rendu du XIII. Congrès international d'Hygiène etc. Bruxelles, Tome II, pag. 9.
32) MADSEN et WALBUM, De la ricine et de l'antiricine. Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVI, pag. 242.
33) MORGENROTH, Untersuchungen über die Bindung von Diphtherietoxin und Antitoxin, sowie über die Konstitution des Diphtheriegiftes. Berliner klin. Wochenschrift 1904, pag. 526.
34) Ders., Über den Antikörper des Labenzyms. Centralbl. für Bakt. 1899, Bd. XXVI, pag. 349.
35) NEISSER und WECHSBERG, Über das Staphylotoxin. Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVI, pag. 299.
36) PFEIFFER und MARX, Die Bildungsstätte der Choleraschutzstoffe. Zeitschr. für Hygiene 1898, Bd. XXVII, pag. 272.
37) PFEIFFER, Hygienischer Kongreß in Brüssel. Centralbl. für Bakt. 1904. Referat. Bd. XXXV, pag. 227.
38) PFEIFFER und FRIEDBERGER, Über den Verbleib des bakteriolytischen Immunkörpers im tierischen Organismus nach der passiven Immunisierung. Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVII, pag. 131—138.
39) PROESCHER, Die Gewinnung von Antistaphylokokkenserum. Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVII, pag. 295.
40) ROUX et VAILLARD, Contribution à l'étude du tétanos. Ann. de l'Inst. Pasteur 1893, pag. 65.
41) SACHAROFF, G., Über Injektionen von Diphtherieantitoxin bei Tieren, welche mit normalem Pferdeserum vorbehandelt waren. Centralblatt für Bakteriol. 1905, Bd. XXXIX, pag. 99.
42) SALOMONSEN et MADSEN, Recherches sur la marche de l'Immunisation active contre la diphthérie. Ann. de l'Inst. Pasteur 1897 und 1899.
43) Dies., Sur la reproduction de la substance antitoxique après de fortes saignées. Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, pag. 763.
44) SCHUETZE, A., Über das Verschwinden verschiedenartiger Immunsera aus dem tierischen Organismus. Festschrift Koch, pag. 657.
45) SHIBAYAMA, Über die Wirkung der bakteriolytischen Heilsera bei wiederholten Injektionen. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLI, pag. 571 und 666.
46) STAUBLI, Experimentelle Untersuchungen über die Ausscheidung der Typhusagglutinine. Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIII, pag. 375.
47) STEVENSON und BRUCE, Eine neue Methode, Flüssigkeiten in die Bauchhöhle der Versuchstiere einzuspritzen. Centralbl. für Bakt. 1891, Bd. IX, pag. 689.
48) TALLQUIST, Untersuchungen über aktive und passive Immunisierung mit Vibriolysin. Zeitschr. für Hygiene 1908, Bd. LVIII, pag. 165.
49) WRIGHT, On the changes effected by antityphoid inoculation in the bactericidal power of the blood. The Lancet 1901.
50) Ders., Proceedings of the Royal Soc. The Lancet 1901.
51) WOITHE, Vorrichtungen zum gefahrlosen Befestigen und Aufspannen wilder Ratten. Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLIV, pag. 709.

III.

Technik der Gewinnung antibakterieller und antitoxischer Immunsera an großen Tieren.

(Serumabteilung des Institut Pasteur in Paris.)

Von

Dr. C. Levaditi,

Assistent des Instituts Pasteur-Paris.

Zweck dieser wenigen Zeilen ist es, durch einige Angaben über die Technik am Pariser Pasteurschen Institut die Darstellung von Kretz, die sich auf die im Wiener Institut gemachten Erfahrungen stützt, zu ergänzen.

Das Institut stellt hauptsächlich vier Heilsera in großen Quantitäten her: Diphtherie- und Tetanusantitoxin; Antistreptokokken- und Antidysenterieserum. Zu ihrer Erzeugung dienen ausschließlich Pferde. Die Stallungen befinden sich nicht in Paris selbst, sondern in Garches.

Die Kulturen resp. die Toxine werden im Institut in Paris hergestellt, alles übrige: Immunisierung, Aderlässe, Verpackung der Präparate wird von Garches aus besorgt. Nur die Wertbestimmung des Serums geschieht wieder in Paris, im Diphtherielaboratorium (Dr. Martin).

Es kann und soll hier nicht nochmals im einzelnen besprochen werden, wie sich die verschiedenen Phasen der Immunisierung methodisch gestalten, welche Vorsichtsmaßregeln zu beobachten sind, wenn ein möglichst hoher Titer erzeugt werden soll usw. Es seien lediglich die operativ-technischen Manipulationen bei der Injektion der Antigene, bei der Blutentnahme und -Verarbeitung und schließlich der Abfüllung des gebrauchsfertigen Serums geschildert.

I. Injektion des Antigens.

Das zu impfende Tier wird entweder in einem speziellen, von Tierärzten viel gebrauchten Apparat („travail“ genannt) (Fig. 1) ruhig gestellt, oder noch einfacher mittels einer Schlinge („tord-nez“) aus festem nicht

zu starkem Strick, die an einem kräftigen Holzstab dauerhaft befestigt ist. Sie wird so über die Oberlippe des Pferdes gelegt, daß ein paar Drehungen des Griffs genügen, um die Oberlippe samt den Nüstern fest einzuzwängen. Dann steht das Tier ganz ruhig und kann von einem Gehilfen, der den Stab fixiert, leicht und sicher gehalten werden. Die Injektion geschieht mit einem besonderen Apparat (Fig. 2), der nach dem Prinzip einer Spritzflasche konstruiert ist.

Er besteht aus einem Glasgefäß *a* von etwa 800 ccm Kapazität, das außen Teilungen von 0—600 ccm trägt und oben durch einen doppelt durchbohrten Gummistöpsel *b* fest verschlosseen werden kann. Ein

Fig. 1.

kurzer, im obersten Teil der Flasche endigender Glasansatz *c* stellt die Verbindung mit einer Druckbirne her (*d*, *e*). Durch die andere Bohrung geht ein bis fast zum Boden reichendes Glasrohr *f*, das durch Gummischlauch *g* und Metallansatz *h* mit der 15 cm langen und ziemlich starken Injektionskanüle *i* verbunden werden kann. Vor dem Gebrauch wird der ganze Apparat im Autoklaven sterilisiert, nach erfolgter Abkühlung das Injektionsmaterial (Kultur- oder Toxinbouillon) in das Gefäß eingefüllt und der Stopfen fest aufgesetzt. Die Gegend des Halses wird glatt rasiert, mit 4% Lysol desinfiziert und die Nadel mit einem kräftigen Ruck ins Unterhautzellgewebe eingestoßen (Fig. 3).

Sofort wird durch leichten Druck auf die Birne die Injektionsflüssigkeit im Steigrohr *f* vorgetrieben, und sobald es keine Luft mehr enthält der Hahn *h* geschlossen und durch einen einfachen Bajonettverschluß an der Kanüle befestigt. Durch Öffnen des Hahnes und Kompression der Kautschukbirne läßt sich die gewünschte Menge rasch injizieren. Dann wird wieder abgedreht und die Nadel schnell entfernt. Eine gründliche Abwaschung der Injektionsstelle und ihrer Umgebung mit Lysol beschließt die kleine Operation*).

Fig. 2.

II. Gewinnung des Serums.

1. Die Blutentnahme. Das Instrumentarium besteht aus einem etwa 20 cm langen, soliden Troikart mit dreieckigem Stilet, einem entsprechend großen Glasgefäß zum Auffangen des Blutes und einem verbindenden Gummischlauch. Letzterer (Fig. 4) trägt an einem Ende ein ca. 40 cm langes, 1 cm weites Glasrohr *a*, am anderen einen eingeschliffenen Metallansatz *c* zur Aufnahme des Troikarts. Vor dem Gebrauch kommen Ansatz und Rohr je in einen mit Watte abgeschlossenen Glaszylinder *f* und werden im Autoklaven so sterilisiert. Eine starke Arterienklemme *d* preßt den Gummischlauch in geeigneter Weise ab. Das Gefäß,

Fig. 3.

*) Die intravenöse Injektion wird in der gleichen Weise mit demselben Apparat ausgeführt; die Nadel kommt in die Jugularis. Die Technik ist dieselbe, wie bei dem gleich zu schildernden Aderlaß.

worin das Blut aufgefangen wird (Fig. 5), besteht aus einem größeren Glaszylinder *a* von ca. $2^1/_2$ Liter Inhalt, der durch einen genau schließenden Metalldeckel *c* abgeschlossen wird. In dem Deckel sind zwei Öffnungen angebracht, eine zentrale *i* und eine seitliche *h*. *d* ist eine schwere Metallplatte mit scharfen Vorsprüngen am hinteren Rande; sie hängt an einer Drahtschlinge *i*, welche durch das Loch des Deckels geführt und dort mit einem durchgesteckten Bolzen (*f*) festgemacht werden kann. Zum Sterilisieren wird das Gefäß mit einem Bogen Pergamentpapier *b* bedeckt, die Schlinge durch dieses und die Öffnung *i* durchgezogen und befestigt. Das Ganze mit einem zweiten Bogen Pergamentpapier *g* sorgfältig eingehüllt und im Autoklaven sterilisiert.

Der Gebrauch (Fig. 6) des Apparates gestaltet sich in folgender einfacher Weise. Ein Gehilfe fixiert das betreffende Pferd in einer oder der anderen oben angegebenen Weise, ein zweiter hält das gebrauchs-

Fig. 4.

Fig. 5.

fertige Reservoir und das Verbindungsstück bereit. Der Operateur entfernt möglichst sorgfältig die Haare an einer dem Verlauf der Vena jugularis entsprechenden Stelle des Halses, wäscht die Haut gründlich mit Lysol ab und führt langsam den Troikart ein und zwar erst ein Stück subkutan über dem Gefäß; dann erst sticht er in dieses ein*). Währenddessen wird die Vene durch einen Gehilfen komprimiert und dadurch sehr deutlich sichtbar. Sobald die Kanüle des Troikarts in der Jugularis liegt, wird durch einfaches Aufsetzen des eingeschliffenen Ansatzstückes die

*) Dieser Modus empfiehlt sich deshalb, weil so die äußere Hautwunde und die durch den Stich gesetzte kleine Öffnung im Gefäß nicht direkt übereinander liegen. Dadurch wird später, indem sich intakte, elastische Haut vor diese Öffnung legt, die Blutstillung sehr begünstigt.

Verbindung mit dem übrigen Teil des Apparates rasch hergestellt, ehe irgendwie größere Blutmengen durch die Kanüle nach außen abfließen können. Der Assistent lüftet gleichzeitig das äußere Pergament des Reservoirs etwas, führt rasch das Glasrohr *a* (Fig. 5) durch die seitliche Öffnung *h* des Metalldeckels *c*, stößt es durch das innere Pergamentblatt *b* und öffnet die Klemme am Verbindungsschlauch. Das Blut fließt nun sicher steril in den etwas schräg gestellten Behälter hinein. Jetzt kann das Tier wieder freigegeben werden und bekommt zu fressen, es bleibt dabei in der Regel ganz ruhig. Die Kau- und Schlingbewegungen begünstigen den Blutabfluß in durchaus wünschenswerter Weise.

Sind 2000 ccm Blut in einen Behälter hineingeflossen, dann wird durch Anlegen der Klemme unterbrochen und das Gefäß gewechselt usw. Bei jedem Aderlaß wird pro Tier 6 Liter Blut entnommen.

Fig. 6.

Sobald dies der Fall ist, wird der Troikart mit einem einzigen Ruck herausgezogen und die bis dahin komprimierte Vene wieder freigegeben. Die Blutung steht dann ganz von selbst. Die Hautwunde wird mit Lysol gereinigt.

2. Die Verarbeitung des Serums. Vier Stunden nach der Blutentnahme, wenn also alles Blut sicher geronnen ist, wird die äußere Pergamenthülle *g* am Behälter unter aseptischen Kautelen gelüftet, die Drahtschlinge und der Bolzen *f* durch mehrfaches Hinüberführen der Flamme sorgfältig sterilisiert und nun der Bolzen aus der Schlinge herausgezogen. Die Schlinge, an der die Metallplatte *d* hängt, kann jetzt durch die Öffnung des Deckels gleiten und die schwere Platte sinkt dem Boden des Gefäßes zu. Der dadurch auf den Blutkuchen ausgeübte, nicht unerhebliche Druck befördert und beschleunigt den Austritt des Serums in bedeutendem Maße. Der nunmehr überflüssige Metalldeckel wird entfernt und das Ganze mit der Pergamenthülle *g* wieder zugedeckt. Die so vorbereiteten Behälter kommen dann in den

Keller in eine konstante Temperatur von 7°, nachdem sie in entsprechender Weise etikettiert worden sind:

Serum (Tetanus, Diphtherie etc. etc.)
Datum.
Name des Pferdes.

Dort verbleiben sie bis die Wertbestimmungen für jedes Einzelquantum ausgeführt sind. Hat man so den zahlenmäßigen Anhalt für den Immunwert der von verschiedenen Tieren am gleichen Tage gewonnenen Sera, so läßt sich danach durch entsprechendes Mischen der genaueste, einheitliche Durchschnittstiter leicht erreichen.

3. Wertbestimmung. Diese wird für Diphtherieserum im Pasteurschen Institut zurzeit nach der von Ehrlich angegebenen Methode*) mit einem vom Kgl. Institut für experimentelle Pathologie und Therapie zu Frankfurt a. M. bezogenen Standardserum ausgeführt; die Titrierung von Tetanustoxin wird nach der Methode von Roux besorgt. Sie besteht darin, daß man einem Meerschweinchen 100 DL Tetanustoxin und eine $^{1}/_{100000}$ des Körpergewichts betragende Menge Immunserum im Gemisch subkutan injiziert. Tritt danach kein Tetanus ein, so nimmt man an, daß der Minimalwert des geprüften Serums = 100000 zu setzen ist.

Fig. 7.

Die Wertbestimmung eines Diphtherieserums nimmt mindestens 4 Tage in Anspruch. So lange werden also im Durchschnitt auch die Blutrezipienten im Keller belassen. An der Hand der Titrierungsergebnisse werden die minderwertigen Nummern ausgeschieden und die übrigen Fraktionen zusammengemischt.

Das geschieht mit Hilfe einer kleinen Saugpumpe (Fig. 7 *A*), die aus einem Gummiballon *b* und zwei an seinen Zuleitungsschläuchen montierten Glasröhren *a* und *e* besteht. Erstere (Fig. 7 *B*) ist an ihrem freien Ende zugeschmolzen, hat aber eine seitliche Öffnung *e* am unteren Teil, der in

*) Über die Einzelheiten dieser Methode möge an anderer Stelle dieses Buche nachgelesen werden (s. Madsen).

toto in eine Seidenkappe eingenäht ist. Diese Anordnung verhindert das Eindringen von kleinen Fibrinflocken in den Apparat. Das Sterilisieren geschieht in der üblichen Weise im Autoklaven. Beim Gebrauch (Fig. 8) wird die schon mehrfach erwähnte äußere Hülle aus Pergamentpapier von dem betreffenden Reservoir definitiv entfernt, die noch vorhandene innere mit dem Rohr *a* einfach durchgestoßen; sobald sie genügend tief eintaucht, wird durch mehrmaliges Drücken auf die Birne stark angesaugt, bis ein Hebersystem hergestellt ist; die weitere Entleerung erfolgt spontan. Als Sammelgefäß dient eine sterile, mit Wattepfropfen abgedichtete 5 Liter-

Fig. 8.

flasche, in die das Rohr *c* eingesetzt wird. Es ist schon oben davon die Rede gewesen, daß die dazu geeigneten einzelnen Serumfraktionen schließlich gemeinsam abgefüllt und konserviert werden. Die Sammelgefäße tragen folgendes Etikette:

Diphtherie.

Flasche Nr. . . . .

Resultat der Wertbestimmung . . . . . .

Punktion vom . . . .

Pferde . . . .

Eisschrank am . . . .

Abfüllung am . . . .

Brutofen am . . . .

Versand am . . . .

Conto-Nr. . . . .

Bis zur Abfüllung des Serums in die Detailpackung bleiben sie im Eisschrank stehen.

III. Abfüllung und Verpackung des Heilserums. Trockenserum.

Die Abfüllung des gebrauchsfertigen Serums in kleine Flaschen à 20 ccm geschieht mit Hilfe einer besonderen Vorrichtung, deren Abbildung Fig. 9 gibt.

Der Apparat besteht aus einem größeren gläsernen Behälter für das Serum, dessen obere Öffnung mit einem in Pergamentpapier gewickelten Wattebausch verschlossen werden kann; unten mündet eine seitliche Öffnung mit abgebogenem Glasrohransatz, der durch einen Gummischlauch mit einem Meßzylinder in Verbindung steht. Von dessen unterem

Fig. 9.

Ende setzt sich ein zweites rechtwinkelig abgebogenes Glasrohr fort, dessen freie Öffnung kapselartig erweitert ist. Die Verbindungsschläuche zwischen dem Meßzylinder einerseits, dem Reservoir und dem Abflußrohr andererseits tragen je einen Quetschhahn. Ein Druck auf ein Pedal öffnet das zuführende Rohr und schließt den Abfluß; beim Nachlassen des Drucks findet das Umgekehrte statt.

Der Apparat und die entsprechende Anzahl kleiner Fläschchen werden im Autoklaven sterilisiert, dann der Apparat auf seinem Gestell befestigt und die Pedalverbindung hergestellt. Das sterile Fläschchen wird in die Glaskappe eingestülpt und bringt sich dadurch selbst in exakte Verbindung mit der Ausflußöffnung. Man läßt nun die Hähne spielen, bis das im Zylinder aufsteigende Serum die Marke (20 ccm) erreicht hat und läßt nun das Pedal los; während jetzt keine neue Flüssigkeit aus dem Behälter mehr nachströmen kann, fließt das abgemessene Quantum in das Fläschchen.

Die Flakons werden mit Gummistopfen verschlossen, die dadurch ein über den Flaschenhals gezogenes Gummihütchen noch besonders gerichtet werden. Mit dem beschriebenen Apparat können bis zu 400 Fläschens pro Stunde fertig gemacht werden.

Trotz aller aseptischen Kautelen bei der Blutentnahme und späteren Verarbeitung des Materials ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß ein oder das andere Fläschchen nicht völlig keimfrei ist. Deshalb wird das abgefüllte Serum einer nochmaligen Sterilisierung unterworfen, indem man die gefüllten Gläschen auf $^3/_4$ Stunden in ein Wasserbad von 56° bringt. Danach wird die Gummikappe entfernt, das Kölbchen mit dem Hals in geschmolzenes Paraffin getaucht und mit einer Zinnkapsel definitiv verschlossen und etikettiert.

Ein ausgezeichnetes Mittel, um Serum, namentlich auch für den Export nach tropischen Gegenden haltbar zu machen, ist die Exsikkation. Das Institut Pasteur hat einen besonderen Exsikkator, der, nach Angaben von Roux, von Prévot und Lévy folgendermaßen konstruiert ist (Fig. 10):

Fig. 10.

Der Apparat besteht aus vier Hauptteilen:

a) einem Metallzylinder von 2 l Inhalt, der durch einen massiven Deckel verschlossen werden kann; die absolut hermetische Abdichtung wird durch einen Kautschukring gewährleistet. Im Deckel befinden sich vier Öffnungen: eine zentrale dient zur Absaugung der Luft; zwei seitliche, durch Glasscheiben verschlossene, gestatten das Innere des Kessels während des Betriebes zu übersehen; die vierte endlich ist mit einem sterilen Wattepfropf und aufschraubbarem Ventil luftdicht abgeschlossen; durch sie

wird das Vakuum im Apparat wieder aufgehoben, wenn die Austrocknung beendet ist;

b) einem Thermostaten, der durch einen Rouxschen Thermoregulator auf 30° eingestellt ist und den sub a) beschriebenen Kessel aufnimmt;

c) einem metallenen Leitungsrohr, das den Kessel an ein System von zwei übereinandergelagerten Zylindern anschließt, in denen konzentrierte Schwefelsäure zirkuliert; sie werden durch eine kleine Pumpe aus Porzellan und Blei gespeist;

d) einer Luftpumpe zur Herstellung des Vakuums.

Der Kessel wird sterilisiert, mit Serum beschickt, die Verbindungen hergestellt und die Luftpumpe in Tätigkeit gesetzt. Das Wasser des Serums verdampft und wird durch die Schwefelsäure kontinuierlich absorbiert, so daß die Austrocknung relativ rasch vor sich geht; in acht Stunden verarbeitet der Apparat gegen 8 l frischen Serums. Nach Beendigung des Verfahrens wird der Apparat steril geöffnet und das Trockenserum in kleine Ampullen abgeteilt, die über der Flamme zugeschmolzen werden*).

---

*) Beim Auflösen von Trockenserum zum Gebrauch ist folgendes zu beachten: Die Spitze der Ampulle wird abgebrochen und nun in das Innere einige Tropfen isotonischer Kochsalzlösung eingebracht, so daß die Wandung des Kölbchens gut befeuchtet ist. Durch Hin- und Herrollen verteilt man die Serumpartikel möglichst gleichmäßig auf dieser feuchten Fläche und läßt sie gut aufquellen. Erst nachdem dies geschehen, wird das nötige Quantum Lösungsmittel zugesetzt und das Serum völlig aufgelöst.

IV.

Darstellung der Antikörper mittels chemischer und physikalischer Methoden.

Von

Dr. Ernst Pribram

in Wien.

Das Wesen der Antikörper und ihre wichtigsten Eigenschaften.

Einteilung.

Die erste Frage, die sich uns bei der Betrachtung über Natur und Wesen der Antikörper aufdrängt, ist die, inwieweit wir berechtigt sind, sie als „Körper" zu bezeichnen. Als Körper in physikalisch-chemischem Sinne bezeichnet man in der Regel räumlich und zeitlich verknüpfte Komplexe von mehreren Eigenschaften. Die Zahl der von den „Antikörpern" (Immunkörpern) bekannten Eigenschaften ist eine sehr beschränkte, und es war hauptsächlich die regelmäßige, gesetzmäßige Koexistenz gewisser Eigenschaften, welche Veranlassung gab, diese große Gruppe unter einem Namen zusammenzufassen. Die wichtigste und auffallendste dieser Eigenschaften, welche unter bestimmten Bedingungen in einem gegebenen Substrat regelmäßig beobachtet werden kann, ist die spezifische Reaktion auf das zugehörige Antigen. Die Bedingungen, unter welchen die genannte Eigenschaft in dem betreffenden Substrate künstlich hervorgerufen, verstärkt, vermindert oder gänzlich zerstört werden kann, gestatten einen Schluß auf weitere Eigenschaften der hypothetischen Körper. Soweit diese Eigenschaften, welche für alle Antikörper eine gewisse Übereinstimmung zeigen, für ihre Darstellung mittels chemischer und physikalischer Methoden von Belang sind, sollen sie im folgenden kurz besprochen werden.

Als allen Antikörpern gemeinsam haben wir die „spezifische Reaktion auf das zugehörige Antigen" bezeichnet. Darin liegt auch gleichzeitig ihr wichtigstes Unterscheidungsmerkmal, die Spezifizität der Reaktion, d. h. die Reaktion tritt bloß bei Verwendung des zugehörigen Antigens ein. Je nach der Art der Herkunft (species) des Anti-

gens ergibt sich eine Einteilung der Antikörper in solche pflanzlichen, bakteriellen, tierischen Ursprungs. Ein anderes Unterscheidungsmerkmal, durch welches wir wieder große Gruppen von Antikörpern voneinander abtrennen können, ist die Art der Reaktion des Antikörpers mit dem Antigen:

1. Aufhebung einer spezifischen Wirkung des Antigens (Neutralisierung einer toxischen, hämotoxischen, fermentativen Wirkung).
2. Niederschlagsbildung:
   a) Ausfällung eines Niederschlages aus einer Lösung (Präzipitation);
   b) Ausflockung suspendierter Partikel aus einer trüben Aufschwemmung (Agglutination, Verklumpung roter Blutkörperchen).
3. Auflösung zelliger Elemente, „Lyse" *) (Bakteriolyse, Cytolyse, Hämolyse).

Bei diesen Einteilungen ist der Begriff „Antikörper" möglichst weit gefaßt, und darf auf alle in der Literatur mit diesem Namen bezeichneten Substanzen Anwendung finden. Sobald wir aber an die Besprechung der einzelnen Eigenschaften der Antikörper herantreten, ergibt sich die Notwendigkeit, darauf hinzuweisen, daß alle eben genannten Reaktionen der Antigene durch eine Reihe chemisch-physikalischer Einflüsse in mehr oder weniger spezifischer Weise gehemmt oder verzögert werden können, was häufig zur Annahme von „Antikörpern" Veranlassung gibt, die in einzelnen Eigenschaften von den Antikörpern im engeren Sinne (Immunkörpern) abweichen. Als Immunkörper oder Antikörper (*κατ' ἐξοχήν*) bezeichnen wir diejenigen, welche durch Einverleibung eines Antigens in einem Tierkörper („Immunisierung") entstehen oder in ihrer Intensität gesteigert werden.

1. Antikörper im engeren Sinne (Immunantikörper).

Bedingungen, unter welchen die Immunantikörper entstehen. Soweit unsere bisherigen Erfahrungen reichen, entstehen diese Antikörper ausschließlich im lebenden tierischen Organismus, dem man auf irgend eine Weise (subkutane, perkutane, intraperitoneale, subdurale, intravenöse, intraparenchymatöse Injektion, Darreichung per os oder per rectum, ein Antigen einverleibt hat. Als Antigene eignen sich einzig und allein organische Bestandteile oder Produkte organisierter Lebewesen (Pflanzen oder Tiere). Eine einmalige Einverleibung des Antigens genügt in der Regel zur Hervorrufung der Antikörperbildung, durch Wiederholung derselben gelingt es, sie zu außerordentlich hohen Graden zu steigern. In welcher Weise die Einverleibung in jedem Falle verläuft, darüber wird in den einzelnen Kapiteln dieses Handbuches so ausführlich referiert, daß es genügen mag, zu bemerken, daß der Antikörpergehalt der tierischen Gewebsflüssigkeiten in der Regel 8—10 Tage nach Einbringung des Antigens in den Organismus den Höhepunkt erreicht, und dann anfangs rascher, später langsamer abnimmt.

---

*) Zum Austritt von Blutfarbstoff, „Hämolyse" im weiteren Sinne genügt bereits eine Veränderung der Stromata, die nicht immer einer Auflösung gleichkommt; bei der Hämolyse durch Serum fremder Tierarten (Immunhämolysine) scheint letzteres stets der Fall zu sein.

Bedingungen unter welchen die Antikörper zerstört werden.

Fast alle Eingriffe chemischer oder physikalischer Natur, welche imstande sind, das Eiweiß des organischen Mediums, in welchem die Antikörper gewonnen werden, zu zerstören, berauben das Medium auch seiner Fähigkeit, auf das entsprechende Antigen in spezifischer Weise zu reagieren. Gegen höhere Temperaturen (60—70°) sind die meisten Antikörper ziemlich widerstandsfähig, einzelne davon, („komplexe“ Antikörper), verlieren zwar ihre Wirksamkeit, können aber durch Zusatz frischen, normalen Serums aktiviert werden: es wird also durch die Erwärmung nur ein Teil des Antikörpers, (thermolabiles Komplement), unwirksam. Hohe Temperaturen (100°) vernichten die Antikörperwirkung. — Einwirkung von verdünnten Säuren und Alkalien schädigen bei niedriger Temperatur (bis 37°) die Antikörper gar nicht, (vor Anstellung der Reaktion muß natürlich neutralisiert werden!) während saure Reaktion bei höheren Temperaturen (60°, eine Stunde) oder nach längerer Zeit (3 Tage bei 37°) von den meisten Antikörpern schlecht vertragen wird. Starke Säuren und fixe Alkalien vernichten die Antikörperwirkung (Winterberg, Jakoby, Pick, Brieger und Krause u. a.). Ähnlich wie fixe Alkalien, jedoch schwächer als diese, wirken nach Spiro Harnstoff und Amide auf Eiweißkörper ein. Ganz analog verhalten sie sich nach Pick den Immunkörpern gegenüber, die sie nach langdauernder Einwirkung (bei 37°) vernichten, während sie die Reaktion des Antikörpers mit seinem Antigen durch ihre bloße Gegenwart (bei gleichzeitigem Zusatz) nicht oder wenig beeinflussen. Nur konzentrierte Harnstofflösungen erwiesen sich als störend, doch fiel die hemmende Wirkung bei Anstellung der Reaktion mit höheren Verdünnungen weg. Ähnlich wie Harnstoff verhält sich Schwefelharnstoff. Glykokoll und Orthonitrophenol haben nach Pick (auf die Agglutinine des Immunserums) keinen schädigenden Einfluß. Formaldehyd, das die Eiweißkörper inkoagulabel macht (Blum, Schwarz), vernichtet unmittelbar nach seinem Zusatz zum immunkörperhaltigen Serum dessen Wirkung. Pick erinnert hier an die Wirkung des Harnstoffes auf Eiweißkörper, welche der des Aldehyds insofern ähnelt, als es in minderen Konzentrationen den Koagulationspunkt des Eiweißes in die Höhe treibt, bei höherer Konzentration die Gerinnung verhindert (Spiro). Durch Alkohol werden die meisten Antikörper (Antitoxin, Agglutinin) gefällt, und bei langdauernder Einwirkung abgeschwächt oder zerstört (Winterberg). Gegen Äther scheinen viele Antikörper resistenter zu sein, als man bisher anzunehmen geneigt war. Die Globulinfällung eines Diphtherieantitoxin enthaltenden Pferdeserums erwies sich nach langdauerndem Schütteln mit Äther ebenso wirksam wie zuvor (eigener Versuch). Das gleiche gilt vom Tetanusantitoxin, wie aus (nicht publizierten) Versuchen von E. P. Pick und Schwarz hervorgeht. Auch kann ich eine Angabe von Pfeiffer und Proskauer nicht bestätigen, welche dahin lautet, daß bakteriolytisches Immunserum durch Äther seine Wirksamkeit einbüße. Ein Choleraimmunserum (Pferd) wurde ca. 10 Stunden lang mit Äther geschüttelt, ohne in seiner Wirkung im geringsten beeinträchtigt zu werden:

1. Bestimmung des Titers eines Choleraimmunserums (Pferd Gisela): Eine Öse Cholerakultur (Chol. Pfeiffer) in 1 ccm Bouillon aufgeschwemmt, dazu 0,005 ccm Immunserum, auf 2 ccm mit NaCl-Lösung aufgefüllt, einem Meerschweinchen (210 g) intraperitoneal injiziert.

Exsudatentnahme nach 5 Minuten: reichliche, stark lichtbrechende Kügelchen, einzelne Bakterien. — Das Tier überlebt.

Bei der Prüfungsdosis 0,001 ccm Immunserum, Exsudatentnahme nach 15 Minuten: zahlreiche Cholerabazillen, lebhaft beweglich, Tier am nächsten Morgen tot (nach heftigen Diarrhöen).

2. Dasselbe Serum (Gisela) 10 Stunden auf der Schüttelmaschine mit gleicher Menge Äther (50 ccm) geschüttelt; nach Entfernung des Äthers Auswertung in gleicher Weise wie 1.

Bei Prüfungsdosis: 0,005 ccm Immunserum und Exsudatentnahme nach 15 Minuten. Derselbe Befund wie oben. Das Tier überlebt.

Auch gegen Chloroform scheinen einzelne Antitoxine sehr resistent zu sein. Brieger und Cohn benützten bekanntlich das „Schlemmen" in Chloroform zur Reinigung des Diphtherie- und Tetanusantitoxins. Die Resistenz gegen Karbolsäure ist allgemein bekannt.

Gegen Pepsin-, Trypsin-, Papayotinverdauung sind Agglutinine resistent (Winterberg), ebenso Präzipitine gegen Trypsinverdauung, während sie durch Pepsin bereits nach kurzer Einwirkung zerstört werden. (Obermayer und Pick.) Antitoxine gehen bei der Verdauung zugrunde. Bakteriolysine werden durch Pepsinverdauung allmählich zerstört (Pfeiffer und Proskauer).

2. Antikörper im weiteren Sinne.

Es wurde bereits auseinandergesetzt, daß der Begriff der Antikörper oft sehr weit gefaßt wird, ohne daß wir imstande sind, ihm ganz bestimmte Grenzen anzuweisen, namentlich deshalb, weil wir nicht wissen, welchen Bestandteilen des Substrates die Antigen hemmende Eigenschaft zukommt. Die Tatsache, daß normales Serum in höheren Konzentrationen angewendet, in ähnlicher Weise wie kleine Mengen antikörperhaltigen Immunserums auf viele, ja die meisten Antigene wirkt, legt die Annahme nahe, daß es sich hier nur um graduelle, nicht qualitative Differenzen handelt. Auch eine gewisse Spezifität in der Wirkung normaler Sera (gegen Hämolysin z. B.) läßt sich nicht in Abrede stellen. Eine ganz besonders eingehende Untersuchung hat die Aufhebung fermentativer Wirkungen durch Serum und Organextrakte erfahren (Weinland), weil ihr mit Recht die Regulierung der intravitalen Fermentwirkungen zugeschrieben wird (Matthes, Hahn u. a.). Schließlich sind auch aus pflanzlichen Organen eigenartige fermenthemmende Extrakte gewonnen und mit dem Namen „Antiferment" bezeichnet worden (Czapek). Auf die methodische Darstellung all dieser antifermentähnlichen Substanzen kommen wir noch ausführlich zurück.

I. Darstellung der Antitoxine und Antifermente mit chemischen und physikalischen Methoden.

Das Bestreben, näheres über die Natur der Antikörper zu erfahren, hat frühzeitig dazu geführt, chemische und physikalische Methoden zu ihrer Isolierung aus den Medien, in denen sie gewonnen waren, anzuwenden, und da diese Medien durchweg eiweißreiche Körperflüssigkeiten sind, war man naturgemäß auf jene Methoden angewiesen, welche zur Isolierung und Differenzierung der einzelnen Eiweißkörper dienen. Da, wie eben erörtert wurde, die Denaturierung der Eiweißkörper in der Regel eine Vernichtung

der gesuchten hypothetischen Antikörper zur Folge hat, geht die, nicht bloß theoretisch, sondern auch praktisch wichtige Konzentrierung der Antikörper Hand in Hand mit der Konzentrierung und Differenzierung der Eiweiskörper. Wir haben also zunächst jene Methoden zu besprechen, welche den genannten Zweck verfolgen, und gehen dabei von den Eiweißkörpern des Blutserums aus, weil es dasjenige Medium repräsentiert, aus dem die Antikörper am häufigsten gewonnen werden.

Unter den Eiweißstoffen, welche die Hauptmasse der organischen Substanzen des Serums ausmachen, sind zwei große Gruppen zu unterscheiden: die Albumine und Globuline. Das frühere Unterscheidungsmerkmal, daß die ersteren in Wasser löslich, die letzteren unlöslich in Wasser, dagegen löslich in verdünnter Neutralsalzlösung (NaCl) sind, ließ sich später nicht mehr aufrecht erhalten. Auf der genannten Eigenschaft beruht die älteste Methode der Trennung der beiden Eiweißkörper durch Dialyse (Panum)*). Wie sich später herausstellte, läßt sich durch Dialyse des Serums nicht das gesamte Globulin ausfällen, dagegen fand Hammarsten im Magnesiumsulfat ein Mittel zur vollständigen Ausfällung eines Eiweißkörpers von Globulincharakter, charakterisiert durch eine bestimmte Gerinnungstemperatur, konstante elementare Zusammensetzung, bestimmtes spezifisches Drehungsvermögen, der den größeren Teil (ca. 63 %) des Gesamteiweißes des Serums (Pferd) ausmacht. Derselbe Eiweißkörper, der durch Sättigung mit Magnesiumsulfat ausgefällt wird, läßt sich aus dem Serum durch Halbsättigung mit Ammonsulfat darstellen. Diese Methode wurde von Hofmeister in die Eiweißchemie eingeführt und von seinen Schülern (Kauder und Pohl) weiter ausgearbeitet. Sie erwies sich namentlich deshalb als fruchtbringend, weil sie sich zur quantitativen Aussalzung des Globulins sehr gut eignet. Hatte man auch in den Aussalzungsmethoden ein Verfahren, um Albumin und Globulin mit Sicherheit von einander zu trennen, so war damit die Einheitlichkeit namentlich des letzteren Körpers noch nicht bewiesen, vielmehr lag gerade in der Tatsache, daß die verschiedenen Fraktionen durch Dialyse, sowie bei Sättigung mit NaCl verschieden leicht fällbar sind, ein Hinweis darauf, daß man es nicht mit einheitlichen Substanzen, sondern mit Gemengen zu tun hatte (Burckhardt, Marcus). Reye gelang es denn auch, eine Globulinfraktion (Fibringlobulin) vom übrigen Serumglobulin durch fraktionierte Aussalzung mit Ammonsulfat (Sättigung von 21,5 %) zu trennen, welche aber weder mit dem löslichen, noch mit dem unlöslichen Globulin identisch war. Da die weiteren erfolgreichen Untersuchungen zur Unterscheidung der Globuline vielfach von dem Bestreben diktiert waren, auf diese Weise gleichzeitig Immunkörper zu isolieren, sei es gestattet, hier in einem kurzen Überblick einzuschalten, wie sehr die sog. Aussalzungsmethoden die Kenntnis der chemischen Natur jenes Substrates gefördert haben, welches als Träger der für die Antikörper chrakteristischen Reaktionen betrachtet werden muß.

Die erste Angabe, daß beim Aussalzen des Serums (mit Magnesiumsulfat) das Antitoxin mit dem Globulin ausfällt, rührt von Tizzoni her (1891), andere Autoren, so Emmerich und Tsuboi, welche das Globulin durch Einleiten von CO_2 darstellten, desgleichen Dieudonné und Belfanti und Carbone fanden hingegen kein Antitoxin im Niederschlag. Die letzteren beiden Autoren, ebenso Smirnow u. a. konnten gleichzeitig

*) Ein ausführliches Referat über die Eiweißstoffe des Blutserums s. bei Hammarsten (Asher und Spiro, Ergebnisse der Physiologie).

Tizzonis Angabe bestätigen, und durch die Arbeiten von Brieger und Ehrlich, Freund und Sternberg, Seng, Ide und Lemaire und die bereits erwähnte von Marcus wurde gezeigt, daß die mit den verschiedenen Methoden erhaltenen Globuline nicht identisch sind. Hier setzten nun jene Arbeiten ein, welche den Antitoxingehalt der gefällten Eiweißfraktionen als Unterscheidungsmerkmal zwischen den einzelnen Globulinfraktionen benützten, in erster Reihe die Arbeiten von E. P. Pick, dem es gelang, auf diese Weise zwei Serumglobuline von einander mittels fraktionierter Aussalzung zu trennen. Fast gleichzeitige Untersuchungen von Fuld und Spiro, und von Rostoski mit anderen Immunkörpern waren von ähnlichen Erfolgen begleitet, während Reye in seiner oben erwähnten Arbeit, sowie Brodie und Atkinson, die gleich Pick den unwirksamen Teil des Globulins durch Salzfällung zu entfernen gesucht hatten, deshalb zu keinem Resultate gelangt waren, weil die Fällungsgrenzen der einzelnen Fraktionen in einander übergreifen, sich daher ohne das erwähnte Kriterium nicht scharf fassen ließen. Die durch Picks Fraktionierung von einer getrennten Globuline sind übrigens, wie Freund und Joachim zeigten, nicht mit jenen Fraktionen identisch, welche durch Dialyse von einander getrennt werden können, vielmehr läßt sich jedes der Globuline in ein wasserlösliches und ein wasserunlösliches trennen, so daß man nach diesen Autoren vier Serumglobulinfraktionen unterscheiden kann, Schließlich konnten Porges und Spiro durch Aussalzung noch eine weitere Fraktion, also im Ganzen drei Serumglobuline ausfällen.

Fällungsmittel: Da das Wesentliche des Vorganges der Aussalzung darin besteht, daß einer Lösung Wasser entzogen wird, und zwar wahrscheinlich durch eine Bindung des Wassers durch Salzionen, eignen sich zur Aussalzung am besten jene Salze, welche zur Hydratbildung neigen (unter Wasseraufnahme krystallisieren): also in erster Linie die Sulfate. Aber auch diese zeigen untereinander ganz erhebliche Unterschiede in ihrer Verwendbarkeit für die Aussalzung des Globulins, was zum Teil auf Differenzen in den Fällungsgrenzen, zum Teil auch auf anderen physikalischen und chemischen Eigentümlichkeiten der Fällungsmittel beruht. — Die Fällungsgrenzen für Ammonsulfat werden in folgender Weise angegeben: Bei einem Gehalte von 21,5 % festen Ammonsulfats fällt aus normalem Serum (Pferdeserum) das Fibringlobulin (Reye) aus; im Filtrat trennte Pick durch fraktionierten Zusatz von Ammonsulfat abermals zwei Fraktionen, von welchen die eine („Fraktion II") bei einem Gehalte von 25,6 % festen Ammonsulfats, die andere („Fraktion III") bei einem Gehalte von 38 % ausgeschieden wird. Das Filtrat von dieser dritten Fraktion enthält bloß Serumalbumine. Ähnlich sind die Fällungsgrenzen, welche Fuld und Spiro angeben. Sie nennen den leichter fällbaren, in der zweiten Fraktion ausgesalzenen Körper nach dem Vorschlage von Hofmeister „Euglobulin", den bei Halbsättigung (dritten Fraktion) ausfallenden „Pseudoglobulin". Die Fällungsgrenzen dieser beiden Fraktionen sind, wie bereits Pick zeigte, nicht scharf, und Porges und Spiro, welche als Fällungsgrenzen ihrer drei Fraktionen: 28—36, 33—42, 40—46 % gesättigter Ammonsulfatlösung angeben, zeigten, daß die oberen Grenzen konstanter sind als die unteren. Man muß deshalb die Ausgangslösung verdünnen, und gelangt auch besser zum Ziele, wenn man die einzelnen Fraktionen nicht nacheinander (aus dem Filtrat), sondern auf einmal direkt aus dem Ausgangserum gewinnt („Simultanfällung"). Die Verdünnung der Ausgangs-

lösung ist auch deshalb zu empfehlen, weil die Einwirkung von Ammonsulfat auf konzentriertes Eiweiß nicht ganz gleichgiltig ist, da es Ammoniak aus Eiweiß abspaltet (Brunner und Pinkus). Andererseits ist die Verdünnung des Serums nicht ohne Einfluß, da bei starker Verdünnung der Eiweißlösung zur vollkommenen Fällung eine größere Menge Ammonsulfat notwendig ist als zur einfachen Absättigung des Wassers erforderlich wäre (Popplewell-Bloxham). Auch Brunner und Pinkus fanden, daß die zur Ausfällung des Eiweißes erforderliche Menge Ammonsulfat mit der Verdünnung der Lösung in Form einer Kurve ansteigt, die nach ihren Angaben übrigens nicht regelmäßig verläuft.

Dem Ammonsulfat am nächsten steht bezüglich der Aussalzungsgrenzen der Eiweißkörper das Natriumsulfat. Es wird überall dort an seine Stelle treten, wo Stickstoffbestimmungen der Eiweißkörper angestellt werden sollen. Es unterscheidet sich vom Ammonsulfat vor allem durch seine Löslichkeitsverhältnisse. Das Maximum seiner Löslichkeit (55 %) erreicht es bei 34°, bei 18° sind nur 16,8 %, bei 6° . . . 7 %, bei 0° . . . 5 % des Salzes in Wasser löslich. Auch das Natriumsulfat verhält sich verdünnten und konzentrierten Lösungen gegenüber nicht gleich; so werden z. B von Brunner und Pinkus die Fällungsgrenzen bei einer Verdünnung des Pferdeserums von 1:5 in folgender Weise angegeben.

Vollkommene Fällung des Fibrinogens	14,0 %
Globulinfällung	18,8 %
Albuminfällung	37,5 %
Bei einer Verdünnung von 1:10:	
Globulinfällung	20,0 %
Albuminfällung	39,0 %

Doch verläuft die Kurve nach Angabe der genannten Autoren flacher und regelmäßiger als die bei Anwendung von Ammonsulfat. Das Natriumsulfat ist außerdem ein billiges, und leicht rein wieder gewinnbares Material, das selbst empfindlichere Fermente nnd Toxine in ihren physiologischen und chemischen Eigenschaften nicht verändert.

Das Magnesiumsulfat war das erste Salz, das, wie erwähnt, von Hammarsten zur Aussalzung von Globulin verwendet wurde, und das von Tizzoni, nach ihm von Brieger und Ehrlich zur Ausfällung von Immunkörpern (aus Serum, Milch) benutzt wurde. Diese Autoren geben an, daß die Ausfällung des Antitoxins mit den Globulinen am besten bei 30—37° erzielt wird. Das Magnesiumsulfat eignet sich übrigens recht gut zur Fraktionierung, da seine Fällungsgrenzen für die Eiweißfraktionen sehr weit auseinander liegen (vgl. Tabelle 2, pag. 87). Den beiden erstgenannten Salzen gegenüber hat es den Nachteil, daß es erst bei Ganzsättigung das Globulin quantitativ ausfällt, weswegen es zur praktischen Antitoxingewinnung nicht sehr geeignet erscheint.

Von den Sulfaten ist schließlich das Zinksulfat und das Kupfersulfat zur Ausfällung der Immunkörper (Tetanusantitoxin, Diphtherieantitoxin) verwendet worden (Brieger und Boer). Da sie aber nach Angabe der genannten Autoren eine chemische Verbindung mit dem Antitoxin eingehen und ihre Anwendung ein komplizierteres Verfahren erfordert, sollen sie in der Besprechung der Fällungsmethoden einen eigenen Platz einnehmen.

Natrium- und Kaliumacetat fällen das Serumglobulin nur unvollständig aus, und zwar fällen sie, wie die Übersichttabelle (auf pag. 87 dieses Referates), aus der Arbeit von Porges und Spiro entnommen,

zeigt, das Pseudoglobulin nur unvollständig und erst nach längerem Stehen aus. Die Fällungsgrenzen sind hier unscharf. Aus der Tabelle geht auch hervor, daß Natriumnitrat, Kaliumchlorid und Natriumchlorid überhaupt nur die erste Fraktion (aus verdünnten Lösungen) vollständig aussalzen. (Freund und Joachim, Porges und Spiro.) — Die Ausfällung mittels Quecksilberchlorid wurde in Kombination mit anderen Salzen (NaCl) angewendet, und soll deshalb später Erwähnung finden. Zinkchlorid nimmt eine ähnliche Ausnahmestellung ein wie Zinksulfat. —

Durch geeignete Kombination zweier Salze läßt sich zuweilen eine noch stärkere Konzentration des Immunkörpergehaltes erzielen, als bei Verwendung eines einzigen, so durch NaCl und $MgSO_4$, NaCl und $HgCl_2$ (Brieger und Boer, Astros und Rietsch); Atkinson sättigte umgekehrt mit NaCl einen Serumglobulinniederschlag, der mit $MgSO_4$ gewonnen war. Es gelang ihm, durch nachträgliche Anwendung höherer Temperaturen das Globulin in zwei Fraktionen zu trennen, welche aber beide Antitoxin enthielten, und zwar ungefähr in einer den Niederschlagsmengen proportionalen Quantität. Brieger und Boer verwendeten neutrales Bleiacetat, das sie mit einer Spur Ammoniak in recht verdünnter Lösung zu Immunserum zusetzen. Auf diese Weise fällten sie den größten Teil des Eiweißes aus, und erhielten das Antitoxin quantitativ im Filtrat, aus dem sie es mit Ammonsulfat aussalzten. Das Bleiacetat eignet sich praktisch deshalb wenig zum Fällungsmittel, weil bei geringem Überschuß der Reagentien die Fällungsverhältnisse sich ändern. Recht zweckentsprechend, aber nur für verdünnte Lösungen anwendbar erscheint die Verwendung von Kalialaun (Freund und Sternberg), das anderen Reagentien gegenüber den großen Vorteil hat, ähnlich wie Bleiacetat jene Eiweißkörper zuerst auszufällen, welche den Immunkörper nicht enthalten, während das Globulin in Lösung bleibt. Bei Anwendung einer 5%igen Lösung setzt man ein Drittel des Volumens der Ausgangsflüssigkeit zu und erhält auf diese Weise einen voluminösen Niederschlag, aus dessen Filtrat der Immunkörper ausgesalzen wird. Endlich ist noch das Eigenartige, von Brieger und Boer beschriebene Verhalten zweier Salze zu erwähnen, welche bei gleichzeitiger, längerer Einwirkung (bei 30—37° C) die Immunkörper (Antitoxin) aus Blutserum oder aus der Milch quantitativ ausfällen, während jedes für sich auch in der Wärme kaum Spuren auszufällen vermag: NaCl und KCl oder JK. Die Details der Methode sollen später besprochen werden.

Außer Salzen wurden als Fällungsmittel auch Metallhydroxyde verwendet, die das Eiweiß samt dem Antitoxin ausfällen. Aronson erzeugte im Serum anorganische kolloidale Niederschläge, so z. B. von Aluminiumhydroxyd durch Zusatz von Aluminiumsulfat und Ammoniak, oder von Ferrozyankali und Zinksulfat, von Eisenhydroxyd durch Zusatz von Eisen und Alkali.

Ausführung der Konzentrierung der Antitoxine:

Es ist bei der großen Zahl der beschriebenen Methoden unmöglich, die Details jeder einzelnen hier wiederzugeben, und es genügt wohl auch, bestimmte Typen herauszuheben, da sich kleinere Modifikationen aus dem über die Natur der Fällungsmittel Gesagten von selbst ergeben. Als die wohl am meisten verwendete Methode soll die Fällung mit Ammonsulfat zunächst eingehend beschrieben werden. Hier, wie bei allen Methoden, kommt es natürlich auf den Endzweck an, den man verfolgt.

Will man eine möglichst weitgehende Konzentrierung erzielen, so wird man das Ausgangsmaterial stark verdünnen, weil dann die Fällungsgrenzen, wie erwähnt, weiter auseinanderliegen. Andererseits wird man darauf verzichten müssen, wo man sehr große Mengen von Serum zu verarbeiten hat, und man auf besondere Reinheit der einzelnen Eiweißfraktionen kein Gewicht legt, also bei der Konzentrierung von Serum zu technischen Zwecken. Das Ausgangsmaterial wird mit dem halben Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, der Niederschlag (Euglobulin) abfiltriert, das Filtrat samt Waschwasser abgemessen und durch Hinzufügen von einem Drittel Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung auf halbe Sättigung gebracht. Die Ammonsulfatlösung stellt man sich her, indem man 770 g Ammonsulfat in 1 l heißen Wassers einträgt und abkühlen läßt. Der aus dem Serum durch Aussalzen gewonnene Niederschlag (Pseudoglobulin) wird gewaschen und, nachdem das Waschwasser vollständig abgetropft ist, samt dem Filter aus dem Trichter gehoben und auf einer Tonplatte oder auf Filtrierpapier ausgebreitet. Dann faltet man das Filter in der Mitte zusammen und bedeckt es, ohne zu pressen, mit einer dicken Lage Filtrierpapier, das man so oft wechselt, bis die unterste Lage einigermaßen trocken bleibt. Nun öffnet man das zusammengefaltete Filter vorsichtig und trachtet den Niederschlag auf einer Seite zu sammeln, was um so leichter gelingt, je besser man ihn getrocknet hat, faltet abermals das Filter und achtet darauf, daß der Niederschlag möglichst an einer Stelle klebt, auf welcher auch die Reste des an anderen Stellen haftenden Niederschlages durch wiederholtes Andrücken gesammelt werden. So gelingt es mit einiger Ausdauer, den Niederschlag fast quantitativ zu erhalten und schließlich von seiner Unterlage abzuheben. Er kann nun entweder bei 37° getrocknet werden oder man löst ihn sofort in soviel Wasser, als dem Ausgangsserum entspricht. Mit dieser Lösung werden dann die der Natur des Ausgangsmateriales entsprechenden spezifischen Reaktionen vorgenommen (Agglutination, Präzipitation, Prüfung auf Antitoxingehalt usw.), deren Ausführung in den betreffenden Kapiteln dieses Handbuches nachzusehen ist. Pick, der ausführliche Untersuchungen in dieser Richtung mit den einzelnen Immunkörpern vorgenommen hat, findet folgende Verteilung verschiedener Immunkörper im Blutserum differenter Tiergattungen (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1.

Immunkörper	Fibrio-globulin	Euglobulin	Pseudo-globulin	Albumin
Diphtherieantitoxin	0	Ziege	Pferd	0
Tetanusantitoxin	0	(Ziegenmilch ?) (Ehrlich und Brieger)	„	0
Choleralysine (Pfeiffer)	0	Ziege	0	0
Typhusagglutinine	0	Ziege, Kaninchen, Meerschweinchen	Pferd	0
Choleraagglutinine	0	Pferd, Ziege	0	0

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß das Fibringlobulin überhaupt keine Immunkörper enthält, daß das Pseudoglobulin des Pferdeserums das gesamte, oder wenigstens die Hauptmenge des Diphtherieantitoxins und der Pfeifferschen Choleralysine, das Euglobulin des Pferdeserums

hingegen die Choleraagglutinine enthält. Die Verteilung im Ziegenserum und wohl auch in der Ziegenmilch ist anders, als die bei der erstgenannten Tiergattung, indem dort alle gesuchten Antikörper in der Euglobulinfraktion gefunden wurden, während die Pseudoglobulinfraktion keinen einzigen enthielt. Spätere, unter PICKS Leitung angestellte Untersuchungen von O. PORGES und E. PRIBRAM haben in (nicht publizierten) Versuchen gezeigt, daß das beschriebene Verhalten nicht konstant ist, sondern auch bei ein und derselben Tierart, ja sogar bei ein und demselben Serum nach längerer Aufbewahrung Schwankungen unterworfen ist. Diese Tatsachen scheinen die neuesten Untersuchungen von VAN DE VELDE zu bestätigen, der findet, daß die Verteilung der Eiweißfraktionen in frischem und längere Zeit aufbewahrten Serum eine verschiedene ist. Da dieser Autor Antiseptica zusetzte, bedürfen seine Untersuchungen einer Bestätigung bei Verwendung steriler Flüssigkeiten (Serum, Milch)*). Die richtige Beobachtung von GIBSON und COLLINS, daß der Immunkörper einmal im Euglobulin, ein andermal im Pseudoglobulin gefunden werden kann, beruht demnach wahrscheinlich auf der oben erwähnten Verschiebung der Eiweißfraktionen. Eine namentlich für Konzentrierung großer Serummengen (von Diphtherieantitoxin) zu technischen Zwecken sehr rationelle Methode ist die kürzlich von BRUNNER und PINKUS ausgearbeitete Fällung mittels Natriumsulfat**). BRUNNER und PINKUS, die ein ziemlich hochwertiges Serum konzentrieren, empfehlen, um Verluste zu vermeiden, eine Verdünnung des Ausgangsserums auf das halbe Volumen. Ist das Ausgangserum minderwertig (unter 150 I. E. in 1 ccm), so kann man das unverdünnte Serum verarbeiten, und am Schlusse, nach der Konzentrierung, mit einem anderen minderwertigen Serum verdünnen. Vor Beginn der Operationen wird alles Material: Serum, wasserfreies Salz und geräumige Trichter auf 37° angewärmt, da sich das Salz bei dieser Temperatur leicht löst. Nun fügt man (bei 37°) zu je einem Gewichtsteil Serum den dritten Teil verwitterten Natriumsulfats, schüttelt gut um und läßt 24 Stunden im Brutschrank stehen. Das Salz löst sich leicht, es fällt ein reichlicher Niederschlag aus, der bei 37° abfiltriert wird. Der Niederschlag wird, solange er noch feucht ist, mitsamt dem Trichter in einen Eisschrank oder Kühlraum gebracht und bei einer Temperatur von höchstens 6° C mit einigen Krystallen Glaubersalz geimpft. In kürzester Zeit schießen nun allenthalben im Niederschlage Krystalle an, und in dem Maße, als hierdurch die Lösung salzärmer wird, geht der Eiweißniederschlag in Lösung und fließt in dicken Tropfen ab. Das, wie erwähnt, sehr visköse, aber nicht sehr salzreiche Filtrat enthält das auf das dreifache konzentrierte Antitoxin. Durch Auswaschen der Krystalle mit eiskaltem Wasser kann man noch einen Teil des zurückgehaltenen Antitoxins wiedergewinnen, doch verzichtet man, namentlich wenn man im Großen arbeitet, auf diese verhältnismäßig unbedeutenden Verluste. Bei Anwendung der auf pag. 340 ds. Handbuches (I. Teil) abgebildeten Filteranlage kann man vollkommen steril arbeiten,

---

*) Mit Untersuchungen über die Verteilung der Eiweißfraktionen und Immunkörper in den einzelnen Eiweißfraktionen in ein und demselben Serum nach verschieden langer Aufbewahrung bin ich derzeit mit Dr. v. EISLER beschäftigt.

**) Diese Methode, welche ich im hiesigen k. k. serotherapeutischen Institute mit Herrn H. BERGER überprüft habe, erwies sich namentlich als sehr brauchbar zur Konzentrierung minderwertiger Sera (auf das dreifache des ursprünglichen Wertes). Da man eine ziemlich visköse Flüssigkeit erhält, empfielt es sich, nur einen Teil des minderwertigen Serums auf die angegebene Weise zu konzentrieren und zum anderen Teil hinzuzufügen, wodurch man ein Serum von mittlerem Werte und normaler Beschaffenheit erzielt.

wobei der hohe Salzgehalt des Niederschlages sehr günstig ist, so daß fast nur auf sterile Behandlung des letzten Filtrates streng zu achten ist. Handelt es sich um Konzentrierung von Diphtherieantitoxin, so kann man noch nachträglich das gewonnene Filtrat karbolisieren. Bei Verwendung sehr großer Serummengen und sehr großer Trichter, muß auf eine entsprechende Durchkühlung der letzteren geachtet werden, da sonst die Filtration sehr lange Zeit in Anspruch nimmt. Wir verwenden zu diesem Zwecke einen eigens konstruierten Eiskasten.

Von den oben erwähnten Fällungsmitteln bedürfen noch die Zinksalze einer eigenen Besprechung. Brieger und Boer fällen das Serum mit einer 1 %igen Lösung von Zinksulfat oder Zinkchlorid, waschen dann mit wenig Wasser nach und lösen den Niederschlag in schwach alkalischem Wasser (1 Tropfen NaOH zu 20 ccm). Durch Einleiten von Kohlensäure wird bei Verwendung von Zinksulfat als Fällungsmittel das Antitoxin im Niederschlag gewonnen, hat man Zinkchlorid benützt, so bleibt das Antitoxin in Lösung. Der das Antitoxin enthaltende Anteil wird dann im Exsikkator getrocknet und in Wasser gelöst. Das Antitoxin geht dabei nicht in Lösung, kann abfiltriert werden und wird nun in Kochsalzlösung oder in schwachen Alkalien aufgenommen. Durch weiteres Einleiten von Kohlensäure kann bei Verwendung von Zinkchlorid der größte Teil des Zinks eliminiert werden. Die Methode ist nach Astros und Rietsch nicht sehr leistungsfähig.

Bei der kombinierten Aussalzung mit Kaliumchlorid oder Jodkali und Natriumchlorid verfahren Brieger und Boer folgendermaßen: Das Serum wird auf die Hälfte mit Wasser verdünnt, in der Mischung 20 % KCl (oder JK) gelöst, und mit ebensoviel fein zerriebenem NaCl kräftig durchgeschüttelt. Bei 37° Wärme erhält man im Laufe von 18—20 Stunden einen reichlichen Niederschlag, der nach dem Trocknen im Exsikkator in 10 ccm Wasser gelöst und mit dem gleichen Volumen $MgSO_4$ (bei 37°) gefällt und in der Wärme filtriert wird. Der Niederschlag wird zweckmäßig nach der Methode von Brieger und Cohn mit Chloroform geschlemmt und getrocknet. Aus 10 ccm Serum erhält man auf diese Weise ca. 0,2 g Trockenrückstand, aus 1 l Milch ca. 1 g. Astros und Rietsch verdünnen das Ausgangsmaterial auf das 5fache und machen einen Zusatz von 0,5 % Phenol.

Die Darstellungs- und Konzentrierungsmethoden der Antihämotoxine decken sich mit jenen der übrigen Antitoxine. Das Antihämotoxin fällt gleich jenen mit dem Globulin, und zwar der größte Teil mit dem Euglobulin. Aus dem Tetanusantihämotoxin läßt sich außerdem ein Teil der wirksamen Substanz mit Äther extrahieren (v. Eisler). Bemerkenswert scheint der bisher wenig beachtete Befund dieses Autors, daß man auch aus dem Albumin des Serums das an und für sich die Hämolyse durch Tetanushämotoxin gar nicht hemmt, durch Behandlung mit Äther einen derartig wirkenden Bestandteil isolieren kann. Ich glaube nicht fehlzugehen, wenn ich annehme, daß hierbei eine Albuminlipoidverbindung gespalten wird, die an sich unwirksam ist. In dem Kapitel über Antihämotoxine werde ich ausführlicher auf die Einzelheiten eingehen. (Vgl. dazu auch die später zu besprechenden Versuche von E. P. Pick und E. Pribram über die antitryptische Wirkung des Serums, pag. 85.)

Antifermente.

Es wurde bereits in der Einleitung hervorgehoben, daß gerade die Fermentwirkungen durch zahlreiche Einflüsse chemischer und physikalischer

Natur gehemmt oder aufgehoben werden können, ohne daß wir über die Art dieser Wirkung Rechenschaft geben können, ob Bindung („Ablenkung"), ob Zerstörung des Fermentes, ob Veränderung des Mediums, etwa durch Änderung der Lösungs- oder Adsorptionsverhältnisse die Reaktion des Ferments auf sein Angriffsobjekt stören. Wenn trotzdem eine kurze Besprechung der physikalisch-chemischen Methoden zur Darstellung der Antifermente (im weiteren Sinne des Wortes) hier eingeschaltet werden soll, so mag dies damit begründet werden, daß die Methoden zum Teil von jenen erheblich abweichen, welche für die Darstellung der Antitoxine und Antifermente (im engeren Sinne) gelten. Naturgemäß war es der Antifermentgehalt jener Substrate, an welchen die Fermentwirkung geprüft wurde, der den Untersuchern besonders auffiel (Milch: Pekelhaaring u. a., Serum: Fermi und Pernossi, Hammarsten u. a.), und zur Analyse zwecks näheren Studiums der antifermentativen Eigenschaften ihrer Komponenten herausforderte (Pekelhaaring, Röden, Fuld und Spiro, Landsteiner, Glaessner).

Antiferment gegen Lab.

Die ersten Versuche, über die labhemmende Wirkung des Pferdeserums, welch letztere Hammarsten gelegentlich seiner Untersuchungen über Blutgerinnung wahrgenommen hatte, einen chemisch bekannten Körper verantwortlich zu machen, schlugen fehl. Röden, der sich mit dieser Frage beschäftigte, stellte fest, daß die labhemmende Wirkung des Serums durch Erwärmen unter 70° und durch Stehenlassen unter Alkohol aufgehoben wird, nicht aber durch Dialyse oder Erwärmen bis zu 70°. Er fand die wirksame Substanz weder in dem durch Essigsäure aus dem Serum dargestellten Globulin, noch im Albumin. Wie Fuld und Spiro später zeigten, fällt bei der Essigsäurebehandlung vorwiegend das Euglobulin aus, während das Pseudoglobulin in Lösung bleibt. Rödens Albumin war nach Ausfällung des Gesamtglobulins mit $MgSO_4$ durch Essigsäure ausgefällt worden, und daher frei von der wirksamen Substanz. Fuld und Spiro fanden mit Hilfe der Fraktionierung des Serums durch Ammonsulfat, daß die wirksame Substanz dem Pseudoglobulin anhaftet. Diese Autoren führen die Einwirkung des Pseudoglobulins auf die Labgerinnung auf das spezifische Verhalten dieses Eiweißkörpers zu Ca-Salzen zurück, mit denen die genannte Eiweißfraktion eine Verbindung eingeht, die zwar in Wasser löslich, aber relativ wenig dissoziiert ist.

Antifermente gegen Trypsin und Pepsin.

Schon Frentzl nimmt (1891) das Vorhandensein eines Antienzyms gegen die Verdauungsfermente im Magenepithel und Darmepithel an, und postuliert ein solches auch für die Darmparasiten. Den Widerstand lebender Gewebe gegen das Pepsinferment hat zuerst Matthes durch mehrfache Versuche nachgewiesen. Wie Hahn, später Mesnil zeigten, kommt auch den Körpersäften (Blut, Blutserum) eine derartige hemmende Wirkung auf die Proteolyse durch Pepsin und Trypsin zu, die nicht von einer Verdauung des Serums abhängig ist. Die Unangreifbarkeit genuinen Serums durch Trypsin wurde neuerdings von Oppenheimer und Aaron eingehend untersucht.

Die älteren Angaben von Fermi und Pernossi von einer antitryptischen Wirkung zerriebener Organe (Leber, Milz, Muskeln von Meerschweinchen) wurden später von Landsteiner widerlegt, der nach gründlicher Entfernung des Serums zu anderen Resultaten kam. Wohl aber fand er diese hemmende Wirkung im Muskelsaft von Kaninchen und bei Hühnereiweiß. Weinland gelang es, mit Hilfe einer Methode, die er zuerst zur Extraktion einer antitryptisch und antiseptisch wirksamen Substanz aus Ascaris lumbricoides anwendete, auch aus der Schleimhaut des Magens (Schwein) eine ähnliche Substanz darzustellen. Er gewann den Preßsaft in folgender Weise:

Der sorgfältig gewaschene obere Teil des Dünndarms vom Schwein, oder die abpräparierte und ebenfalls gewaschene Mucosa des Magens werden zuerst mit der gleichen Gewichtsmenge Quarzsandes (eventuell unter Zusatz von etwas Na_2HPO_4 in Lösung), dann unter weiterem Zusatz von Kieselguhr (bis zu ein Viertel des Gewichtes) zerrieben, und mit der Buchnerschen Presse ausgepreßt. Der Rückstand wird mit wenig 1⁰/₀iger Kochsalzlösung (und etwas Na_2HPO_4) aufgenommen und zum zweitenmal ausgepreßt. Jeder der beiden Säfte („I und II") wird vor dem Gebrauche durch ein mit Kieselguhr gedichtetes Filter filtriert. Die so erhaltene klare Lösung reagiert schwach alkalisch, und koaguliert beim Erhitzen. Die Extrakte wirken antiseptisch und antitryptisch. Die Wirkung wird durch Erhitzen auf 80^0 aufgehoben, bei 60^0 bereits abgeschwächt. Durch Zusatz von zwei Volumina $96\,^0/_0$igen Alkohols kann ein antifermenthaltiger Niederschlag gewonnen werden. — Recht bemerkenswert erscheinen mir einige Mitteilungen des Verfassers (in einer früheren Arbeit) über den anscheinend hohen Gehalt an Fettsäureestern der Extrakte, ein Befund, den er selbst später wenig beachtet. Die Säfte (Ascarisextrakt!) nehmen, auch wenn sie frisch alkalisch reagiert haben, allmählich saure Reaktion an, und zwar beobachtet man bei Aufbewahrung unter Toluol bereits nach 24 Stunden stark saure Reaktion und Buttersäure- oder Baldriangeruch. Macht man die Säfte nun mit Na_2HPO_4 wieder deutlich alkalisch, so schlägt die Reaktion im Laufe von zwei Tagen wieder um. Destilliert man bei saurer Reaktion (H_2SO_4), so lassen sich im Destillat niedere Fettsäuren, vor allem Valeriansäure nachweisen. Der Autor gibt an, er habe aus 50 ccm Ascarisextrakt ca. 0,192 g Valeriansäure erhalten, doch geht nach mehrstündiger Destillation immer noch Säure über. Der Fettsäuregehalt wächst bei längerem Stehen der Säfte.

Ich glaube nicht fehlzugehen, wenn ich die antifermentative Wirkung des Extraktes mit seinem hohen Fettsäuregehalt in einen kausalen Zusammenhang bringe, umsomehr, als nach den neuesten Untersuchungen von E. Pick und E. Pribram den fettartigen Bestandteilen (des Serums z. B.) eine besondere die Proteolyse hemmende Eigenschaft zuzukommen scheint.

Die antitryptisch wirksame Substanz des Rinderserums fand Landsteiner im Albumin, Glaessner die des Pferdeserums im Globulin. Die Versuche wurden zum Teil mit der Methode der Dialyse, zum Teil durch Fraktionieren des Serums durch Fällung mit Ammonsulfat angestellt. Durch die neuesten Untersuchungen von Höber und die gleichzeitigen und unabhängigen von Porges und Neubauer hat sich nun gezeigt, daß außer den Eiweißkörpern auch andere Kolloide (Lezithin z. B.) von denselben Fällungsmitteln wie die Eiweißkörper (wenn auch in anderer Reihenfolge) gefällt werden. Die bereits oben

erwähnten Versuche von Pick und Pribram, denen es gelang, durch Ätherextraktion die antitryptische Wirkung genuinen Serums aufzuheben, scheinen die Annahme zu stützen, daß die bei der Eiweißfraktionierung gleichzeitig gefällten fettähnlichen Bestandteile des Serums seine und seiner Fraktionen antitryptische Wirkung bedingen.

Aus diesen wenigen, bisher noch recht dürftigen Angaben über die antifermentativen Wirkungen geht wohl bereits hervor, daß die Zurückführung dieser Wirkungen auf „Antikörper" nur ein Notbehelf ist, dessen wir bedürfen, solange uns nicht mehr von der Art der Wirkung bekannt ist, als die Analogie zur Wirkung der Antitoxine. Dabei sei es noch dahingestellt, ob die erwähnten Wirkungen alle einheitlicher Natur sind.

Antifermente im pflanzlichen Organismus.

Über das Vorkommen von Antikörpern im pflanzlichen Organismus findet sich, soweit ich die Literatur überblicken kann, eine einzige Angabe von Czapek. Es handelt sich um ein Antiferment, gegen ein in ungereizten Wurzelspitzen enthaltenes, Homogentisinsäure rasch oxydierendes Ferment, das entsteht, wenn man die Wurzelspitzen geotropisch, hydrotropisch oder phototropisch reizt. Ob bei verschiedener Reizung stets dasselbe Antiferment entsteht, läßt der Verf. unentschieden; andererseits geht aus seinen Untersuchungen hervor, daß das aus den Wurzelspitzen einer Pflanzenart gewonnene Antienzym nur bei nahe verwandten Pflanzenarten den hemmenden Einfluß auf das Ferment ausübt, nicht bei entfernter verwandten.

Darstellungsmethode: 100 Stück 2 mm lang abgeschnittene Wurzelspitzen (von Lupinus albus, hirsutus, Vicia Faba, Zea mays, Avena, Sinapis alba, Curcurbita Pepo, Cucumis Melo oder Phaseolus multiflorus) werden mit einer Messerspitze Glasstaub und 10 ccm destillierten Wassers fein zerrieben, der Brei quantitativ in ein 250 ccm fassendes Erlenmeyer-Kölbchen gespült und 50 ccm einer titrierten wässerigen Homogentisinsäurelösung und 5 ccm Chloroform zugesetzt. Man läßt den Brei 10—15 Minuten stehen, damit er sich absetzen kann, und bestimmt nach dem Verfahren von Baumann mit einer n/10 Silbernitratlösung den Titer der Probe auf Homogentisinsäuregehalt.

Die Proben bleiben bei 28° C stehen und werden täglich mehrmals umgeschüttelt. Die Untersuchung geschieht etwa nach 5, 10, 15 Tagen durch Abpipettieren von 5 ccm des Digestionsgemisches und Bestimmung der Menge n/10 Silbernitrat, welche durch die noch vorhandene Homogentisinsäure reduziert wird (1 ccm $AgNO_3$ entspricht 1,23 mg Homogentisinsäure). — Die geotropische Reizung der Wurzeln geschieht durch Horizontallagern zwischen zwei Lagen nassen Filtrierpapiers bei 20° C ($^1/_2$ Stunde). Noch ein Zusatz von 5% gereizter Spitzen wirkt deutlich hemmend auf die Homogentisinsäureoxydation. Wäscht man den Brei der zerriebenen Wurzelspitzen mit Wasser aus, so erhält man die hemmende Wirkung im Filtrat (Chamberland-Kerzen bei zwei Atmosphären Druck eignen sich besser als Papierfilter). Mit Alkohol läßt sich der hypothetische Antikörper ausfällen (20 Vol. absol. Alkohol). Bei 60° C wird er zerstört. Auf Tyrosinase hat der Antikörper keinen Einfluß.

II. Darstellung der niederschlagsbildenden Immunkörper mit chemischen und physikalischen Methoden:

Die Darstellungsmethoden der Serumpräzipitine, Agglutinine und Bakterienpräzipitine (Kraus) aus den Körperflüssigkeiten (Serum, Milch) sind natürlich dieselben, welche bei den antitoxischen und antifermentativen Immunkörpern in Betracht kommen.

Präzipitine*): Nach einer Angabe von J. Bang fällt das Präzipitin mit der Euglobulinfraktion aus (Ammonsulfatfällung) und läßt sich durch Kochsalzsättigung vollständig aussalzen. Bei der Dialyse bleibt es in Lösung. Erhitzt man nach der Fraktionierung und Dialyse die Lösung auf 64° C, so koaguliert ein großer Teil des Eiweißes und im Filtrat findet man das unveränderte Präzipitin.

Agglutinin: Das Typhusagglutinin läßt sich durch absoluten Alkohol quantitativ ausfällen, wird aber bei längerer Einwirkung des Alkohols teilweise oder vollständig vernichtet. Durch Neutralsalze wird es aus dem Serum ausgesalzen, und zwar mit der Globulinfraktion.

Winterberg gibt an, daß zwischen der Fällung des Typhusagglutinins durch Neutralsalze und der Fällung des Globulins durch Neutralsalze insofern Unterschiede bestehen, als einzelne Neutralsalze das erstere noch nicht ausfällen, während sie die letzteren auszusalzen imstande sind. Zur Zeit, als Winterberg seine Untersuchungen anstellte, waren die eingangs erwähnten Differenzen zwischen der Aussalzung des Euglobulins und der beiden Pseudoglobuline noch nicht hinlänglich bekannt. Ich stelle deshalb im folgenden die Resultate Winterbergs neben jene oben (pag. 78) erwähnte und besprochene Tabelle aus der Arbeit von Porges und Spiro (s. Tabelle 2 pag. 87).

Der Parallelismus der Befunde springt so sehr in die Augen, daß es fast überflüssig erscheint, zu bemerken, daß Winterbegs Beobachtungen einfach auf eine unvollständige Fällung des Pseudoglobulins durch einzelne Neutralsalze zurückzuführen ist. Gleichzeitig beweist diese Zusammenstellung, daß das Typhusagglutinin in dem von Winterberg untersuchten Serum fast quantitativ im Pseudoglobulin gewesen sein muß, da es sonst mit NaCl, KCl, $NaNO_3$ hätte ausfallen müssen. — Kaliumacetat zerstört nach Winterberg das Agglutinin. Die Untersuchungen Picks wurden, da sie mit den Untersuchungen über die Fraktionierung der Eiweißkörper im engsten Zusammenhange stehen, bereits oben eingehend besprochen, und es sei hier nur auf die Zusammenstellung seiner Ergebnisse in der Tabelle pag. 80 und die Diskussion dieser Tabelle verwiesen. —

Serumkoaguline: Die biologisch bedeutsame, zuerst von Kraus beobachtete Tatsache, daß Bakterienkulturfiltrate mit entsprechendem Immunserum einen spezifischen Niederschlag geben („Bakterienpräzipitine"), wurde später von E. P. Pick zum Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen gemacht. Die aus alten Typhusbouillonfiltraten durch Alkoholfällung dargestellte, mit Immunserum eine Präzipitation gebende Substanz bezeichnet Pick als „Bakterienkoagulin A"; die aus Kochsalzaufschwemmungen von Agarkulturen durch Filtration gewonnene, ebenfalls mit Immunserum Niederschläge bildende Substanz nennt er Bakterienkoagulin K (Kochsalz-

---

*) Viel eingehendere Untersuchungen als über das Präzipitin existieren über jene Eiweißfraktionen des Serums („Präzipitogen"), welche Präzipitin zu erzeugen imstande sind. Über dies. s. im Bd. I dies. Hdb.

extrakt). Jene Substanzen des Serums, welche mit den beiden Koagulinen Niederschläge bildet, nennt PICK „Serumkoaguline" (A und K). Beide Serumkoaguline (Typhus) sind nach PICK in der Euglobulinfraktion des Serums enthalten, lassen sich aber durch die Verschiedenheit ihrer engeren Fällungsgrenzen von einander trennen: Das Typhusserumkoagulin A wird nämlich schon bei einer niedrigeren Salzkonzentration

Tabelle 2. (Zusammengestellt aus der Arbeit von PORGES und SPIRO und den entsprechenden Befunden WINTERBERGS.)

Salzkonzentr. in Proz. Sättigung (PORGES und SPIRO)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	Verwendetes Salz (Sättigung mit gepulvertem Salz)	Ausfällung des Agglutinins [Typhus] (WINTERBERG)
NaCl											NaCl	Geringe Fällung
KCl											KCl	Geringe Fällung
$NaNO_3$											$NaNO_3$	Unvollständige Fällung (ca. 50 %)
Na-Acetat											Na-Acetat	Unvollständige Fällung
K-Acetat											K-Acetat	Zerstörung des Agglutinins
$MgSO_4$											$MgSO_4$	Vollständige Fällung (bis auf Spuren)
$(NH_4)_2SO_4$											$(NH_4)_2SO_4$	Vollständige Fällung (schon bei Halbsätttigung)
Na_2SO_4 (oberhalb 30°)											Na_2SO_4 (unterhalb 30°)	Fast vollständige Fällung

Die ausgezogenen Linien beziehen sich auf die Euglobulinfraktion, die strichpunktierten auf das erste Pseudoglobulin, die punktierten auf das zweite Pseudoglobulin. (Vgl. dazu Text pag. 78 und 86.)

ausgesalzen (3,3 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung zu 6,7 ccm Gesamtlösung), das Koagulin K erst bei 3,6 ccm zu 6,4 ccm Gesamtlösung. Auch durch Dialyse lassen sich die beiden Koaguline, wenn auch nur unvollkommen trennen.

III. Darstellungsmethoden jener Immunkörper, welche die Auflösung zelliger Elemente („Lyse") bewirken:

Bakteriolysine: PFEIFFER und PROSKAUER geben an, daß man im Globulin und Albumin ungefähr gleiche Mengen bakteriolytischer Substanz findet, doch hatten sie bei Aussalzung mit Magnesiumsulfat 80 % Verluste.

Bei der Dialyse bleiben die genannten Antikörper zurück, und zwar in Lösung. Durch absoluten Alkohol lassen sie sich ausfällen, durch Äther nicht extrahieren (vgl. den Versuch auf pag. 75). Buchner findet die bakterizide Substanz vorwiegend im Albumin, doch auch zum Teil im Globulin. Über die chemisch physikalischen Eigenschaften des bakteriolytischen Komplementes liegen derzeit noch keine Befunde vor.

Hämolysine: Den Ambozeptor der komplexen Hämolysine enthält nach Landsteiner jener Teil des Globulins, der bei der Dialyse in Lösung bleibt (das Pseudoglobulin), das Komplement fand Buchner vorwiegend im Globulin des Rinderserums. Die gleiche Beobachtung machte Landsteiner, der aber angibt, daß die Wirkung der konzentrierten Lösung relativ gering war im Vergleich zum ursprünglichen Serum. Als Ursache des großen Verlustes ist die von Buchner nachgewiesene zerstörende Wirkung des Wassers auf das Komplement anzusehen. Landsteiner verdünnt deshalb nach Ausfällung der Globuline durch Kohlensäure statt mit Wasser mit 5%iger Traubenzuckerlösung und findet auf diese Weise das Komplement in der globulinreichen und -ärmeren Flüssigkeit ungefähr zu gleichen Teilen.

Darstellungsmethoden jener Immunkörper, welche die Leukocyten zur Phagocytose virulenter Bakterien veranlassen („Opsonine"). Die sogenannten „Opsonine" lassen sich in ähnlicher Weise im Globulin des Serums nachweisen, wie die anderen Immunkörper. Es geht dies aus einer Arbeit Rodhains hervor, die allerdings zu einer Zeit erschien, bevor Wright seine Untersuchungstechnik ausgearbeitet hatte. Nach Rodhains Untersuchungen kommt nur der Euglobulinfraktion (des Antistreptokokkenserum) die Fähigkeit zu, die Leukocyten zur Phagocytose virulenter Streptokokken zu veranlassen; auch die Fähigkeit, das Wachstum der Streptokokken zu beeinflussen, ist an die Euglobulinfraktion gebunden.

Literatur.

H. Aronson, Untersuchungen über Diphtherie und Diphtherieantitoxin. Berliner klin. Wochenschr. 1894, No. 19, pag. 453.

Astros u. Rietsch, Untersuchungen über Diphtherie und Diphtherieantitoxin. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1900, Tome LII, pag. 337.

J. P. Atkinson, Journ. of exper. medicine, Vol. IV, pag. 649. Zit. nach E. P. Pick.

J. Bang, Über Präzipitine. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1906, Bd. VII, pag. 149.

Belfanti u. Carbone, Contributo alla conoscenza dell' antitossina difter. Archivio par le scienze med., Tome XXII, no. 2; zitiert im Centralbl. für Bakteriol. I 1898, Bd. XXIII.

L. Blum, Über eine neue Klasse von Verbindungen der Eiweißkörper. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXII, pag. 127; Über Antitoxinbildung bei Autolyse. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 1904, Bd. V, pag. 142.

L. Brieger u. Boer, Über Antitoxine und Toxine. Zeitschr. für Hygiene 1896, Bd. XXI, pag. 259.

L. Brieger u. G. Cohn, Über die gegen Wundstarrkrampf schützende Substanz aus der Milch. Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XV, pag. 439.

L. Brieger u. P. L. Ehrlich, Beiträge zur Kenntnis der Milch immunisierter Tiere. Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIII, pag. 336.

L. Brieger u. M. Krause, Neuer Beitrag zur Konzentrierung der Immunkörper im Diphtherieserum. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 30, pag. 946.

T. Brodie, A preliminary report of some experim. upon the chemistry of diphtheria antitoxin. The Journ. of Pathol. and Bact. 1897, pag. 460.

Brunner u. Pinkus, Beiträge zur Reindarstellung der Antitoxine (I). Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. V, Heft 5/6.

H. BUCHNER, Über Bakteriengifte und Gegengifte. Münchner mediz. Wochenschr. 1893, Nr. 24/25. — Weitere Untersuchungen über die bakterienfeindlichen und globuliziden Wirkungen des Blutserums. Archiv für Hygiene, Bd. XVII, pag. 112. — Über den Einfluß der Neutralsalze auf Serumalexine etc. Ibid., Bd. XVII, pag. 138.

A. E. BURCKHARDT, Beiträge zur Chemie und Physiologie des Blutserums. Archiv für exper. Pathol. und Physiol. 1883, Bd. XVI, pag. 322.

F. CZAPEK, Antifermente im Pflanzenorganismus. Bericht der deutschen botan. Ges. 1903, Bd. XXI, pag. 229 u. 243 (vgl. auch ibid. 1902, Bd. XX).

DIEUDONNÉ, Ergebnisse der Sammelforschung über das Diptherieheilserum. Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte 1897, Bd. XIII, pag. 293.

M. v. EISLER, Bedeutung der Lipoide für die antihämolytische Wirkung des Serums. Zeitschr. für exper. Pathol. und Ther. 1906, Bd. III, pag. 296.

EMMERICH u. TSUBOI, Über die Natur der Schutz- und Heilsubstanz des Blutes. Verhandl. des XI. Kongr. für innere Medizin. Leipzig 1892.

CL. FERMI u. L. PERNOSSI, Über die Enzyme. Zeitschr. für Hygiene 1894, Bd. XVIII, pag. 83.

FRENTZEL, Die Verdauung lebenden Gewebes und die Darmparasiten. DU BOIS' Archiv 1891, pag. 293.

E. FREUND u. K. STERNBERG, Über Darstellung des Heilkörpers aus dem Diphtherieheilserum. Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankh., Bd. XXXI, pag. 429.

E. FULD u. K. SPIRO, Über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXXI, pag. 132.

R. GIBSON, On the concentration of Antitoxin for therapeutic Use. Journ. of Biological Chemistry, Vol. I, pag. 2/3.

R. GIBSON u. K. COLLINS, On the fractionation of agglutinins and antitoxin. Ibid. 1907, Bd. III, pag. 233.

K. GLAESSNER, Über die antitryptische Wirkung des Blutes. HOFMEISTERS Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1904, Bd. IV, pag. 79.

M. HAHN, Immunisierung und Heilversuche mit den plasmatischen Zellsäften von Bakterien. Münchner mediz. Wochenschr. 1897, pag. 1344 und Berliner klin. Wochenschr. 1897, pag. 499.

O. HAMMARSTEN, Über die Eiweißstoffe des Blutserums. ASHER-SPIROS Ergebnisse der Physiol. 1902, Bd. I, 1. Abt., pag. 330. — Über das Paraglobulin. PFLÜGERS Arch., Bd. XVII. — Über das Fibrinogen. PFLÜGERS Arch., Bd. XXII u. XXX.

Ders., Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung. Nova Acta Reg. Soc. Scient. Ups., Ser. III, Vol. X, pag. 1; zitiert nach obigem Ref.

Ders., Über die Anwendbarkeit des Magnesiumsulfates zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Serumalbumin und Globulinen. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. VIII.

R. HÖBER, Zur Kenntnis der Neutralsalzwirkungen. HOFMEISTERS Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1908, Bd. XI, pag. 35.

M. IDE, Über Antikörper gegen chemisch reine Eiweißstoffe. Fortschritte der Medizin 1901, pag. 234.

M. IDE u. LEMAIRE, Archives internat. de pharmacodyn. et de ther., Vol. VI, pag. 1899; zitiert nach E. P. PICK.

M. JAKOBY, Über die chemische Natur des Rizins. Archiv für exper. Pathol. und Pharmak., Bd. XLVI, pag. 28. — Über Rizinimmunität. HOFMEISTERS Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1902, Bd. I, pag. 52.

JOACHIM, Über die Eiweißverteilung in menschlichen und tierischen Körperflüssigkeiten. Archiv für die gesamte Physiol., Bd. XCIII, pag. 558 und Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 21.

G. KAUDER, Zur Kenntnis der Eiweißkörper des Blutserums. Archiv für exper. Pathol. und Pharmak., Bd. XX, pag. 411.

R. KRAUS, Über spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera-, Typhus- und Pestbouillonkulturen, erzeugt durch homologes Serum. Wiener klin. Wochenschr. 1897, Nr. 18 u. 32.

K. LANDSTEINER, Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutes und der Lymphe. Centralbl. für Bakteriol. (I), Bd. XXVII, pag. 357.

K. LANDSTEINER u. CALVO, Zur Kenntnis der Reaktionen des normalen Pferdeserums. Centralbl. für Bakteriol. 1902, Bd. XXXI, pag. 781.

E. MARCUS, Über in Wasser lösliches Serumglobulin. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXVIII, pag. 559.

Matthes, Zur Wirkung von Enzymen auf lebendes Gewebe etc. Centralbl. für klin. Medizin, Bd. XIV, Heft 25, pag. 86 und Verhandl. des XII. Kongr. für innere Medizin, pag. 425.

F. Mesnil, Annales de l'Instit. Pasteur 1901, Tome XV, pag. 352.

L. Michaelis u. Fleischmann, Über die Erzeugung von Antikörpern durch Injektion von artfremden Leberzellen. Zeitschr. für klin. Medizin 1906, Bd. LVIII, pag. 463.

L. Michaelis u. Oppenheimer, Über Immunität gegen Eiweißkörper. Engelmanns Archiv für Physiol. 1902, 2. Suppl.-Bd., pag. 338.

H. Noguchi, Über chemische Inaktivierung und Regeneration der Komplemente. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. VI, pag. 172.

Obermayer u. Pick, Biologisch-chemische Studien über das Eiklar. Wiener klin. Rundschau 1902, Nr. 15.

Panum, Über einen konstanten, mit dem Kaseïn übereinstimmenden Bestandteil des Blutes. Virchows Archiv, Bd. III, pag. 251; vgl. auch Bd. IV, pag. 17. u. 419.

C. A. Pekelhaaring, Über die Beziehungen des Fibrinfermentes aus dem Blutserum zu Nukleoproteid etc. Centralbl. für Physiol. 1895, Heft 3; vgl. auch Virchows Festschrift 1891, Bd. I.

R. Pfeiffer u. Proskauer, Beiträge zur Kenntnis der speziellen wirksamen Körper im Blutserum von choleraimmunen Tieren. Centralbl. für Bakteriol. 1896, Bd. XIX, pag. 191.

E. P. Pick, Zur Kenntnis der Immunkörper. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1902, Bd. I, Heft 7—12.

J. Pohl, Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und serösen Flüssigkeiten. Archiv für exper. Pathol. und Pharmak., Bd. XX, pag. 426. — Bemerkungen über künstlich dargestellte Eiweißnukleine. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XIII, pag. 294.

Popplewell-Bloxham, Proceedings Physiol. Soc. London 1901; zitiert bei Brunner und Pinkus (s. o).

O. Porges u. E. Neubauer, Physikalisch-chemische Untersuchungen über das Lezithin und das Cholesterin. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. VII, Heft 1, 2, pag. 152.

O. Porges u. K. Spiro, Die Globuline des Blutserums. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1902, Bd. III, pag. 277.

W. Reye, Über den Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Diss. Straßburg 1898.

Röden, zitiert nach Malys Jahresber., Bd. XVII.

J. Rodhain, Beiträge zur Kenntnis der wirksamen Substrate des Antistreptokokkenserums. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1903, Bd. III, pag. 451.

Rostoski, Über den Wert der Präzipitine als Unterscheidungsmittel für Eiweißkörper. Münchner mediz. Wochenschr. 1902, Nr. 18, pag. 740.

L. Schwarz, Über Verbindungen der Eiweißkörper mit Aldehyden. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXXI, pag. 460.

W. Seng, Über die qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Eiweißkörper im Diphtherieheilserum. Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXI, pag. 513.

Smirnow, Arch. sciences biol. publ. par l'Inst. Impér. de méd. exp. à St. Petersbourg 1895, Tome IV; zitiert nach Dieudonné.

K. Spiro, Über Beeinflussung der Eiweißkoagulation durch stickstoffhaltige Substanzen. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXX, pag. 182.

G. Tizzoni, Über exper. Immunität gegen Tetanus. Festschr. für Virchow 1891, Bd. III, pag. 31.

A. Vandevelde, Löslichkeitsveränderungen bei Milch- und Serumproteiden. Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. VII, pag. 396.

E. Weinland, Über ausgepreßte Extrakte von Ascaris lumbricoides und ihre Wirkung. Zeitschr. für Biol. 1902, Bd. XLIII, pag. 86.

Ders., Über Antifermente. Ibid. 1902, Bd. XLIV, pag. 1 u. 45.

H. Winterberg, Untersuchungen über das Typhusagglutinin. Zeitschr. für Hygiene 1902, Bd. XXXII, pag. 374.

Antikörper gegen bakterielle Toxine.

V.

Diphtherieantitoxin.

Von

Thorvald Madsen

in Kopenhagen.

Prüfung des Diphtherieheilserums.

Als die Serumbehandlung der Diphtherie allgemein in der Therapie eingeführt werden sollte, war es notwendig, für unschädliche und vollwertige Präparate Sorge zu tragen. In den meisten Ländern hat der Staat direkt oder indirekt die Garantie übernommen, indem die Herstellung Instituten anvertraut ist, die mehr oder weniger vom Staate abhängig sind. In anderen Ländern, z. B. in Deutschland, in den Vereinigten Staaten, ist die Herstellung dagegen der privaten Initiative überlassen. In Deutschland hat man eine besondere staatliche Kontrolle des für den Handel bestimmten Serums errichtet. Die „Kontrollstation für Diphtheriesera" unterstand anfangs dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin, wurde aber $1^1/_4$ Jahr später in ein selbständiges Institut, das „Institut für Serumforschung und Serumprüfung" umgestaltet, das unter der Leitung des Geheimrates Prof. Dr. Paul Ehrlich eine große Bedeutung für die Serumprüfungstechnik und die Immunitätslehre gewonnen hat. Dieses Institut wurde später erweitert in das „Institut für experimentelle Therapie" in Frankfurt a. M.

Die Prüfung eines antidiphtherischen Serums umfaßt hauptsächlich zwei Aufgaben: 1. die Wertbestimmung und 2. die Feststellung der Unschädlichkeit.

Die Wertbestimmung.

In der allerersten Zeit nach der Entdeckung spezifischer Blutantitoxine wurde von v. Behring das gegenwärtig geltende Prinzip der Wertbestimmung angewendet. Es wurde hierbei Diphtheriegift mit Diphtherieantitoxin gemischt und unter die Haut von Meerschweinchen eingespritzt. Wenn eine tödliche Dosis Gift durch den Serumzusatz unschädlich geworden war, so wurde daraus auf die Anwesenheit von Antitoxin im Serum geschlossen.

Zuerst arbeitete man mit der einfach tödlichen Minimaldosis; diese erwies sich als äußerst ungenau, da sich so viele Faktoren geltend zu

machen vermögen und da die Todeszeit bei einer solchen Giftdosis bekanntlich höchst variabel ist. Man schritt darauf zur Anwendung eines Multiplums derselben, indem man von der Vorstellung ausging, daß das Toxin und das Antitoxin eine chemische Verbindung miteinander eingehen.

Wie v. BEHRING und BOER[9]) hervorhoben, hat eine vollständige Wertbemessung eines Serums folgendes zu berücksichtigen:

1. den Immunisierungswert gegenüber einer Infektion,
2. den Heilwert gegenüber einer Infektion,
3. den Immunisierungswert gegenüber einer Intoxikation,
4. den Heilwert gegenüber einer Intoxikation.

Aus zahlreichen Versuchen glaubte v. BEHRING annehmen zu können, daß diese vier Werte parallel gingen, so daß man von einem auf die anderen schließen durfte. Namentlich der erste derselben wurde in großem Umfang als Maß angewandt. Diese Bemessung wurde ursprünglich in der Weise angestellt, daß man eine Reihe von Tieren (stets Meerschweinchen) so infizierte, daß man sicher war, ihr Tod werde nach Verlauf einer gewissen Reihe von Tagen eintreten. Darauf erhielten die Tiere abgestufte Mengen des zu prüfenden Serums, und man suchte diejenige Dosis desselben zu ermitteln, die genügte, um das Tier vor dem Tode zu schützen.

Die Infektion mit lebender virulenter Kultur ist indes eine sehr unsichere Methode, die gar zu schwankende Resultate gibt. Ein bedeutender Fortschritt geschah, als v. BEHRING und KNORR[10]) (1893) statt der Infektion wieder die Intoxikation einführten, wodurch man weit regelmäßigere Resultate erlangte. Die Grundlage unserer jetzigen Prüfungsmethode legte aber erst EHRLICH durch seine Lehre, das Toxin und das Antitoxin nicht getrennt, sondern in vitro miteinander vermischt geprüft werden dürfen.

Als die Serumtherapie 1894 eingeführt wurde, benutzte man in den leitenden Laboratorien vorzüglich zwei verschiedene Meßmethoden. Im Institut Pasteur in Paris bediente man sich folgenden Verfahrens (ROUX, MARTIN und CHAILLOU)[101]): Die Stärke des Serums wird durch eine Zahl bezeichnet, welche angibt, wieviel g lebendes Gewicht Meerschweinchen (à 500 g) 1 ccm Serum vor einer 12 Stunden später injizierten letalen Dosis Diphtheriekultur oder Diphtheriegift zu schützen vermag. Wenn z. B. diese Serummenge $^1/_{50\,000}$ des Körpergewichts des Meerschweinchens beträgt, während $^1/_{100\,000}$ nicht schützen würde, so wird der Wert als zwischen 50000 und 100000 berechnet. Dies ist eine Modifikation eines früher von v. BEHRING[44]) angegebenen Verfahrens.

Das von EHRLICH und dessen Mitarbeitern in Übereinstimmung mit v. BEHRING 1894 ausgearbeitete Meßverfahren ist aus einer Auffassung der Wirkung des Antitoxins auf das Toxin als einer chemischen Verbindung abgeleitet. Zur zehnfachen Dosis des Giftes wurden abgestufte Mengen der zu prüfenden Antitoxinlösung zugesetzt und diese Mischungen Meerschweinchen von ca. 250 g unter die Haut gespritzt. Sämtliche Gemische wurden durch Zusätze von Kochsalzlösung auf die Menge von annähernd 4 ccm gebracht. Von einem Serum, wovon 0,1 ccm mit der Testdosis vermischt an dem am vierten Tage nach der Injektion untersuchten Tiere keine örtliche Infiltration darbietet, sagt man, daß es eine Antitoxin- oder Immunisierungseinheit in jedem Kubikzentimeter enthält, und das Serum nennt man 1fach. Ist 0,001 ccm hinlänglich, so heißt das Serum 100fach und enthält in 1 ccm 100 Immunisierungseinheiten (I.-E.) usw.

Mittels einer vergleichenden Untersuchung fand MADSEN[67]), daß unter diesen Methoden der EHRLICHschen unbedingt der Vorzug gebührt, denn sie mißt Differenzen von 5—10%, ist schneller (gibt mit Wahrscheinlichkeit das Resultat am 2., mit Sicherheit am 4. Tage), billiger (es ist leichter und billiger, Meerschweinchen von 250 g als solche von 500 g anzuschaffen) und bequemer, da die Einspritzung in einem Akte, statt wie bei dem von ROUX empfohlenen Verfahren in zwei Akten unternommen wird.

Während seiner Tätigkeit als Leiter der deutschen Serumkontrolle gewann EHRLICH[46]) indes die Erfahrung, daß diese Meßmethode, wie fein sie auch in geübten Händen ist, dennoch Differenzen veranlassen konnte. Es erwies sich, daß der eigentliche Prüfstein des Verfahrens, die Infiltration an der Injektionsstelle, sich von verschiedenen Beobachtern verschieden auffassen ließ. Die örtliche Reaktion ist von verschiedenen Umständen abhängig, z. B. davon, ob man unter die Haut oder unter die Muskeln einspritzt, in welch letzterem Falle die Infiltration weniger ausgesprochen wird. EHRLICH änderte deswegen sein Meßverfahren derart ab, daß das Entscheidende der Tod des Tieres nach 4—5 Tagen wurde, ein Kriterium, das sich nicht anfechten läßt.

EHRLICHs jetzt allgemein angewandtes Verfahren ist folgendes:

Man bestimmt L_+ (Limes$_+$, siehe das Kapitel „Diphtheriegift, I. Band), d. h. die kleinste Menge Diphtherietoxin, die mit einer Immunisierungseinheit gemischt und unter die Haut eingespritzt Meerschweinchen von 250 g im Laufe von 4—5 Tagen tötet. Mit L_+, die also die Testdosis ist, mischt man verschiedene Mengen Serums und findet diejenige, die eben den Tod verhindert. Ist hierzu $^1/_{400}$ ccm Serum erforderlich, so heißt dieses Serum 400fach und enthält 400 I.-E. pro ccm. Um ganz korrekt zu sein, sollte man eigentlich diejenige Serummenge ermitteln, die ganz dieselbe Wirkung hat wie eine Immunisierungseinheit, d. h. die mit L_+ gemischt den Tod in 4—5 Tagen bewirkte; aus prüfungstechnischen Gründen hat man aber die Forderung gestellt, daß das Versuchstier am Leben bleibt.

Als man anfing, überall antidiphtherisches Serum darzustellen, zeigte es sich, daß die Meßmethoden, wie auch die Einheit äußerst schwankend waren. So fand MADSEN[67]), daß Sera, die als 200fach bezeichnet wurden, mit der EHRLICHschen Einheit gemessen oft nur 25—35fach waren. Zum Teil rührte dieses Nichtübereinstimmen daher, daß die Testdosis das Zehnfache der tötlichen Minimaldosis war, und daß man deshalb, je nachdem die tödliche Minimaldosis wegen der Abschwächung des Giftes anwuchs, die Testdosis vergrößern mußte. Dies würde keine Schwierigkeit bereiten, wenn das toxische Vermögen des Giftes dessen Antitoxinbindung ausdrückte. Indes zeigte EHRLICH, daß diese Basis nicht brauchbar war, da das bindende Vermögen des Giftes nicht parallel zu dessen Giftigkeit einherging. Letztere konnte sehr wohl abnehmen, während ersteres unverändert blieb. EHRLICH[46]) erklärt diese Tatsache durch die Annahme, daß das Toxinmolekül aus 2 Gruppen bestehe, einer toxophoren, labilen, der Trägerin der giftigen Eigenschaften, und einer haptophoren, mehr stabilen, die das Antitoxin binde. Allmählich wie das Toxin sich lagere, werde es in eine weniger giftige oder auch ganz ungiftige Modifikation, das Toxoid, mit fast unverändertem toxinbindendem Vermögen umgebildet.

Die Erkenntnis dieser Verhältnisse bewog EHRLICH, das Toxin als den fixen Punkt der Prüfungstechnik zu verlassen und das weit mehr stabile Antitoxin zur Basis zu machen.

Die Immunitätseinheit.

Eine Einheit, mit der sich verschiedene Antitoxinlösungen messen lassen, wurde von v. BEHRING eingeführt, der ein bestimmtes Tetanusheilserum, das er in Händen hatte, als Normalheilserum bezeichnete. Auch für das Diphtherieantitoxin führte v. BEHRING den Begriff des Normalheilserums mit folgenden Worten ein (s. DÖNITZ [40]): „Der tödliche Ausgang der Vergiftung eines Meerschweinchens von mittlerem Körpergewicht (ca. 500 g) mit 0,8 ccm von meinem alten Diphtheriegift wird durch das Diphtherie-Normalheilserum verhütet, wenn $^1/_4$ Stunde vor der subkutanen Injektion der Giftlösung demselben Meerschweinchen an einer von der Giftinjektionsstelle entfernten Hautpartie das Serum in einer Menge von 1:100 (ca. 5 ccm) subkutan appliziert wird.“ Demgemäß stellte v. BEHRING den Begriff des Normaldiphtheriegiftes auf, das in 1 ccm 100 einfach tödliche Dosen enthält. Die einfach tödliche Dosis ist diejenige Menge Gift, die ein Meerschweinchen von 250 g in 4—5 Tagen tötet. (In v. BEHRINGS Terminologie wird dies ausgedrückt durch D. T. N^1 M^{250}, d. h. Diphtherietoxin 1fach normal, an Meerschweinchen von 250 g Gewicht gemessen.)

Diese Begriffe wurden weiter entwickelt von v. BEHRING und von EHRLICH, der die Immunitätseinheit oder die Antitoxineinheit (abgekürzt I-E. oder A-E.) so definierte: Das Normalheilserum ist ein solches, das in 1 ccm 1 Immunisierungseinheit enthält. Von diesem genügt 0,1 ccm, um 1 ccm des v. BEHRINGschen Normalgiftes zu neutralisieren.

Die jetzt in der Prüfungstechnik gebrauchte Immunitätseinheit ist eine willkürlich gewählte Größe und ist so entstanden, daß EHRLICH eine bestimmte Menge Antitoxin als Einheit bezeichnete, welche von einem damals zur Verfügung stehenden Gift 100 Dos. let. so absättigte, daß nach Injektion dieses Gemisches auch nicht die geringste Spur von Krankheit (lokaler und allgemeiner Reaktion) eintrat.

Das Rationellste würde sein, eine solche Einheit zu benutzen, wie sie sonst in der Chemie üblich ist, nämlich die nach dem Molekulargewichte bestimmte; wegen völliger Unkenntnis der chemischen Zusammensetzung des Diphtherieantitoxins muß man hierauf verzichten und suchen, an der von EHRLICH arbiträr aufgestellten Einheit festzuhalten. Ähnlich wie man umfassende Maßregeln getroffen hat, um unsere internationale Längeneinheit, den Meter, unverändert zu bewahren, so hat EHRLICH sich der großen und mühevollen Arbeit unterzogen, dafür Sorge zu tragen, daß die Antitoxineinheit soweit möglich in Zukunft keine Änderungen erleidet.

Um das Antitoxin konstant zu erhalten, gilt es, diejenigen Faktoren auszuschließen, welche die Zerstörung derart zersetzlicher Körper bedingen: Wasser, Sauerstoff, Licht und Wärme.

Da die gewöhnlichen glyzerinhaltigen Antitoxinlösungen meistens eine Abschwächung erfahren, wandte EHRLICH trocknes Serum als Standard an. Das Eintrocknen des Serums bewerkstelligt ROSENAU [96]) mittels des unten abgebildeten Apparates, dessen Anwendung aus der Zeichnung ersichtlich ist: Das Serum wird in kleinen Mengen in die Trockenröhre gesaugt und hier schnell mittels eines Luftstromes eingedampft, der dadurch, daß er durch H_2SO_4 und Kalk passiert, getrocknet worden ist, und der, nachdem er auf einem Sandbade erwärmt wurde, in Bläschen durch die Trockenröhre emporsteigt (Fig. 1). Das umgebende

Wasserbad behält eine Temperatur von 35—36°, welche Temperatur der durchgesaugte Luftstrom nicht überschreiten darf. Das Saugen darf nicht zu heftig geschehen. Auf diese Weise konnten 4127 ccm Serum im Laufe von 25 Stunden auf 405 g großer goldfarbiger Schuppen eingedampft werden, die sich darauf in einem sterilen Mörser und in einer Kugelmühle zu einem ganz feinen Pulver zerkleinern ließen.

Behufs der Aufbewahrung des getrockneten Serums hat Ehrlich ein besonderes Konservierungsverfahren ersonnen. Eine gewisse auf der chemischen Wage abgewogene Menge Trockenserums, das durchaus keine Art Zusatz enthalten darf, wird in eine Serumröhre von untenstehender Form *a* geschüttet. Diese bildet nun den Teil eines Röhrensystems, zu dem noch ein Kölbchen *b*, das zur Aufnahme von Phosphorsäureanhydrid dienen soll, und ein Verbindungsstück *c* gehören. Darauf werden die einzelnen Stücke des Röhrensystems in der aus der Fig. 2 ersichtlichen Anordnung aneinander geschmolzen und zur weiteren vollständigen Evakuierung eine Anzahl solcher Apparate mit einer Quecksilber-Luftpumpe in Verbindung gebracht. Nachdem das Wasser (ca. 10 % in den Trockenseris) und der Sauerstoff entfernt sind, werden die Röhrchen dann bei ✳ (in Fig. 2) abgeschmolzen und bleiben noch längere Zeit unter dem Einfluß des Phosphorsäureanhydrids stehen, bis dieses sichtbar keine Feuchtigkeit mehr aufnimmt. Dies läßt sich daraus ersehen, daß das durch Klopfen aufgeschüttelte Anhydrid unverändert bleibt. Alsdann werden die das Serum enthaltenden Teilchen des Apparates bei *y* abgeschmolzen, und das Serum befindet sich nunmehr unter Bedingungen, die für die Konservierung bei weitem die geeignetsten sind. An einem dunklen kühlen Orte aufbewahrt erhält

Fig. 1.

Fig. 2.

sich das Serum jahrelang unverändert. Eine etwas einfachere Röhre wird von ROSENAU[96]) angewendet (Fig. 3).

Dieselbe besteht aus zwei Tuben mit je seinem Halse, die durch eine Röhre miteinander verbunden sind. Erst bringt man Watte in die Verbindungsröhre bis zur Verengerung. Darauf füllt man P_2O_5 in den einen Tubus und schmilzt den Hals zu, durch welchen man gefüllt hat. Eine abgewogene Menge Trockenserums wird in den anderen Tubus gefüllt, dessen Hals wird mit einem Vakuumapparat verbunden, und sobald das Vakuum erreicht ist, schmilzt man den Hals zu. Die zugeschmolzenen Röhren werden im Dunkeln und im Eisschrank verwahrt.

Fig. 3.

Handelt es sich z. B. um die Neueinstellung eines frischen Diphtheriestandardserums, so wird eine solche Röhre wieder geöffnet und der Inhalt des Röhrchens in einer gewissen genau abgemessenen Flüssigkeitsmenge gelöst. Mit diesem frisch gelösten Serum wird nun zunächst der ungefähre Wert des Serums ermittelt (Tab. 2), nachdem man sich zuvor von der Konstanz der Prüfungsdosis des Testgiftes überzeugt hat (Tab. 1). Ist beides geschehen, so erfolgt die genaue Einstellung des Serums in der Weise, daß man die in Betracht kommenden Verdünnungen des Serums gegen dieselben fallenden Dosen Gift prüft, mit welchen man eine I.-E. des alten Standardserums eingestellt hatte (Tabelle 3). Alle 2 Monate wird eine Standardröhre geöffnet und deren Inhalt in soviel Glyzerinkochsalzlösung (2 Teile Glyzerin und 1 Teil physiologische Kochsalzlösung) gelöst, daß die resultierende Lösung in 1 ccm genau 10 I.-E. enthält.

Wegen weiterer Einzelheiten verweise ich auf OTTOS Arbeit[83]), von dem ich die Tabelle und die vorstehende Darstellung größtenteils entlehnt habe.

Es ist demnach im Frankfurter Institut mit größter Umsicht für die Erhaltung der Immunitätseinheit gesorgt; unter ähnlichen Kautelen findet sie sich jetzt auch in The Hygienic Laboratory, U. S. Public Health and Marine Hospital Service in Washington.

Eine gleichartige Wertbemessung des Diphtherieantitoxins läßt sich am sichersten und besten dadurch ausführen, daß man, wie MADSEN[66])

Tabelle 1. Kontrolle der Prüfungsdosis.

Giftmenge in ccm	Altes Standardserum	Urstandard					
	4. XI. 1902	Versuch am					
		4. XI. 02	7. XI. 02	11. XI. 02	14. XI. 02	18. XI. 02	21. XI. 02
0,76	davon	davon	davon	davon	davon	davon	davon
0,77	davon	davon	davon	davon	davon	† 4	davon
0,78	† 4	† 4	† 4	† 4	davon	† 3	† 4
0,79	† 3½	† 3½	† 3	† 4	† 4	† 3	† 3

Tabelle 2. Orientierende Einstellung des neuen Standardserums mit der Prüfungsdosis 0,78 ccm.

Bei Verdünnung des Serums auf ? mehrfach	Versuch am								
	11. XI. 1902	14. XI. 1902	18. XI. 1902	26. XI. 1902	29. XI. 1902	3. XII. 1902	5. XII. 1902	8. XII. 1902	15. XII. 1902
12,0	davon		davon	davon					
12,25									
12,5		davon	davon	davon	davon	davon			
12,75					† $4^{1}/_{2}$	davon	davon	davon	† 5
13,0	† 5	† 5	† 4	davon	† 4	† 4	davon	davon	† $4^{1}/_{2}$
13,25					† 3	† 3	† 5	† 4	† 4
13,5		† 3	† 4	† 3	† 3			† 3	† 4
13,75									† 3
14,0	† 3								

Tabelle 3. Genaue Einstellung des neuen Standardserums.

Giftmenge in ccm	Am 15. XII. 02 als 13,0 fach	Am 15. XII. 02 als 13,25 fach	Am 15. II. 03 als 13,25 fach	Am 15. II. 03 als 13,5 fach
0,76	davon	davon	davon	
0,77	davon	davon	davon	† 4
0,78	davon	† 4	† 4	† 4
0,79	davon	† 3	† 3	† 3

Erklärung zu Tabelle 1—3 (nach Otto):

Tabelle 1 zeigt, daß auf Grund der mit dem alten Standard und dem Urstandard angestellten Versuch die L+ (Prüfungs) Dosis des Giftes = 0,78 ccm ist.

Aus Tabelle 2 ergibt sich, daß unter Benutzung der gefundenen Prüfungsdosis (= 0,78 ccm) das neue Serum = 13,25fach eventuell aber noch als 13,0- bzw. 13,5fach anzusehen ist.

Nach Ausfall der Versuche in Tabelle 3 und Vergleich mit den Versuchen in Tabelle 1 ist das neue Serum genau 13,25fach.

1896 vorschlug, die Ehrlichsche Einheit zum Standard wählt. Dies ist auch in großem Umfang geschehen, und zur Zeit ist derselbe in etwa 40 staatlichen Instituten und wissenschaftlichen Laboratorien eingeführt, die sich auf folgende Länder verteilen: Dänemark, England, Niederlande, Norwegen, Rußland, Österreich-Ungarn, Schweiz, Italien, Spanien, Portugal, Rumänien, Bulgarien, Nordamerika, Kuba, Indien und China. Das Frankfurter Institut stellt mit großer Bereitwilligkeit regelmäßig alle zwei Monate frisch eingestelltes Standardserum zur Verfügung. Hierdurch und durch die Einführung der letzteren Ehrlichschen Prüfungsmethode ist die Antitoxinbemessung gleichartig geworden sowie auch ein Vergleich der in verschiedenen Ländern bei der Heilserumtherapie angewandten Präparate ermöglicht.

Testgift und Serumprüfung.

Was die Darstellung eines brauchbaren Testgiftes betrifft, die nicht immer ganz leicht gelingt, verweise ich auf das Kapitel „Diphtheriegift" (I. Band).

Damit der Vorrat nicht gar zu schnell verbraucht werde, ist es vorteilhaft, eine große Menge Gift auf einmal zu bereiten und einzustellen. Hat man ein Gift von mittlerer Stärke erhalten (D. min. l. 0,002—0,006 ccm), so sollte man dasselbe ein Jahr hindurch unter Toluol konserviert im Dunkeln und bei niedriger Temperatur lagern. Die Abschwächung, der die meisten Gifte unterworfen sind, verläuft am schnellsten während der ersten Zeit, und während dieser Periode ist es nicht ratsam, die Einstellung der Konstanten des Giftes vorzunehmen. Bei der Einstellung bestimmt man sowohl die Dosis minima letalis (hier wie überall durch subkutane Injektion an Meerschweinchen von 250 g) als auch L_0 und L_+. (Siehe das Kapitel „Diphteriegift".)

Mit Bezug auf die Technik der Messungen und der Injektionen verweise ich auf das Kapitel „Toxine" (Allgem. Methodik I. Band). Hier finden sich auch Bemerkungen über die zu den Injektionen verwandten Meerschweinchen.

Alle Manipulationen beim Messen und Injizieren müssen selbstverständlich steril geschehen.

Einstellung der Testdosis L_+ mit Ehrlichs Testserum (das jetzt zehnfach ist).

Von der dickflüssigen, glyzerinhaltigen Antitoxinlösung wird 1 ccm in einer auf Inhalt geeichten 1 Kubikzentimeter-Pipette abgemessen, dabei achte man darauf, daß der Außenseite kein Antitoxin anhaftet. Man bringt den Inhalt in 19 ccm physiologischer Kochsalzlösung und spült die Pipette mehrmals sorgfältig aus. Nach den Mischen mißt man 2 ccm, die mithin 1 I.-E. enthalten, in ein Spitzglas oder direkt in eine Kochsche Spritze (Rosenau)[96]) ab. Auf ähnliche Weise verdünnt man das Toxin.

Als Beispiel wird folgende Versuchsreihe angeführt: Vorversuche hatten ergeben, daß L_+ um 0,23 ccm herum lag. Das Toxin wird verdünnt, 2 ccm zu 18 ccm Kochsalzlösung. Von der Verdünnung werden 2,10, 2,20, 2,25, 2,30, 2,35 und 2,40 ccm in sechs Spitzgläser oder kleine Fläschchen oder Kochsche Spritzen abgemessen, die 2 ccm Standardserumverdünnung (1 I.-E.) enthalten. Zu dieser Messung benutzt man am besten eine auf $^1/_{100}$ ccm geaichte „Feinpipette" mit einer Einteilung von 1,5 bis 3,0 ccm. Diese muß wie alle zur Serumprüfung gebrauchten Meßapparate äußerst sorgfältig geaicht sein. Das Serum und das Gift werden zusammengemischt und stehen 15 Minuten bei Zimmertemperatur. Der Zutritt des Lichtes muß verhindert werden, indem man entweder ein Gefäß aus dunklem Glase benutzt oder auch das Gefäß mit einer undurchsichtigen Kappe bedeckt. Behufs Injektion gießt man die Gemische in eine Kochsche Spritze, worauf das Gefäß sorgfältig mit steriler Kochsalzlösung nachgespült wird. Darauf injiziert man subkutan an Meerschweinchen von 250 g. Die Spitze der Kanüle wird in die linke Achselfalte eingestochen und vorsichtig rein subkutan bis zur Mitte des Bauches geführt, worauf die Injektion ausgeführt wird.

Die beiden Versuchsreihen I und II, Tab. 4, zeigen, daß 0,23 ccm dieses Giftes, mit einer Immunisierungseinheit gemischt, Meerschweinchen in ca. vier Tagen töten, während größere und kleinere Mengen Toxin merkbar stärkere, bzw. schwächere Ausschläge geben. Die Tiere sterben mit dem für die Diphtherieintoxikation typischen Befund (lokales hämorrhagisches Ödem, Drüsenschwellung in der Leisten- und der Achselgegend, seröse,

zuweilen hämorrhagische Ergüsse in der Pleura, dem Pericardium und dem Peritoneum, starke Rötung der Nebennieren, Splenisation der Lungen). Die Sektion der Tiere muß natürlich stets gemacht werden.

Tabelle 4.

Giftmenge in ccm	I	II
0,21	davon	davon
0,22	davon	davon
0,225	davon	davon
0,23	† $4^1/_2$	† 4
0,235	† 3	† $2^1/_2$
0,24	† 3	† $2^1/_2$

Diese Versuchsreihe lehrt, daß L_+, die gesuchte Testdosis, 0,23 ccm beträgt. Die Überprüfung muß man jedoch alle 2 Monate mittels frischen Standardserums verifizieren, denn selbst wenn das Gift im Dunkeln und im Eisschrank verwahrt wird, ist man doch nicht vor Abschwächung gesichert. Zugleich muß man sich also alle 2 Monate durch Kulturproben von der Sterilität des Giftes vergewissern, denn auch, wenn das Gift unter Toluol aufbewahrt wird, ist man deshalb doch nicht vor Infektion geschützt.

Ausführung einer Antitoxinmessung.

Nach genauer Bestimmung von L_+ hat man eine Testdosis, die zur Messung des Antitoxingehalts einer Lösung brauchbar ist. Da 4 ccm der Erfahrung gemäß ein zur Injektion an Meerschweinchen von 250 g geeignetes Quantum Flüssigkeit sind, muß man bei den Verdünnungen hierauf Rücksicht nehmen. Handelt es sich z. B. darum, zu prüfen, ob ein Serum 300, 400 oder 500 Immunisierungseinheiten in 1 ccm enthält, so mißt man in 3 Flaschen 599, 799 und 999 ccm physiologischer Kochsalzlösung ab. Zu jeder Flüssigkeitsmenge setzt man mit auf Inhalt geaichten Vollpipetten 1 ccm Serum hinzu, worauf man die Pipette sorgfältig ausspült und die Serumverdünnung kräftig schüttelt. Darauf pipettiert man 2 ccm ab und überträgt in kleine Spitzgläser oder in Kochsche Spritzen, und mischt diese 2 ccm mit L_+, im obigen Beispiele 0,23 ccm, Gift (2,3 ccm, mittels einer Feinpipette aus einer Verdünnung 1:9 abgemessen).

Bei den hier angedeuteten Verdünnungen mischt man fast gleiche Mengen der Serum- und Giftverdünnungen miteinander. Findet man es unbequem, mit so großen Mengen Flüssigkeit wie den oben angegebenen zu arbeiten, so kann man eine erste Verdünnung Serum 1:9 und hieraus wieder eine andere 1:29 herstellen, wovon 1 ccm $^1/_{300}$ des ursprünglichen Serums, 1:39 (1 ccm = $^1/_{400}$), bzw. 1:49 (1 ccm = $^1/_{500}$) entspricht. Bei diesen wiederholten Messungen kleiner Mengen Flüssigkeit wird der Abmessungsfehler jedoch größer. Das Toxin und das Serum werden gut miteinander vermischt und stehen 15 Minuten bei Zimmertemperatur. Darauf injiziert man subkutan an 3 Meerschweinchen von 250 g. Stirbt das Tier, das $^1/_{500}$ ccm erhalten hat, während die beiden anderen am

Leben bleiben, so will das heißen, daß das Serum zwischen 400 und 500 I.-E. pro ccm enthält. Findet sich bei $^1/_{400}$ ccm Serum lokale Reaktion, so liegt dessen Wert nahe an 400 I.-E. Man kann jetzt die Bestimmungen einengen, indem man eine neue Prüfung auf 410, 420 I.-E. etc. unternimmt. Wo es auf sehr genaue Bestimmungen ankommt, muß man sich erinnern, daß diejenige Menge Serum, die mit L_+ zusammengemischt in 4 Tagen eben tödlich wirkt, streng genommen 1 Immunitätseinheit enthält. Nur aus praktischen Gründen hat man die Änderung eingeführt, daß das Tier am Leben bleibt. Wieviele Bestimmungen man anzustellen hat, hängt davon ab, eine wie große Genauigkeit man zu erreichen wünscht; zum praktischen Gebrauch verlangt man selten mehr als 5%; ist bei theoretischen Untersuchungen aber eine größere Genauigkeit erwünscht, so kann man eine solche von 1—2% erzielen, dazu sind aber eine große Anzahl Messungen notwendig.

Antitoxingehalt und therapeutischer Wert.

Die EHRLICHsche Wertbestimmung, die den Gehalt eines Serums an Antitoxineinheiten als für die Beurteilung des therapeutischen Wertes desselben maßgebend betrachtet, hat man fast überall angenommen. Indes behauptete ROUX[100]) am X. internationalen Hygiene-Kongreß zu Paris 1900, daß eine Parallele zwischen dem antitoxischen Wert, d. h. dem Gehalt eines Serums an I.-E. und den präventiven und kurativen Werten desselben Serums nicht bestehe. Serum mit hohem Gehalt an I.-E. sollte zuweilen weit geringere heilende und schützende Eigenschaften besitzen können als Serumpräparate mit geringerem Gehalt an Antitoxineinheiten.

Um darüber ins Reine zu kommen, ob die antitoxische, die präventive und die kurative Eigenschaft eines Serums voneinander verschieden sein könnten, stellte MARX[72]) mit Toxin und mit Antitoxin verschiedener Provenienz und sehr verschiedener Stärke eine äußerst sorgfältige Untersuchungsreihe an, die umfaßte:

1. Heilversuche an Meerschweinchen, wo das Gift subkutan und das Serum 3 Stunden später intraperitoneal einverleibt wurden;
2. Immunisierungsversuche an Meerschweinchen, wo das Toxin 6 Stunden nach intraperitonealer Seruminjektion subkutan injiziert wurde;
3. Heilversuche an Kaninchen, indem das Gift intravenös und nach verschiedenen Zeiten das Antitoxin intravenös injiziert wurden;
4. Immunisierungsversuche an Kaninchen. Das Antitoxin wurde in die Randvene des einen Ohres injiziert, das Gift sofort hinterher in die Vene des anderen Ohres.

MARX resumiert seine Resultate folgendermaßen: „Die toxinneutralisierende Kraft eines Diphtherieheilserums, id est der Gehalt desselben an I.-E. und die immunisierende und heilende Wirkung eines Serums sind 3 Faktoren, die in strengster Beziehung stehen und zwar in der Weise, daß der Immunisierungs- und Heileffekt eines Serums dem Gehalt an I.-E. direkt proportional ist.“

Während MARX lebende Kulturen als zu exakten Messungen wenig brauchbar verwarf, benützte CRUVEILHIER[33]) im Institut Pasteur gerade virulente Diphtheriekulturen, um eine Reihe von Versuchen ähnlicher Art anzustellen. Er vergleicht die Wirkung von Seris verschiedenen Gehalts an Antitoxineinheiten in Immunisierungs- und Heilversuchen.

Cruveilhier kommt zu einem wesentlich anderen Resultate als Marx, indem er findet, daß der heilende Effekt eines Serums nicht ausschließlich von dessen Gehalt an Antitoxineinheiten abhängig sei, und daß dieses Verhalten nicht genüge, um ein exaktes Maß für die Brauchbarkeit eines Serums abzugeben, die sich besser durch dessen therapeutische Wirkung bestimmen lasse.

In Frankreich hält man daran fest, daß der große Gehalt an Antitoxin, wenn auch erwünscht, so doch nicht die Hauptsache sei, und daß es im Serum andere Stoffe gebe, die Bedeutung hätten. Deshalb geschieht die Bewertung des Diphtherieserums so, daß man das Serum 1. auf seine Schutzkraft und 2. auf seine Heilkraft prüft.

1. Die Schutzkraft wird ziemlich so wie von Roux, Martin und Chaillou[101]) angegeben geprüft. Man bezeichnet die Schutzkraft eines Serums mit 50000, wenn $^1/_{100}$ ccm (mit 100000, wenn $^1/_{200}$ ccm) Serum ein Meerschweinchen von 500 g gegen eine Dosis Gift schützt, die ein Kontrolltier von dem gleichen Gewicht in 30—40 Stunden töten würde. Das Serum wird 12 Stunden vor dem Gifte einverleibt. Das Tier darf nach 4—6 Tagen keinen Gewichtverlust erlitten haben.

2. Die Heilkraft wird dadurch gemessen, daß man dem Meerschweinchen erst eine in 36—40 Stunden tötende Dosis und 6 Stunden später das Serum gibt. Lebt das Meerschweinchen am 6. Tage, so wird es als geheilt betrachtet.

Steinhardt und Banzhof[111]) (New York) haben die Versuche von Cruveilhier aufgenommen und geben an, ganz andere Resultate erreicht zu haben. Sie haben Vergleiche von Sera von folgendem Antitoxingehalt vorgenommen: Ein 200faches mit einem 1000fachen; ein 600faches mit einem 1300fachen und ein 600faches mit einem 335fachen und mit einem 200fachen. Die drei letzten Sera waren von demselben Pferd während der Immunisierung entnommen. Diese Autoren geben an, daß sie weder den kurativen, noch den präventiven Effekt des Serums betreffende Eigenschaften des Serums entdeckt haben, die nicht bei der gewöhnlichen Ehrlichschen Serumprüfung gemessen werden, und daß der Heilwert des Serums von dem Antitoxingehalt abhängig ist.

In jüngster Zeit hat Kraus die von Roux negierte Beziehung zwischen Antitoxingehalt und Heilwert des Diphtherieserums im Sinne von Roux nachzuweisen versucht. Die beim Studium des Dysenterieserums (Kraus und Doerr) und Choleraserums (Kraus und Pribram) gewonnenen Erfahrungen über die Unabhängigkeit der Wertigkeit eines antitoxischen Serums i. e. von der Menge der Antitoxine zu dessen Heilwert, führten Kraus und Schwoner dazu, das Diphtherieserum in dieser Richtung zu untersuchen. Die hierdurch gewonnenen Tatsachen fassen die Autoren in einer Arbeit „Über Beziehungen des Antitoxingehaltes des Diphtherieserums zu dessen Heilwert" (Centralbl. für Bakt. 1908) zusammen. Die Schlußsätze dieser Arbeit lauten:

1. Zwischen Antitoxinmengen und Heilwert des Diphtherieserums bestehen keine fixen Beziehungen;

2. dem hochwertigen (300—600fachen) Diphtherieserum kommt in der Regel geringere Heilwirkung zu als solchem, welches wenigerwertig ist;

3. der Heilwert eines Serums i. e. Avidität scheint von der Zu- oder Abnahme der Antitoxinmenge während der Immunisierung unabhängig zu sein;

4. die Avidität der antitoxischen Sera ist eine prinzipielle Eigenschaft des Antitoxins und soll bei der Wertbemessung berücksichtigt werden;

5. die bisherige Wertbestimmung nach EHRLICH zeigt in ausgezeichneter Weise die Menge der Antitoxine an, berücksichtigt aber nicht den Heilwert.

Die Prüfung auf Unschädlichkeit.

Außer der Messung der antitoxischen Stärke ist die Prüfung des Serums auf Unschädlichkeit von Wichtigkeit.

Die sicherste Garantie in dieser Beziehung liegt darin, daß man das Serum von der Venaesectio bis zu dessen Verfüllung zu verfolgen vermag.

Das serumliefernde Tier muß vor Beginn der Immunisierung (mit Tuberkulin, Malleïn) geprüft worden sein, und im Augenblick des Aderlasses muß es völlig frisch und fieberfrei, ohne Abzesse oder größere, schmerzhafte Infiltrationen sein. Eine Krankheit, welche bei Pferden häufig vorkommt, ist der Tetanus. Da diese Krankheit äußerst verhängnisvoll ist, und da (in Amerika und Italien) Tetanusfälle nach Injektion von Diphtherieserum aufgetreten sind, muß man höchst vorsichtig sein, um diese Komplikation zu vermeiden.

Dies geschieht teils dadurch, daß man das betreffende Pferd nach dem Aderlaß 14 Tage lang beobachtet, teils dadurch, daß man einem Meerschweinchen 10 ccm des abgelassenen Serums subkutan injiziert und dessen Gesundheitszustand 14 Tage hindurch kontrolliert. Wie notwendig diese Vorsichtsmaßregeln sind, geht aus folgender Beobachtung hervor[67a]): Einem diphtherieimmunisierten Pferde wurde am 15. eine Toxininjektion von 300 ccm gegeben und 6 Tage später, 9 l Blut entnommen. Sowohl vor als bei dem Aderlasse, wie auch während der ersten 4 Tage nach demselben, war nicht das geringste Abnorme zu bemerken. 5 Tage danach, am 26., bekam das Tier Tetanus, der sich so furibund entwickelte, daß man das Pferd wenige Stunden nach dem Erscheinen der ersten Symptome töten mußte. Mit dem am 21. abgelassenen Blute wurden am Tage des Aderlasses 10 ccm einem Meerschweinchen unter die Haut injiziert, welches bis zum 27. durchaus keine krankhaften Symptome darbot und 70 g an Gewicht zunahm. Erst am 28., 7 Tage nach der Injektion, erschienen die ersten schwachen Anzeichen des Tetanus, an welchem das Tier 2 Tage darauf starb. Hätte man dieses Serum gar zu eilig in den Handel gebracht, so könnte großes Unheil hieraus entstanden sein.

In diesem Falle zirkulierte Tetanusgift lange vor dem Beginn der Symptome frei im Serum. Das durch eine Chamberlandkerze filtrierte Serum zeigte dasselbe tetanisierende Vermögen und die tödliche Minimaldosis für Meerschweinchen betrug 5 bis 10 ccm.

Auch vor Infektion mit Rotz muß man auf der Hut sein; entweder unternimmt man vor Beginn der Immunisierung eine Malleininjektion oder man setzt dem Serum 0,5 % Phenol zu, wenn das Serum nicht durch eine bakteriendichte Porzellankerze, z. B. Chamberland Marke F, filtriert wird.

Die Konservierung mit antiseptischen Mitteln ist in Deutschland obligatorisch, um die Möglichkeit einer Übertragung von Rotz, der im Anfangsstadium schwer zu diagnostizieren ist, auszuschließen. BONHOFFS[16]) Untersuchungen zufolge stirbt der Rotzbazillus in Serum, das mit 0,5 % Phenol versetzt war, nach 24 Stunden.

Unter allen Umständen ist eine subkutane Einspritzung an Meerschweinchen von 10 ccm Serum durchaus notwendig. Man muß völlig

normale Tiere benützen, die nicht zu vorhergehenden Wertbemessungszwecken gebraucht wurden, da Tiere der letzteren Art, wie THEOBALD SMITH nachwies, im höchsten Grade gegen Serum überempfindlich sind (Anaphylaxie).

Filtration durch eine zuverlässige Porzellankerze gewährt die Sicherheit, daß keine pathogenen Mikroben auf Menschen übertragen werden können, und in vielen Instituten wird eine solche Filtration angewandt.

Übrigens muß das Serum völlig klar sein und darf höchstens einen geringen Bodensatz zeigen. Serumproben mit bleibenden Trübungen sind zu kassieren.

Ferner muß das Serum unbedingt steril sein. Man sichert sich, teils indem man eine gewisse Anzahl Serumflaschen in den Thermostaten stellt und 8 Tage hindurch beobachtet, ob sie sich klar erhalten, teils indem man aerob und anaerob züchtet. Enthält das Serum ein Antiseptikum, so muß man weit größere Mengen Bouillon benutzen, um dem das Wachstum hemmenden Einflusse desselben zu entgehen, z. B. 0,05 ccm Serum zu ein Liter Bouillon. Geimpftes Agar und die geimpfte Bouillon müssen nach wenigstens 8 Tagen steril bleiben.

Um sich zu überzeugen, ob ein Serum einen größeren Karbolgehalt hat, als zulässig, injiziert man Mäuse.

Über 0,5 ccm einer 0,5 %igen Phenollösung (0,0025 g) töten eine Maus von 15 g nach subkutaner Injektion. Von einer Trikresollösung ist hierzu 1 ccm (0,005 g) erforderlich (ROSENAU)[96]. Kleinere Dosen als die genannten zeigen die charakteristischen Vergiftungssymptome (Zittern, Krämpfe), jedoch nur vorübergehend.

In der deutschen Staatskontrolle erhält eine Maus von 15 g 0,5 ccm Serum subkutan injiziert. Stirbt die Maus, so enthält das Serum mehr als 0,5 % Phenol.

Eine Eindickung des Serums, um eine Konzentration des Antitoxingehalts desselben zu erzielen, ist unstatthaft; die deutsche Staatskontrolle ist deshalb beauftragt worden, alle Diphtheriesera auf ihren Eiweißgehalt zu untersuchen und diejenigen Sera, welche mehr als 12 % Eiweiß enthalten, zu beanstanden.

Die staatliche Kontrolle.

In Deutschland ist eine gesetzliche Bestimmung eingeführt, die für alle Staaten, in welchen die Herstellung nicht vom Staate selbst besorgt wird, als Muster dienen kann. Die staatliche Kontrolle umfaßt teils die Kontrolle an der Fabrikationsstelle, teils die Prüfung im Institut für experimentelle Therapie.

Am Fabrikationsorte soll der Tierbestand der dauernden Kontrolle eines approbierten Tierarztes unterstehen. Es soll ein Hauptbuch über die Tiere, die Blutentnahme usw. geführt werden. Ferner ist ein staatlicher Kontrollbeamter (Abnahmebeamter) anzustellen. Dieser überwacht die sachgemäße Herstellung des Serums in der Fabrik und führt ein Dienstbuch über die Nummer der Pferde, die Aderlässe, die Wertigkeitsbestimmungen usw. Es wird eine bestimmte Literzahl Serum als Minimalmenge zur Prüfung verlangt. Aus einem solchen Vorrat von Serum entnimmt der Beamte acht Fläschchen à 5 ccm, welche er versiegelt

und nebst den erforderlichen Aufschlüssen an die Prüfungsstation in Frankfurt a. M. einsendet. Ferner hat er das von ihm in Klausur genommene Serum so lange in dem Stammgefäße unter Verschluß zu halten, bis die Entscheidung des Instituts über die Zulässigkeit des Serums eingelaufen ist. Erst wenn diese Mitteilung positiv ausfällt, darf das Sammelgefäß geöffnet und das Serum unter seiner Aufsicht in Flaschen abgefüllt werden. Die Flaschen werden mit dem Stopfen mit Papier verbunden und plombiert, mit Kontrollnummer und Angabe über den Ort der Herstellung und die Fabrikationsstätte versehen.

Was die Einzelheiten betrifft, verweisen wir auf Ottos[83]) Werk.

Für die Wertbemessung des Diphtherieserums findet sich in Deutschland folgende von Ehrlich ausgearbeitete und vom Ministerium genehmigte Prüfungsvorschrift, die mit den später hinzugekommenen Änderungen hier angeführt wird:

Amtliche Prüfungsvorschrift.

1. Als Maßstab für die Serumbestimmung dient ein unter Ausschluß von Sauerstoff und Wasser konserviertes Serumpulver von genau bekanntem Wert. Dasselbe befindet sich in genau abgemessenen Quantitäten in besonders gearbeiteten Vakuumröhrchen. Die jetzigen Apparate enthalten 2,5 g eines Trockenantitoxins von 2544facher Stärke.

2. Die Auflösung des Serums hat, um eine möglichst genaue Haltbarkeit zu gewährleisten, in einem aus $^2/_3$ Glyzerin und $^1/_3$ 0,85 $^0/_0$iger Kochsalzlösung bestehenden Gemenge zu erfolgen. Es ist zunächst alle zwei Monate ein Röhrchen zu öffnen und eine neue Lösung herzustellen. Von dem zurzeit im Institut aufbewahrten Trockenserum wird der Inhalt eines Röhrchens in 636 ccm des oben angegebenen Gemisches gelöst und so eine Testserumlösung von 10facher Stärke hergestellt.

3. Die jetzige Testgiftdosis wird mit Hilfe einer I.-E. ermittelt, wie eine solche z. B. in 1 ccm der 10fachen Verdünnung des in Nr. 2 erwähnten 10fachen Testserums enthalten ist. Es wird diese Serummenge mit steigenden Mengen Gift versetzt und durch eine möglichst genaue Versuchsreihe der Grenzwert ermittelt, bei dem gerade ein den Tod des Versuchstieres in den ersten vier Tagen herbeiführender Giftüberschuß manifest wird. Das so ermittelte Giftquantum stellt die jetzige Prüfungsdosis dar. Mit der gleichen Serumdosis erfolgt zur genauen Charakterisierung des Giftes die Bestimmung eines zweiten Grenzwertes, welcher die Giftdosis zu ermitteln hat, welche bei der Mischung mit der obigen Serummenge gerade neutralisiert wird.

4. Die Bestimmung des Wertes eines Diphtherieserums erfolgt mittels der nach Nr. 3 festgestellten Testgiftdosis in folgender Weise: Die betreffende Testgiftdosis wird mit 4 ccm einer dem angegebenen Prüfungswert entsprechenden Serummenge gemischt.

Da die Testgiftdosis auf 1 ccm des einfachen oder 4 ccm eines $^1/_4$fachen Normalserums eingestellt wird, wird bei einem Serum von xfacher Stärke die Serumverdünnung $^1/_4$ Xfach sein müssen, also bei der Prüfung eines 100fachen Serums $^1/_{400}$ betragen.

5. Die erhaltene Mischung wird einem Meerschweinchen von 250 bis 280 g rein subkutan injiziert. Sterben bei der von den beiden Mitgliedern des Institutes ausgeführten Prüfung die Versuchstiere innerhalb der ersten vier Tage, so besitzt das Serum nicht die angegebene Stärke.

Sterben die Tiere innerhalb des fünften und sechsten Tages, so steht das Serum knapp an der Grenze des Zulässigen und ist, um die vorraussichtliche baldige Einziehung zu vermeiden, den Fabriken eine 5—10 % betragende Aufbesserung zu empfehlen. Indurationon, die bei den Versuchstieren auftreten, sollen dagegen keinen Grund zur Beanstandung geben.

Von den gestorbenen Tieren ist eine Sektion vorzunehmen und insbesondere auf Komplikationen mit vorher bestehenden Krankheiten (Tuberkulose, Pseudotuberkulose, Pneumonie) zu achten, welche eine Überempfindlichkeit des Versuchstieres bedingen können.

6. Als Testgift können sowohl flüssige, wie feste Gifte verwandt werden, falls bei ihnen die in Nr. 3 definierten Grenzwerte scharf zu ermitteln sind. Kommen flüssige, durch Toluol konservierte Gifte zur Verwendung, so soll dieses nur geschehen, wenn: 1. durch längere Voruntersuchungen die Haltbarkeit der Prüfungskonstanten erwiesen ist. 2. wenn die Prüfungsdosis 1 ccm nicht überschreitet. Die Untersuchungen über die Qualität der Testgifte sind weiter fortzusetzen.

7. Die Testgifte sind, wenn flüssig, allmonatlich durch Kulturverfahren auf Sterilität zu prüfen.

8. Das Testgift ist alle 6 Wochen mittels der Testserumdosis neu zu bestimmen, indem jedesmal die Prüfungsdosis und der Glattwert neu ermittelt wird. Sollte bei der Nachprüfung sich eine irgendwie erhebliche Abweichung von der Prüfungsdosis herausstellen, so ist das Gift als in Zersetzung befindlich anzusehen und durch ein neues zu ersetzen.

9. Die Fabrikationsstätten sind darauf aufmerksam zu machen, daß das Testgift in kleineren Quantitäten sich leicht zersetzt und daß insbesondere schon eine kurze Belichtung eine erhebliche Abschwächung hervorrufen kann. Es ist daher den Fabriken anzuraten, schon alle 3 Wochen das Gift von neuem vom Institut zu beziehen."

Die Prüfungen werden voneinander unabhängig von zwei Beamten des Institutes unternommen; nur wenn ihre Resultate miteinander übereinstimmen, darf das betreffende Serum Gegenstand des Handels werden.

Die Kontrolle umfaßt also außer der Prüfung der Sterilität und der Unschädlichkeit auch die Vergewisserung, daß der Antitoxingehalt nicht niedriger ist als angegeben. Eine genaue Austitrierung der Menge findet dagegen nicht statt.

Zur Kontrolle gehört auch eine Nachprüfung jedes zugelassenen Serums, die zweimal angestellt wird, nämlich zwei Monate und zwei Jahre nach der ersten Prüfung. Dieselbe besteht in einer Untersuchung des Wertgehalts des Serums. Alle Sera, die eine Abschwächung von mehr als 10 % zeigen, werden als „abgeschwächt" dem Ministerium gemeldet und ihre Einziehung beantragt. Über mehr als zwei Jahre hinaus erstreckt die Nachprüfung sich nicht, da Sera, die sich so lange erhalten haben, keine wesentliche und schnelle Abschwächung mehr zeigen. Bei dieser Nachprüfung findet auch eine erneute Prüfung auf Keimfreiheit statt, da zuweilen Infektion durch den Pfropfen hindurch erfolgt. Mit dieser Nachprüfung auf Sterililät ist außer dem Frankfurter Institut eine Reihe Krankenhäuser beauftragt, die an das Institut berichten, wenn sich eine Flasche infizierten Serums findet. Es erfolgt dann sofortige Einziehung dieser Serumnummer.

Auch die Vereinigten Staaten haben den Verkauf von Seren, Toxinen und analogen Produkten durch „The act of Congress approved July 1. 1902" geordnet. In gewissen Zwischenräumen werden Präparate gekauft und im Hyg. Laboratory (U. S. Publ. Health and Mar. Hosp. Serv.)

in Washington geprüft. Die Prüfung ist ungefähr so wie die im Frankfurter Institut[95]). Man sieht ungern, daß Sera, deren Stärke weniger als 250 Einheiten beträgt, zur Anwendung kommen. Findet sich ein Serum, das weniger als 200 I.-E. pro Kubikzentimeter enthält, so wird dies dem „Surgeon-General" angezeigt, der die nötigen Maßregeln trifft, um den Verkauf dieses Präparats zu verhindern. (S. ROSENAU[96]).

Das antidiphtherische Serum ist in Deutschland, den Vereinigten Staaten und Spanien in die Pharmakopöe aufgenommen worden, und zwar unter folgenden Vorschriften.

Deutschland.

Das Diphtherieheilserum ist durch Kaiserliche Verordnung vom 21. Dez. 1894 dem freien Verkehr entzogen und in die Reihe derjenigen Arzneistoffe aufgenommen, welche nicht außerhalb der Apotheken feilgehalten und verkauft werden dürfen.

Die Vorschrift der Pharmakopöe lautet:

Serum antidiphthericum — Diphtherieheilserum.

Blutserum von Pferden, die gegen das Diphtheriegift immunisiert sind. Es wird von den dazu berechtigten Fabrikationsstätten in den Handel gebracht, nachdem es durch das Kgl. Preuß. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. auf seinen Gehalt an Immunisierungseinheiten (= I.-E.) auf Keimfreiheit und Gehalt an Konservierungsmitteln (Phenol und Trikresol) geprüft und zum Verkauf zugelassen worden ist.

Es wird in flüssiger und fester Form in den Handel gebracht.

Flüssiges und festes Diphtherieserum werden nur in Fläschchen abgegeben, deren Verschluß staatlich plombiert ist und welche in einer Aufschrift Angaben über die Fabrikationsstätte, den Antitoxingehalt eines Kubikzentimeters und den des ganzen Inhaltes des Fläschchens, die Kontrollnummer und den Tag*) der amtlichen Kontrolle enthalten. Diese Fläschchen befinden sich in lichtdicker Verpackung, welche dieselben Angaben enthält. Die Plomben tragen auf der einen Seite einen Adler oder einen Löwen; die andere Seite gibt die Zahl der im Gesamtinhalt vorhandenen I.-E. an.

Das flüssige Diphtherieheilserum stellt eine gelbliche, klare, höchstens einen geringen Bodensatz enthaltende Flüssigkeit dar, welche den Geruch des Konservierungsmittels besitzt. Es wird in Fläschchen von verschiedener Form und Farbe abgegeben, deren Inhalt dem Werte von 100 bis 3000 I.-E. entspricht. Die am meisten gebräuchlichen Abfüllungen sind:

Nr. 0 = 200 I.-E. Nr. II = 1000 I.-E.
Nr. I = 600 I.-E. (resp. 500 I.-E.) Nr. III = 1500 I.-E.

Diphtherieheilserum, welches mehr als 300 I.-E. in einem Kubikzentimeter enthält, gilt als hochwertiges**) Serum.

Das feste Diphtherieheilserum ist getrocknetes hochwertiges Diphtherieheilserum, welches in einem Gramm mindestens 5000 I.-E. enthält und keinerlei antiseptische oder sonstige differente Zusätze erhalten hat.

---

*) Die Angabe des Tages der amtlichen Kontrolle darf laut Ministerialerlaß vom 13. Dezember 1904 in Zukunft wegfallen.

**) Laut Ministerialerlaß vom 13. August 1904 müssen alle Sera mindestens 350fach sein; als hochwertig bezeichnet man nunmehr in der Prüfungstechnik nur noch Sera, welche mindestens 500 und mehr I.-E. in einem Kubikzentimeter enthalten.

Es stellt gelbe, durchsichtige Blättchen oder ein gelblich-weißes Pulver dar, welches sich mit 10 Teilen Wasser zu einer in Farbe und Aussehen dem flüssigen Diphtherieheilserum entsprechenden Flüssigkeit löst. Es ist in Einzeldosen von je 250 und 1000 I.-E. in weißen Glasstöpselfläschchen von 2 oder 6 ccm Inhalt abzugeben. Die Lösung soll mittels sterilisierten Wassers von 1 ccm auf je 250 I.-E. in den Originalfläschchen jedesmal frisch bereitet werden; sie soll bis auf kleine Eiweißflöckchen klar sein und in den Originalfläschchen abgegeben werden.

Serum mit starker, bleibender Trübung oder stärkerem Bodensatze, sowie Serum einer bestimmten Kontrollnummer, dessen Einziehung verfügt wurde, darf in den Apotheken nicht abgegeben werden.

An einem kühlen Ort und vor Licht beschützt aufzubewahren.

Vereinigte Staaten.

Antidiphtherieserum. Diphtheria antitoxin.

Eine Flüssigkeit, ausgeschieden aus dem koagulierten Blute eines Pferdes (Equus caballus Linné), das durch Inokulation von Diphtherietoxin immunisiert worden ist. Das Serum ist in zugeschmolzenen Glasgefäßen an einem dunklen Orte bei Temperaturen zwischen 4,5° und 15° C. (40° und 59° F.) aufzubewahren.

Eine gelbliche oder gelbbraune, durchsichtige oder ganz leicht getrübte Flüssigkeit, geruchlos oder mit unbedeutendem Geruch, der von dem Vorhandensein des als Konservierungsmittel benutzten Antiseptikums herrührt.

Spezifisches Gewicht: 1,025—1,040 bei 25° C. (77° F.).

Antidiphtherisches Serum nimmt allmählich an Stärke ab, indem der Verlust im Laufe eines Jahres zwischen 10 und 30 Prozent schwankt. Jedes Gefäß muß mit einer Etikette versehen sein, auf welcher angegeben sind: Die in Antitoxin-Einheiten ausgedrückte Stärke des antidiphtherischen Serums, der Name und das Volumenprozent des der Flüssigkeit zugesetzten Antiseptikums (wenn ein solches angewandt wurde), das Datum, an welchem das antidiphtherische Serum zuletzt geprüft wurde, und das äußerste Datum, an welchem man noch auf das Vorhandensein der angegebenen Stärke rechnen kann.

Der in Antitoxin-Einheiten ausgedrückte Standard der Stärke soll der von United States Public Health and Marine Hospital Service approbierte sein.

Durchschnittsdosis = 3000 Einheiten.

Immunisierungsdosis für gesunde Individuen = 500 Einheiten.

Bestimmung kleinster Mengen Diphtherieantitoxin.

Während EHRLICHS Methode zur Wertbemessung des Diphtherieantitoxins vortrefflich ist, wenn Antitoxin in einigermaßen reichlicher Menge, um 0,1 I.-E. herum, zur Verfügung ist, genügt sie dagegen nicht, wenn es sich um die Bestimmung von Hundertsteln einer Immunisierungseinheit handelt. MARX[73]) hat auf Veranlassung und in Gemeinschaft mit EHRLICH eine besondere Methode ausgearbeitet. Bei dieser wird die ödemerregende Wirkung des Diphtheriegiftes als Indikator benutzt.

Bekanntlich reicht bei mehreren Diphtheriegiften ein Bruchteil der absolut tödlichen Dosis aus, um in allen Fällen ausgedehntes Ödem an der Injektionsstelle hervorzurufen. Bei zwei von MARX unter-

suchten Giften genügte in einem Falle $^1/_7$ derselben, im anderen $^1/_{12}$. Diese Mengen werden als Testdosen benutzt. Da man hier mit großen Verdünnungen des Toxins und des Serums arbeitet, läßt man die Mischungen zwei Stunden im Brutschrank bei 37 ° und dann 22 Stunden im Eisschranke stehen, um sicher zu sein, daß die gegenseitige Reaktion des Toxins und des Antitoxins beendet sei. Zugleich muß man Kontrollversuche mit der betreffenden Giftmenge allein vornehmen, nur daß an Stelle der Serumverdünnung das entsprechende Volumen physiologischer Kochsalzlösung hinzugefügt wird.

Bei dieser Methode muß man sich es ebenfalls angelegen sein lassen, die zu injizierende Flüssigkeitsmenge möglichst zu beschränken. Teils erhält man nach Injektion kleiner Flüssigkeitsmengen (0,5 ccm, nie mehr als 0,6 ccm) streng lokalisierte und darum feinere Reaktionen, und kann außerdem an einem Meerschweinchen gleichzeitig 2 Prüfungen vornehmen.

Nach Verlauf von 48 Stunden werden sämtliche Tiere getötet.

Mit einem besonders geeigneten Gifte, von welchem 0,0004 ccm ($^1/_{12}$ der tödlichen Dosis) eine recht kräftige, nie versagende lokale Reaktion hervorrief, erhielt MARX sehr scharfe Resultate. Als Testdosis wandte er 0,0005 ccm, $^1/_{10}$ der absolut tödlichen Dosis, an, die starkes Ödem am Orte der Injektion erzeugten.

Als Beispiel wird folgende Versuchsreihe angeführt:

Serumdosis + 0,0005 ccm Gift	Erfolg
$^1/_{600}$ I.-E. . . .	Injektionsstelle glatt
$^1/_{800}$ " . . .	desgl.
$^1/_{1000}$ " . . .	Injektionsstelle glatt, minimale Rötung
$^1/_{1200}$ " . . .	desgl.
$^1/_{1500}$ " . . .	Ödem schwächer als Kontrolle
$^1/_{2000}$ " . . .	Starkes Ödem, wie Kontrolle
Kontrolle	Starkes Ödem

Wie hieraus hervorgeht, ist die Mischung 0,0005 ccm Gift + $^1/_{1200}$ I.-E. Meerschweinchen gegenüber fast unwirksam, entspricht mithin L_0. Man kann also mit einem solchen Gifte $^1/_{1200}$ I.-E. messen. Da man durch zweckmäßige Ansetzung der Versuchsanordnung dafür sorgen kann, daß man keine größeren Mengen als 0,2 ccm zu injizieren braucht, so ist man also imstande, nach diesem Verfahren den Wert eines Serums, das bis zu $^1/_{240}$ I.-E. in 1 ccm enthält, mit Genauigkeit zu messen.

Wie MARX hervorhebt, hat diese Methode Bedeutung für den Nachweis antitoxischer Substanzen bei normalen Individuen, die Resorption und Aussonderung von Antitoxin usw. Mit Erfolg wurde sie von mehreren Untersuchern angewandt, z. B. von SALGE[102]) zum Nachweis kleinster Mengen Antitoxin im Blute von Säuglingen, die mit Ammenmilch Diphtherieantitoxin stomachal eingeführt erhielten, außerdem auch von UFFENHEIMER[113]) bei an Diphtherie erkrankten Kindern.

Haltbarkeit und physikalische Eigenschaften des Diphtherieantitoxins.

In sterilem Zustande behält das Diphtherieserum seine antitoxischen Eigenschaften sehr lange, wenn es kalt, vor Licht- und Luftzutritt geschützt, aufbewahrt wird. Im Laufe der Zeit schwächt es sich jedoch etwas ab, und diese Abschwächung scheint hauptsächlich bei ganz jungem und hochwertigem Serum vorzukommen.

Die größte Erfahrung auf diesem Gebiete hat unzweifelhaft das Kgl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M., wo, wie früher erwähnt, alle Sera, die die staatliche Kontrolle passiert haben und in den Handel gekommen sind, 6 und 24 Monate nach der Zulassung einer Nachprüfung zu unterwerfen sind. Nach MARX[71]) sind von den während der letzten 8 Jahre in den Handel gebrachten 1104 Prüfungsnummern von Diphtherieserum wegen Abschwächung eingezogen worden 34 = 3,08 Prozent. Die Sera haben sich abgeschwächt

innerhalb	3— 4	Monaten	2	Nummern
„	6—10	„	9	„
„	10—25	„	23	„

Die beiden Sera, die schon nach 3 bzw. 4 Monaten zur Einziehung kommen mußten, waren relativ frisch bei ihrer Einsendung an die Prüfungsstelle.

Es geht übrigens ein ganz eigentümlicher Umstand aus dieser zusammenfassenden Übersicht hervor. Die Anzahl derjenigen Sera, die wegen Abschwächung eingezogen werden mußten, hat im Laufe der Jahre sehr bedeutend abgenommen. So sind 12 Sera des Jahres 1896 eingezogen worden, während es nur nötig war, von den Seris 1901 2 Sera einzuziehen, trotz der steigenden Produktion von Diphtherieantitoxin.

Während der ersten Zeiten der Serumtherapie setzte man erhebliches Mißtrauen in das Serum, das zu alt geworden war, und mehrere Produktionsstellen hatten es sich zur festen Regel gemacht, ihre Präparate schon nach Verlauf von 3 Monaten umzutauschen. Den oben angeführten Beobachtungen zufolge, die mit anderen Erfahrungen, wie auch mit meinen eigenen Beobachtungen übereinstimmen, wird in der Regel kein Grund vorliegen, irgendwelches Bedenken zu tragen, sogar mehrere Jahre altes Diphtherieantitoxin zu gebrauchen (siehe ebenfalls ABBA[1])). Ein solches, das mehr als 2 Jahre alt ist, wird in der Praxis nur selten zur Anwendung kommen.

Nach OTTO[83,85]) scheinen auch tropische Einflüsse den Wirkungswert der Diphtheriesera im allgemeinen nicht herabzusetzen; wenigstens war dies nicht mit Seris der Fall, die während des Transports nach China längere Zeit hindurch an Bord von Schiffen und an Land aufbewahrt worden waren.

Nach KINYOUN und HITCHENS[57]), die 100 verschiedene amerikanische Handelssera untersuchten, ist die Abschwächung recht variabel und steht in keinem direkten Verhältnis zu dem Antitoxingehalt oder zu der Aufbewahrungszeit. Nach 12—15 Monaten zeigten ca. 65 % der Sera eine Abschwächung der antitoxischen Stärke um ca. 25 %.

Das Licht hat nach der Meinung der meisten Untersucher eine herabsetzende Wirkung auf die Stärke des Diphtherieserums. So fanden PALMIRSKI und ORLOWSKI[87]), daß Serum, welches am südlichen Fenster bei teilweise direktem Licht gestanden hatte, $^1/_3$ seiner ursprünglichen Stärke verloren hatte. Einen bedeutend geringeren Effekt, fast gar keinen Antitoxinverlust, erzeugte nach MARENGHI[68]) die römische Julisonne im antidiphtherischen Serum.

Eine etwas eingehendere Untersuchung stellte F. MÜLLER[77]) über die Einwirkung von Licht verschiedener Farben an. Er glaubt, aus seinen Untersuchungen den Schluß ziehen zu können, daß das Antidiphtherieserum eine nicht unbeträchtliche Widerstandsfähigkeit gegen Tageslicht besitzt (im Laufe von 4 Monaten wird das dem Tageslichte ausgesetzte Serum jedoch merkbar abgeschwächt) und daß unter den verschiedenen

Teilen des Spektrums gelbes und rotes Licht viel weniger als grünes und blaues seine antitoxische Wirksamkeit herabsetzen.

Unter der Einwirkung des Lichtes verändert das Serum seine Farbe. Im Tageslichte verliert das ursprünglich goldgelbe Serum in wenigen Tagen seine Farbe fast vollständig; im blauen Licht geschieht dies nach wenigen Wochen und im gelben nach etwas längerer Zeit, während das Serum im roten und grünen Licht nicht gebleicht wurde.

Müllers Versuchsanordnung war indes, nach den Forderungen der modernen Lichtbiologie bemessen, nicht einwandfrei.

Wärme erträgt das Diphtherieantitoxin nur schlecht. Selbst das Stehen bei 37 ° einige Monate hindurch schwächt seine Stärke ziemlich bedeutend ab (Müller).

Eine 5 Stunden dauernde Erwärmung auf 55 ° in offener und geschlossener Röhre erträgt es, ohne seine antitoxische Aktivität zu verlieren (Marenghi [68]).

Nach Dziergowsky [43]) behält das antidiphtherische Serum seine Kraft fast vollkommen bei 50 °—60 °; bei 60 °—65 ° wird es abgeschwächt, und zwar infolge einer partiellen Ausscheidung von Eiweißstoffen, welche Antitoxin aus der Lösung mitreißen. Bei 65°—70° verliert es seine antitoxische Kraft vollkommen.

H. van de Velde [117]) fand, daß das Antidiphtherieserum, wenn es eine Stunde lang Temperaturen von 60°, 65° und 70° ausgesetzt worden war, merklich an antitoxischer und antiinfektiöser Kraft eingebüßt hatte.

Eine genaue Bestimmung der Destruktionstemperatur wird dadurch erschwert, daß im Serum gewöhnlich schon bei etwa 65 ° leichte Koagulation zu beginnen pflegt, die bei 70° stark ausgesprochen ist.

Starke Kälte scheint keinen Einfluß auf das Diphtherieantitoxin zu üben. Gorjansky meint freilich, daß das einer lange andauernden Kältewirkung (÷ 3 bis ÷ 16 ° R.) ausgesetzte Serum an seinen antitoxischen Eigenschaften Einbuße erleide; dies stimmt aber nicht mit anderen Beobachtungen überein, die z. B. von Marenghi [68]) und Bujwid [24]) gemacht wurden, welcher letztere die Ausfrierung des Serums als Konzentrationsmethode benutzt, wodurch er eine langdauernde Haltbarkeit des Serums erzielt. Auch die Erfahrungen mit dem eingetrockneten Testserum deuten darauf hin, daß die Abschwächung durch niedrige Temperatur verhindert wird.

Luft und Gase schwächen das Diphtherieantitoxin allmählich ab. Müller [77]) untersuchte, wie dasselbe sich verhält, wenn es unter atmosphärischer Luft, Sauerstoff, Kohlensäure und Wasserstoff aufbewahrt wird; hierbei verliert das Serum nach und nach seine antitoxische Stärke, der Sauerstoff macht es schon nach 3 Monaten ganz unwirksam.

Behandelt man das Diphtherieserum mit Säuren oder Alkalien, so schwindet die antitoxische Wirkung. Dasselbe gilt von tryptischer Verdauung und peptischer Verdauung mit HCl oder Milchsäure (Belfanti und Carbone) [12]).

Filtration durch Porzellankerzen.

Meistens wendet man zur Filtration des Serums Porzellanfilter an, teils um dasselbe von mechanischen Unreinheiten zu befreien, teils um es mit Sicherheit keimfrei zu machen. Es ist deshalb eine Frage von gewisser technischer Bedeutung: Wie verhält sich der Antitoxingehalt bei dem Durchgang durch die Porzellankerze? Hierüber haben verschiedene Forscher Untersuchungen angestellt, und zwar mit verschiedenem Ergebnis.

DE MARTINI[70]) beobachtete, daß, wenn man Diphtherieantitoxin durch ein CHAMBERLAND-Filter passieren läßt, dasselbe einen gewissen Grad seiner Wirkung einbüßt und daß ebenfalls ein Verlust an Eiweiß stattfindet. Seiner Meinung nach ist der Verlust progressiv, der benutzten Kerze gemäß verschieden, und kann zuweilen so stark werden, daß das Filtrat schließlich nur eine wässerige, fast ganz eiweißfreie und antitoxinfreie Flüssigkeit wird.

Im Gegensatz hierzu fand DZIERGOWSKY[42]) bei der Untersuchung CHAMBERLANDscher Kerzen, Marke F, die vorher sterilisiert, getrocknet und als vollkommen undurchlässig für Bakterien erprobt waren, daß das Diphtherieheilserum hierdurch weder einen Verlust an Heilkraft noch an Eiweißgehalt erleidet.

Um aufzuklären, wie diese beiden Forscher zu so entgegengesetzten Ergebnissen gelangen konnten, stellte COBBETT[28]) neue Versuche an, aus denen er folgende Schlußfolgerungen zog:

1. Die Filtration von Diphtherieheilserum mittels CHAMBERLANDscher oder BERKEFELDscher Filterkerzen kann zweifelsohne, wie von DE MARTINI angegeben, eine Einbuße an Antitoxin nach sich ziehen.

2. Der Grad dieser Einbuße ist sehr inkonstant und hängt von dem Durchlässigkeitsgrade des benutzten Filters ab. Sie kann, wie bei den DZIERGOWSKYschen Versuchen, ganz unbeträchtlich sein, auf der anderen Seite kann sie sich bis auf mindestens 20 % des ursprünglichen Serumwertes belaufen, wenn ein BERKEFELDsches Filter zur Anwendung gelangt, und es kann sogar, wie in dem Falle DE MARTINIS, der Antitoxinverlust ein totaler sein, wenn ein Apparat benutzt wird, der dem DE MARTINIschen mit Gelatine verstopften Filter vergleichbar ist.

3. Der Antitoxinverlust ist progressiv und wächst in dem Maße, wie sich das Filter verstopft.

4. Bei der Bereitung des Diphtherieantitoxins im großen darf man wohl von der Filtriermethode Gebrauch machen; indessen dürfen nur die durchlässigeren Filterarten benutzt werden. Die Operation soll unterbrochen werden, sobald die Filter anfangen, sich zu verstopfen, und man sollte nicht durch hohen Druck durch teilweise verstopfte Filterkerzen die Filtration forcieren.

5. Es ist beim Filtrieren unbedingt geboten, daß die Gewährleistung für die antitoxische Wirksamkeit sich auf eine nach erfolgter Filtration vorgenommene Bestimmung der Wertigkeit gründet.

Im dänischen Staats-Seruminstitut wird die Filtration als Normalmethode benutzt, und unsere Erfahrungen stimmen in allen Stücken mit denjenigen COBBETTS überein. Mittels der CHAMBERLANDschen Kerze F, deren Dichtigkeit man vorher sorgfältig geprüft hat, kann man gewöhnlich 1 à 1,5, bisweilen 2 l Serum mit einem Antitoxinverlust von höchstens 5 à 10 % filtrieren. Es ist am besten, eine Wasserluftpumpe mit einem negativen Druck von ca. 600 mm anzuwenden. Sobald die Filtration langsam wird, sollte man die Kerze wechseln, und es ist eindringlich abzuraten, unter Anwendung besonders starken Saugens die Filtration zu forcieren, da dies bedeutenden Antitoxinverlust zur Folge haben kann.

Konzentrierung und Reinigung des Antitoxins.

Wegen der bedeutenden Schwierigkeiten, welche die Darstellung hochwertigen Diphtherieantitoxins darbietet, versuchte man schon frühzeitig, ein solches durch Konzentrierung schwacher Antitoxinlösungen zu bereiten.

Dies suchte man zunächst durch einfaches Eindampfen im Vakuum zu erzielen. Man erreichte indes nur eine verhältnismäßig geringe Verstärkung der Antitoxinkonzentration, die Lösung behält die ganze ursprüngliche Eiweißmenge. Die dicke Flüssigkeit hat viele Übelstände. In Deutschland dürfen daher keine Sera von höherem Eiweißgehalt als 12 Prozent verkauft werden.

Das von BUJWID[24]) angegebene Verfahren, bei welchem das Wasser durch Ausfrieren entfernt wird, besteht in folgendem: Läßt man nach dem Gefrieren eines Behälters mit Serum dieses wieder durch ruhiges Stehen bei Zimmertemperatur auftauen, so lassen sich zwei Schichten in der Flüssigkeit bemerken; die obere Schicht ist ganz farblos, ist fast reines Wasser ohne antitoxische Wirkung. Die untere Schicht dagegen ist intensiv gelb gefärbt, vollkommen klar, und enthält die Gesamtmenge des Antitoxins. Nach 2—3maligem Einfrierenlassen wird ein Serum erhalten, welches $2^1/_2$—3 mal konzentrierter ist als das ursprünglich angewandte.

Die meisten Methoden zur Konzentrierung und Reinigung des Antitoxins bringen das Prinzip des Aussalzens in Anwendung. Eine große Reihe von Arbeiten (BRODIE[21]), VON TIZZONI[112]), DIEUDONNÉ[36]), BELFANTI und CARBONE[12]), IDE und LEMAIRE[55]), ATKINSON[5]), FREUND und STERNBERG[50]), SENG[106]), PICK[89]) u. a. m.) haben nachgewiesen, daß das Diphtherieantitoxin stets in der Fraktion der löslichen Globuline zu finden ist, aus der es sich bis jetzt nicht abscheiden ließ. Auf diesem Gebiete herrschte vor einigen Jahren große Unsicherheit. Sowohl DIEUDONNÉ als BELFANTI und CARBONE fanden, daß das mit Kohlensäure ausgefällte Globulin keine antitoxischen Eigenschaften besaß, während Magnesia- und Ammoniumsulfat das Globulin mit quantitativer Ausbeute des Antitoxins aussalzten. Dieser Gegensatz scheint nach den Untersuchungen von FREUND und STERNBERG, SENG und MARCUS darauf zu beruhen, daß auch der bei der Dialyse antitoxinhaltiger Eiweißkörper ausfallende Anteil des Globulins (das „unlösliche Globulin") unwirksam ist. Der früher als „Globulin" bezeichnete Körper ist mithin kein einheitlicher und läßt sich in einen antitoxisch wirksamen und einen unwirksamen Bestandteil scheiden.

Auf dem Gebiet der antitoxischen Globuline ist noch sehr viel aufzuklären. Näheres über die Prinzipien der Aussalzung und ausführliche Literatur findet sich in dem Aufsatze von PRIBRAM in diesem Handbuch, sowie in den neueren Publikationen von LEDINGHAM[58]), BRUNNER und PINKUS[22]), GIBSON und COLLINS[53]) und BANZHOF und GIBSON[7]).

In dem folgenden werden nur einige Methoden besprochen, die direkt eine praktische Reinigung und Konzentration des Diphtherieantitoxins beabsichtigen.

PRÖSCHER[93]) hat behauptet, daß durch Einwirkung von Pankreaslösung bei Temperaturen nicht über 37° C., am zweckmäßigsten von 32° C., das den Antitoxinen anhaftende Eiweiß peptonisiert werde und alsdann das Antitoxin durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat bei Halbsättigung vom Pepton zu trennen sei. Die letzten Spuren des Peptons würden sich schließlich durch Dialyse entfernen lassen. Es gelang BRIEGER[17]) jedoch nicht, mittels dieser PRÖSCHERschen Methode ein eiweißfreies Antitoxin darzustellen.

Auf Grundlage der von BRIEGER, EHRLICH und von BRIEGER und COHN zur Konzentrierung des Tetanusantitoxins in Milch ausgearbeiteten Methoden gibt WASSERMANN[115]) folgendes Verfahren zur

Konzentrierung des Diphtherieantitoxins aus Milch an: Die aseptisch gewonnene Milch wird, eventuell durch Zusatz von 20 ccm $^1/_1$ n HCl pr. Liter mit der gerade zur schnellen Gerinnung ausreichenden Menge Labfermentes versetzt und nach erfolgter Kaseinabscheidung die Molke abgegossen. Diese wird sterilisiert und mittels Chloroforms entfettet, und es werden 30—33 % Ammoniumsulfat zugesetzt. Der erhaltene abfiltrierte Niederschlag wird rasch im Vakuum auf Tontellern getrocknet, das überschüssige Ammoniumsulfat abgepreßt und dann in der nach dem Quantum der Ausgangsmolke berechneten Menge Wasser gelöst, z. B. bei 5 Liter Molke und erwünschter 10facher Konzentration in 500 ccm Wasser. Nach WASSERMANN arbeitet diese Methode quantitativ ohne irgendwelchen Verlust.

ARONSON[4]) bediente sich zum Aussalzen des Aluminiumhydroxyds: 100 ccm Blutserum wurden mit 100 ccm Wasser verdünnt und mit 70 ccm einer 10%igen Aluminiumsulfatlösung versetzt. Zu der Mischung gibt man langsam soviel 5 % Ammoniaklösung hinzu, daß das Aluminiumsulfat zum größten Teil zersetzt wird, die Reaktion jedoch schwach sauer bleibt. Aus dem Niederschlag läßt sich das Antitoxin dadurch gewinnen, daß man denselben in einem Schüttelapparat mit destilliertem Wasser behandelt, dem man so viel Alkali (Soda, Ammoniak) zugesetzt hat, daß rotes Lackmuspapier deutlich, aber nicht zu stark gebläut wird. Bei der Filtration muß man zu vermeiden suchen, daß die Tonerde sich am Filtrierpapier festsetzt, wodurch Antitoxin im Papier zurückgehalten werden könnte. Deshalb dürfen nur kleine Mengen (100—200 ccm Serum entsprechend) in großen Faltenfiltern filtriert werden, und die Trichter sind während der Filtration häufig zu bewegen. Der zurückbleibende Niederschlag wird mit mäßigen Mengen schwach alkalihaltigen Wassers gewaschen. Um das Antitoxin möglichst vollständig zu gewinnen, ist eine erneute Ausschüttelung mit alkalischem Wasser und Filtration nötig.

BRIEGER und BOER[18]) gelangten nach sehr zahlreichen Versuchen mit den verschiedenen Neutral- und Metallsalzen der schweren Metalle zu folgendem Verfahren:

Mit dem fünffachen Volumen Wasser verdünntes Diphtherieserum wird mit dem Doppelten des ursprünglichen Volumens einer 1 %igen Zinksulfat- oder Zinkchloridlösung gefällt, der Antitoxin- Zinkniederschlag mit wenig Wasser gewaschen, in schwach alkalischem Wasser (1 Tropfen Normalnatronlauge : 20 ccm Wasser) gelöst. Leitet man nun Kohlensäure durch die Lösung, so werden die mit Zinksulfat vorbehandelten Antitoxine hierdurch in den Niederschlag hineingerissen, während die mit Zinkchlorid gepaarten Antitoxine alsdann im Filtrat verharren.

Neuerdings geben BRIEGER und KRAUSE[20]) folgendes Verfahren an:

Das Diphtherieserum wird mit der gleichen Menge destillierten Wassers verdünnt, mit neutralem Ammoniumsulfat gefällt, der Niederschlag mit 10 % wässeriger Glyzerinlösung gelöst und mit überschüssigem Chlornatrium behandelt. Der entstandene Niederschlag enthielt keine Antikörper. Dagegen hatte die Lösung den ursprünglichen Schutzwert. Durch die Lösung wurde nun Kohlensäure geleitet. Der entstandene Niederschlag, der keine Antikörper enthielt, wurde abfiltriert. Das Filtrat hatte beinahe denselben Antikörpergehalt wie das Ausgangsmaterial. Durch die vorgenommenen Fällungen wurden bis 75 % des Gesamtstickstoffs entfernt, ohne daß eine Schädigung der Immunkörper festzustellen war.

FREUND und STERNBERGS[50]) Methode besteht in einer Kombination des Fällungs- und des Aussalzungsvorganges, indem das Serum mit einem Drittel seines Volumens einer 5 %igen Kalialaunlösung versetzt wird, worauf man das Filtrat dialysiert, den geringen hierbei entstehenden Niederschlag abfiltriert und die erhaltene Flüssigkeit zur Hälfte mit schwefelsaurem Ammoniak sättigt. Der gewonnene Niederschlag wird nach Lösung und gründlicher Dialyse im Vakuum eingeengt.

Bei diesem Verfahren erhält man von einem halben Liter Serum im Durchschnitt etwa 9 g Trockensubstanz. Am vorteilhaftesten ist es indes, die Eindampfung nicht bis zum Trocknen zu treiben, um die Übelstände beim Lösen und Filtrieren zu vermeiden.

Vor kurzem beschrieb GIBSON[52]) ein Verfahren, das seit einiger Zeit in „The Department of Health" in NewYork angewandt wird.

Serum von geringer Stärke wird dadurch gefällt, daß man während Umrührens allmählich ein ebenso großes Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung zusetzt (MERCKS reines kristallinisches). Nach 1—2stündigem Stehen sammelt man den Niederschlag in große Faltenfilter und löst wieder in ebensoviel Wasser wie die ursprüngliche Serummenge. Die Lösung filtriert man durch Gaze durch, wobei das Filtrierpapier entfernt wird, und fällt wieder mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung aus. Das Quantum der letzteren entspricht dem zur Lösung benutzten Volumen Wassers. Der neue Niederschlag wird im Filter gesammelt und mit doppelt so viel gesättigter Chlornatriumlösung behandelt als das ursprüngliche Volumen Serum betrug. Das Filtrierpapier wird wie vorher durch Gaze entfernt. Man läßt den Chlornatriumauszug die Nacht hindurch stehen, worauf man die helle Lösung der antitoxinhaltigen Globuline absaugt und filtriert. Der nicht gelöste Rückstand wird wieder mit Chlornatriumlösung behandelt und dieser Auszug wird zu dem ersten Chlornatriumauszug der nächsten Antitoxinpräparation hinzugefügt.

Der Chlornatriumauszug wird darauf durch Zusatz von 0,25 % Essigsäure vollständig gefällt. Den hierdurch entstandenen Bodensatz sammelt man im Faltenfilter; ist das Filtrat durchgeflossen, so legt man das Filter in einem Halbkreise auf 50 Schichten Filtrierpapier und darüber 25 andere Schichten Filtrierpapier, darauf wieder Präzipitat und 25 Schichten Filtrierpapier usw. Darauf wird ein Gewicht von ca. 25 kg gestellt. Durch dieses Pressen mit Filtrierpapier wird das Präzipitat gründlich von Feuchtigkeit befreit. Das leicht feuchte, weiche Globulin-Präzipitat wird vom Filter entfernt und in einen Dialysator aus Pergamentpapier gebracht. Nach 12stündiger Dialyse in fließendem Wasser neutralisiert man vorsichtig mit Natriumkarbonat, und die Dialyse wird 2—3 Tage lang fortgesetzt, nachdem man ein wenig Chloroform als Präservativ zugesetzt hat. Nach der Dialyse filtriert man die Lösung, erst durch Papier, darauf durch eine Berkefeldsche Kerze, nachdem man vorher $^1/_4$—$^1/_2$ % Chlornatrium zugesetzt hat. GIBSON empfiehlt eine zweite Sterilisation mittels erneuten Filtrierens durch eine Berkefeldsche Kerze; ebenfalls findet er es ratsam, die ersten durchgeflossenen Kubikzentimeter nicht zu verwenden. Zuletzt wird ein Antiseptikum zugesetzt.

Mittels dieses Verfahrens erhielt man z. B. aus 9000 ccm Serum à 300 I.-E. schließlich 3320 ccm Serum à 700 I.-E. Der Ertrag an Antitoxin ist gewöhnlich etwa $^4/_5$ der ursprünglichen Menge, und man erzielt eine 2—3fache Konzentration des Antitoxins.

Diese GIBSONS „Globulinpreparation" ist in den letzten Jahren in großem Maßstabe in New York nach PARK und THRONE[88]) mit sehr

gutem Resultat angewendet worden. Die Heileffekte waren ganz wie bei gewöhnlichem Serum, die Nachwirkungen aber bedeutend geringer.

In einer späteren Arbeit zeigen Banzhaf und Gibson[7]), daß man noch höhere Antitoxinkonzentrationen erreichen kann. Sie geben an, daß, wenn ein antitoxisches Plasma stufenweise mit immer höheren Konzentrationen von Ammoniumsulfat gefällt wird, die in gesättigter Chlornatriumlösung löslichen Globuline von den höheren Fraktionen viel antitoxinreicher pr. Gramm Protein sind, als die von den niedrigeren Ammoniumsulfatkonzentrationen ausgefällten Globuline. Wird das Ausgangsmaterial (antitoxisches Pferdeplasma) bis 4,2*) gesättigt, fällt relativ wenig Antitoxin aus, es bleibt hochwertiges Globulin in Lösung, das bis 4,8 Ammoniumsulfatkonzentration ausfällt. In dieser Weise konnte man von einem 400fachen Serum eine Globulinlösung darstellen, welche 2000fach war.

Zur Reinigung des Diphtherieantitoxins benutzten Brunner und Pinkus[22])**) die Eigenschaft des Na_2SO_4, daß es bei 34° sein Maximum der Löslichkeit von 55% hat, wogegen es bei 18° nur zu 16,8%, bei 6°—7° und bei 0° nur zu 5% in Wasser löslich ist. Filtriert man einen bei 32° mit wasserfreiem Na_2SO_4 ausgefällten Eiweißniederschlag und läßt ihn auf dem Filter stehen, so bildet sich bei niederen Temperaturen 7—10% wasserhaltiges Natriumsulfat, das sich als schwer löslich ausscheidet, wobei das Eiweiß sich in dem nunmehr salzarmen Wasser löst.

Es sei folgendes Beispiel wiedergegeben:

125 ccm 250faches Diphtherieserum wird mit 125 ccm Wasser verdünnt, auf 32° erwärmt und danach mit 50 g wasserfreien Natriumsulfat vermischt. Die Menge der erhaltenen Flüssigkeit betrug 260 ccm.

Das Kölbchen wird in einen Brutschrank bei 32° gebracht, der Niederschlag am nächsten Tag auf einem Scheibenfilter in einem Trichter mit eingeschliffenem Glashahn filtriert. Nachmittags wurden 194 ccm des abgelaufenen Filtrats beiseite gestellt und der Niederschlag auf dem Filter sorgfältig mit kleinen Portionen von im ganzen 100 ccm einer 20%igen auf 32° erwärmten Lösung von Natriumsulfat gewaschen. Alle diese Prozeduren werden im Brutschrank bei 32° vorgenommen.

Abends waren 118 ccm Filtrat abgelaufen und der noch immer feuchte Niederschlag schied kein Filtrat mehr ab. Es ist notwendig, diesen Zeitpunkt möglichst genau einzuhalten, da sonst der Niederschlag leicht eintrocknet und sich dann nur mit Schwierigkeit löst.

Der Niederschlag, 48 ccm, wird in eine Temperatur von 6° gebracht und einige Kristalle Glaubersalz eingelegt. Die so angeregte Kristallbildung entwickelt sich in kurzer Zeit, worauf das gelöste Protein in dicken Tropfen abzufließen beginnt. Die Ausbeute war 26 ccm einer leicht opaleszenten dicken Flüssigkeit von einem Antitoxingehalt von ca. 735 I.-E. pr. ccm. 1000 I.-E. waren jetzt in 0,19 g Protein enthalten gegen in 0,40 g des Ausgangsmaterials.

Die Flüssigkeit enthält gegen 6% Natriumsulfat und kann daher ohne weiteres injiziert werden, falls man es nicht vorzieht, sie durch Dialyse zu entsalzen.

---

*) Anzahl Kubikzentimeter gesättigter Ammoniumsulfatlösung in 10 ccm von der gefällten Mischung.

**) Siehe Kretz, Über Immunisierungsmethoden.

Agglutinierende Diphtheriesera.

Wie früher erwähnt, behauptet man von verschiedenen Seiten (Roux[100]), Martin[69]), Rodhain, van de Velde[117])), daß der therapeutische Wert des antidiphtherischen Serums sich nicht durch dessen antitoxische Stärke allein bestimmen lasse, daß dasselbe zugleich Stoffe enthalten könne, die spezifisch auf die Bazillenleiber wirkten, und deren Heileffekt sich namentlich im raschen Verschwinden diphtherischer Membranen äußerte.

Nicolas[80,81,82]) hat gezeigt, daß in dem antitoxischen Diphtherieserum allerdings nicht konstant eine agglutinierende Substanz nachweisbar ist. Bruno[23]) machte ähnliche Beobachtungen. Später gelang es Lubowski[62]), ein stark agglutinierendes Serum durch Immunisierung mit einem ganz atoxischen und avirulenten Diphtheriestamme hervorzubringen.

Schwoner[104, 105]) zeigte, daß man mit einem mittels Diphtheriebazillen gewonnenen agglutinierenden Serum echte Diphtherie- von den Pseudodiphtheriebazillen differenzieren kann.

Weitere Versuche brachte A. Wassermann[116]). Diphtheriebazillenleiber wurden 24 Stunden bei 60° abgetötet, dann im Exsikkator scharf getrocknet und im Achatmörser feinstens zerrieben. Darauf wurde nach dem Vorgange von Aronson 1 g des getrockneten zerriebenen Diphtheriebazillenpulvers mit 20 ccm einer 0,1 %igen Äthylen-Diaminlösung gemischt, mehrere Stunden im Schüttelapparat geschüttelt und alsdann nach 24stündigem Stehen filtriert oder zentrifugiert.

1 bis 2 ccm dieser alkalischen Lösung töten Meerschweinchen oder Kaninchen wegen des in der Lösung vorhandenen Diphtherietoxins. Neutralisiert man dieses durch Antitoxin, so wird die Lösung besser ertragen, und Wassermann konnte durch wiederholte intravenöse Injektionen von 2—4 ccm an Kaninchen ein kräftig agglutinierendes und präzipitierendes Serum darstellen. Wird dieses in ungefähr gleichen Teilen zu dem beschriebenen klaren Auszuge der Diphtheriebazillenleiber zugesetzt, so entsteht sehr rasch eine Trübung, welche sich als flockiger Niederschlag zu Boden setzt.

Auch Lipstein[61]) konnte auf immunisatorischem Wege stark agglutinierende Reaktionsprodukte gegenüber den Substanzen der Diphtheriebazillenleiber gewinnen. Die von ihm geübte Immunisierung bestand in mehrfachen peritonealen Einspritzungen größerer Mengen toter und später lebender Kultur bei gleichzeitiger Einverleibung größerer Mengen Antitoxin.

Martin[69]) meint, man erziele eine wesentliche Verbesserung des Heileffekts der antitoxischen Sera, wenn neben Diphtherietoxin den Pferden zugleich Diphtheriebazillenleiber injiziert würden. Dies gelinge nach intraperitonealer, vor allem auch nach intravenöser Injektion, die indes mit großer Vorsicht ausgeführt werden müsse. Nach Martin wirken die agglutinierenden Sera gleichzeitig bakterizid, während die gewöhnlichen antitoxischen Sera des Handels diese Eigenschaft nicht besitzen. Mit diesem Serum erzielte Martin folgende klinische Resultate. Während Bepinselung der Diphtheriemembranen mit dem gebräuchlichen antitoxischen Serum kein bemerkenswertes Ergebnis lieferte, konnte man bei Anwendung des bakteriziden Serums oft eine rapide Abnahme der Schmerzen konstatieren. Um die Berührung des Serums mit den Membranen zu verlängern, wurden mit Gummi versetzte Serumpastillen angewandt, die langsam im Munde zerschmelzen. Martin gibt an, daß nach Verabreichung dieses

Serums die Schmerzen schnell schwanden, die Membranen sich loslösten und die Anzahl der Bazillen ziemlich rasch abnahm. Er meint, man habe somit ein Mittel, das lange Verweilen der Diphtheriebazillen im Rachen nach der klinischen Heilung abkürzen zu können.

Der Nutzen, den die Darstellung eines Serums von besonders antibakteriellen Eigenschaften bringen kann, wurde auch von Bandi[6]) hervorgehoben.

Ein rationell durchgeführter Vergleich mit Bezug auf die Resultate zwischen den Seren, die nur antitoxisch sind, und solchen, die zugleich auf die Bazillenleiber wirken, liegt bisher nicht vor.

Einheitlichkeit des Diphtherieantitoxins.

Überhaupt ist man noch nicht darüber im klaren, ob das Diphtherieantitoxin als ein einheitlicher Stoff zu betrachten ist, oder ob es einen Unterschied der therapeutischen Resultate bewirken würde, wenn man dasselbe aus verschiedenen Stämmen von Diphtheriebazillen bereitete.

Einen qualitativen Unterschied der Diphtheriesera glauben Pick und Schwoner[90]) nachgewiesen zu haben. Sie gingen von der allgemein verbreiteten, jedoch nicht ganz sicher begründeten Anschauung aus, daß hochwertiges Serum in größerem Maße abgeschwächt werde als minderwertiges (siehe z. B. Miller[74])). Dies führte sie auf eine Reihe von Untersuchungen, aus denen sie den Schluß ziehen, es gebe „toxolabile“ und „toxostabile“ Antitoxine. Erstere, die hochwertigen, sollten in überkompensierten Mischungen (aus vielem Antitoxin und einer relativ geringen Toxinmenge) 40—50 % ihres Antitoxinwertes verlieren. Unter gleichen Bedingungen sollten andere Diphtherie-Immunsera (minderwertige Sera) ihren Antitoxinwert nahezu vollständig beibehalten (toxostabile Antitoxine). Diese Änderung, welche die antitoxische Stärke unter der Einwirkung des Toxins erleide, erfolge nicht allmählich, sondern mit großer Reaktionsgeschwindigkeit. Die gleiche Anzahl Immunitätseinheiten toxostabiler und toxolabiler Immunsera ergebe mit derselben Toxinmenge verschiedenwertige Mischungen. Toxolabile Immunsera stellten nach partieller Absättigung mit Toxin toxostabile Antitoxinlösungen dar.

Die näheren Verhältnisse dieser Erscheinungen sind noch nicht aufgeklärt.

Neuere, noch nicht veröffentlichte Versuche von Kraus und Schwoner haben gezeigt, daß die Eigenschaft der Toxolabilität auch bei niederwertigen Seren anzutreffen ist. Diese Versuche haben gleichzeitig ergeben, daß eine Beziehung zwischen diesen Eigenschaften der Sera zum Toxin und dessen Heilwert (Avidität) nicht bestehen dürften.

Die Serumkrankheit.

Der wesentlichste Übelstand des Heilserumverfahrens ist das Auftreten desjenigen Komplexes von Symptomen, den v. Pirquet und Schick[91]) in ihrer Monographie, auf welche die folgende Darstellung sich in wesentlichen Punkten stützt und auf welche ich hinsichtlich näherer Details verweise, als „die Serumkrankheit“ bezeichnen.

Die Symptome sind in Kürze folgende: An der Einspritzungsstelle sieht man selbstverständlich gleich nach der Injektion einige

Anschwellung, der Menge der eingespritzten Flüssigkeit entsprechend. In den nächsten Tagen ist die Injektionsstelle gewöhnlich reaktionslos.

Nach einer Inkubationszeit von 8—12 Tagen, während welcher man zuweilen prodromale Erscheinungen, nämlich Rötung und Jucken um die Infektionsstelle herum beobachtet, stellen sich die Anfälle oft ziemlich plötzlich ein. Fast konstant erscheinen Effloreszenzen, die gewöhnlich zur Urticariagruppe gehören, die aber in hohem Grade polymorph sein und eine Menge verschiedener Formen annehmen können. Sie fangen um die Injektionsstelle herum an, verbreiten sich schnell und finden sich oft an symmetrischen Stellen. Die Quaddeln sind häufig blaß, von einem roten Hofe umgeben, wenn sie gekratzt werden. Sie erregen oft starkes Jucken und können den Patienten heftig quälen. Die Effloreszenz wird häufig von Ödemen begleitet, welche bedeutende Entstellungen verursachen können.

Auch an der Schleimhaut des Rachens kann die Efflorenszenz auftreten, und ist sie von Ödem begleitet, so kann sie, jedoch nur vorübergehend, Beschwerden beim Schlucken und Sprechen verursachen. Vielleicht rührt die Kardialgie, die mitunter einen Ausbruch von Exanthem an der Haut begleitet, davon her, daß ein solcher auch im Ventrikel stattfindet; hierauf lassen sich vielleicht auch einzelne Fälle von blutigem Durchfall zurückführen.

Ein Urticariaausbruch kann sehr plötzlich, im Laufe von $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde erscheinen, ebenso schnell kann er aber wieder nebst dem begleitenden Ödem verschwinden. Meistens stellen sich jedoch während der 2—3 Tage der gewöhnlichen Dauer der Effloreszenz mehrere Anfälle ein. Zuweilen wechselt das Exanthem seinen Charakter während dieser Nachschübe. Eine Gesetzmäßigkeit des Verlaufs und des Charakters der Effloreszenzen hat man bisher nicht nachzuweisen vermocht.

Das Fieber ist eines der Hauptsymptome der Serumkrankheit und wird noch häufiger beobachtet als die Exantheme. Doch gibt es viele Fälle, bei denen das Fieber gänzlich ausbleibt, wie auch das Umgekehrte stattfinden kann. In der Regel wird ein heftiger Anfall von Exanthem auch von Steigerung der Temperatur begleitet, diese beiden Erscheinungen sind aber zunächst als Symptome eines und desselben Faktors aufzufassen. Das Fieber hat, wie alle anderen Äußerungen der Serumkrankheit, äußerst abwechselnden Typus und sehr verschiedene Dauer, oft zeigt es den remittierenden Typus; die Schwankungen betragen 1—3 Grad.

Die Lymphdrüsen, in deren Versorgungsgebiet die Injektionsstelle liegt, sind schon von der Inkubationszeit an allmählich vergrößert und druckempfindlich.

Zur Zeit des Eintrittes allgemeiner Serumerscheinungen ist die Schwellung der regionären Lymphdrüsen das konstanteste Symptom. Sie beginnen schon am 7.—8. Tage zu wachsen und können die Größe eines Dattelkerns und darüber erreichen; sie sind dann stark druckempfindlich. In einzelnen Fällen entsteht allgemeine Drüsenanschwellung.

Nach v. Pirquet und Schick hat die Drüsenschwellung prognostischen Wert, indem sie dem Beginn der Serumkrankheit vorangeht und sich vor deren Ende zurückbildet, so daß man schließen kann, daß die Beendigung des Krankheitsprozesses nahe bevorsteht, wenn die Drüsen weicher werden, weniger vorspringen und sich verkleinern.

In einzelnen Fällen ist eine ausgesprochene Leukopenie vorhanden.

Ödeme sind eine fast regelmäßige Erscheinung, sie entstehen vor allem im Gesicht, erst in zweiter Linie an anderen Körperteilen. Die Dauer der Ödeme entspricht der Dauer der Erkrankung, und nach v. Pirquet und Schick ist die Abnahme der Ödeme prognostisch in ähnlicher Weise verwertbar wie die Abnahme der Drüsenschwellung.

Albuminurie wird zuweilen beobachtet und entsteht gewöhnlich einige Tage nach dem Einsetzen der Ödeme, in der 2.—3. Woche nach der Injektion. Der Eiweißgehalt ist nur selten hoch; v. Pirquet und Schick fanden ihn nicht höher als $^1/_4$ $^0/_0$.

In 1—2 $^0/_0$ der Serumkrankheitsfälle treten Gelenkerscheinungen und Muskelschmerzen auf. Die Gelenkerkrankung befällt nach Hartung und v. Pirquet und Schick häufig die Metacarpophalangealgelenke, in zweiter Linie Hand- und Kniegelenke und ist durch die starke spontane Schmerzhaftigkeit charakterisiert, die bei Berührung und Bewegung zunimmt. Nur sehr selten findet sich nachweisbares Exsudat in den Gelenkhöhlen, ebensowenig andere objektive Veränderungen. Die Gelenkerkrankungen werden nicht durch Salizyl beeinflußt.

In seltenen Fällen finden sich Anschwellung und Schmerzhaftigkeit der Epididymis und Testis, die vielleicht ebenso wie die Albuminurie und die Gelenkerscheinungen von ähnlichen Vorgängen herrühren, wie die an der Haut beobachteten.

Es gibt sehr viele Grade und Formen der Serumkrankheit; häufig beginnt sie plötzlich und verschwindet lytisch nach Verlauf einiger Tage; zuweilen wird sie aber langwierig, so daß Wochen, ja Monate hindurch sogar nach einer einzigen Injektion ein Anfall nach dem anderen kommt; ein solcher kann bei besonders empfindlichen Individuen mehrere Monate hindurch juckende Effloreszenzen von kurzer Dauer verursachen. Während der Anfälle können einige Unruhe, Reizbarkeit und ein Gefühl von Unbehagen vorhanden sein; der Patient leidet unter dem starken Jucken und den Ödemen, sonst ist das Allgemeinbefinden aber nicht ernstlich gestört, und nur in sehr heftigen Fällen und bei langer Dauer entstehen große Mattigkeit und Appetitlosigkeit.

Es gibt keinen Fall, wo man mit Sicherheit nachzuweisen vermochte, daß die Serumkrankheit direkte Lebensgefahr verursacht oder andauernde Übelstände, Nieren-, Gelenkleiden oder dgl. hervorgerufen hätte.

v. Pirquet und Schick machten auf eine Reihe eigentümlicher Erscheinungen aufmerksam, die wahrnehmbar sind, wenn ein Individuum, das früher eine Injektion von Serum erhalten hat, aufs neue eine solche erhält. Während eines Zwischenraums von ca. 12 Tagen bis ca. 9 Monaten und länger nach der ersten Injektion findet man, daß die Serumkrankeit in unmittelbarem Anschluß an die Einspritzung einer frischen Dosis auftritt, und zwar ohne Inkubationszeit (**sofortige Reaktion**); zugleich zeigt der Reinjizierte sich überempfindlich, indem die Reaktion viel häufiger und heftiger und nach geringeren Serummengen als vorher eintritt. Die Anfälle bestehen namentlich in Ödem an der Injektionsstelle, seltener in Fieber und allgemeinen Exanthemen. Auf eine solche sofortige Reaktion können einige Tage völliger Latenz folgen, worauf man am 5. oder 6. Tage einen neuen Ausbruch erblickt. Da die Inkubationszeit also bedeutend kürzer ist als die gewöhnliche (8—12 Tage), nennen die Verfasser diese Reaktion die beschleunigte, die sie scharf von der sofortigen sondern. Diese Eigentümlichkeiten können noch mehrere Jahre nach der Einspritzung angetroffen werden.

Mit Bezug auf die Einzelheiten dieser Erscheinungen und deren von den Verfassern gegebene Erklärung müssen wir auf die genannte Monographie verweisen.

Dieser Zustand, in welchen ein Organismus durch Injektion eines Antigens kommt, wodurch eine prädisponierende Wirkung für eine erneute Erkrankung hervorgebracht wird, wird von v. PIRQUET[92]) Allergie genannt. Mit diesem Ausdruck, aus allos und ergeia, gebildet ist nichts besagt als veränderte Reaktionsfähigkeit.

Analoge Beobachtungen sind an Tieren gemacht worden (RICHET, ARTHUS)*).

THEOBALD SMITH fand, daß Meerschweinchen, die zur Bestimmung des Wertes des Diphtherieheilserums gebraucht worden waren, mithin Mischungen von Diphtheriegift und antitoxischem Serum bekommen hatten, akut starben, wenn sie eine geringe Menge, nur wenige Kubikzentimeter normalen Pferdeserums erhielten.

Unsere Kenntnis dieser Erscheinung ist in der letzten Zeit durch eine Reihe äußerst interessanter Arbeiten bedeutend erweitert worden, dessen Resultate hier nur ganz kurz wiedergegeben werden können (ANDERSON[2]), BESREDKA[13,14]), BESREDKA und STEINHARDT[15]), GAY und SOUTHARD[51]), LEWIS[59,60]), OTTO[84,86]), ROSENAU und ANDERSON[97,98]) VAUGHAN und WHEELER[114])).

An Meerschweinchen und Kaninchen, denen sogar große Mengen normalen oder antitoxischen Pferdeserums injiziert worden waren, gewahrte man keine pathologischen Symptome. Nur eine einzige Injektion sogar minimaler Mengen Pferdeserums (selbst 1:1000000 ccm) genügt aber, um eine starke Überempfindlichkeit „Anaphylaxie" (ARTHUS) gegen Pferdeserum zu erzeugen; die Einspritzung desselben bringt nach Verlauf weniger Minuten Atmungsstörungen, Paralyse und Konvulsionen hervor, und in schweren Fällen erfolgt der Tod häufig in weniger als einer Stunde. Diese Anaphylaxie tritt erst nach einer Inkubationszeit von ca. 14—20 Tagen nach der ersten Serumeinverleibung ein und dauert lange an. Für die Wirkung der zweiten Serumdosis ist der Injektionsmodus von großer Bedeutung. Am schwächsten wirkt das Serum subkutan, dann intraperitoneal; bedeutend stärker intracerebral (BESREDKA) und noch kräftiger bei direkter Einführung in den Kreislauf.

Wird das Serum während der ca. 12 Tage dauernden Inkubationszeit injiziert, ist es ganz unschädlich. Es wirkt jetzt „antianaphylaktisch", indem das Tier jetzt nicht mehr auf eine nach Verlauf der Inkubationszeit gegebene Serumdosis reagiert.

Der anaphylaktische Zustand entsteht auch nach Verfütterung von Pferdeserum oder Pferdefleisch. Er kann von der Mutter auf die Jungen vererbt werden, doch scheint die Reaktion der Jungen etwas verschieden von der der Mutter zu sein.

Wird Serum von einem anaphylaktischen Tier einem frischen einverleibt, so wird dieses nach 24 Stunden anaphylaktisch. In dem Serum eines anaphylaktischen Tieres findet sich also eine Substanz, die diesen Zustand „passiv" überführen kann. Diese Substanz wird durch Erwärmung auf 60° 1/2 Stunde nicht destruiert.

Diese Erfahrungen haben ein gewisses prüfungstechnisches Interesse. Sie zeigen, daß man Meerschweinchen, die bereits zur Messung des Antitoxins gedient haben, zu späteren Versuchen mit Pferdeserum nicht

*) Siehe DOERR, Über Anaphylaxie. Dieses Handbuch.

gebrauchen darf, also auch nicht zur Prüfung auf Unschädlichkeit des antitoxischen Serums. Von Bedeutung in dieser Beziehung ist auch die Beobachtung, daß sich die Anaphylaxie von der Mutter auf die Jungen vererben kann.

Besredka[14]) hat neuerdings vorgeschlagen, die Toxizität des Pferdeserums in der Weise zu messen, daß man die tödliche Dosis durch intracerebrale Einspritzung an sensibilisierten (anaphylaktischen) Meerschweinchen bestimmt. Hierzu benutzt man Tiere, die eine gewöhnliche Antitoxinmessung überlebt haben.

Besredka fand, daß diese Toxizität sehr von dem Alter des Serums abhängt; gleich nach dem Aderlaß sind schon $^1/_{32}$ ccm und noch weniger tödlich, nach und nach muß die Dosis erhöht werden, und nach zwei Monaten ist sie gewöhnlich ca. $^1/_8$ ccm. Er schlägt deswegen vor, daß Heilserum erst nach Lagerung von mindestens 2 Monaten gebraucht werden darf und daß es immer eine Toxizitätsprobe zu bestehen hat. Dosen von $^1/_{16}$ ccm und darunter an sensibilisierte Tiere intracerebral appliziert, dürfen keine starken anaphylaktischen Phänomene hervorbringen.

Man hat also eine große Menge klinischer und experimenteller Beobachtungen, welche dartun, daß die Einverleibung eines artfremden Serums im Organismus einen Zustand hervorruft, den man als Allergie oder Anaphylaxie bezeichnet. Daß es dieser Faktor ist, der in Betracht kommt, und daß das Antitoxin als solches nicht toxisch wirkt, wurde durch zahlreiche Versuche nachgewiesen, unter denen besonders die von Johannesen[56]) angestellten Bedeutung haben.

Für das Auftreten der Serumkrankheit spielt es eine gewisse Rolle, wieviel Serum einverleibt wird. Ein direktes Verhältnis zwischen dem Quantum des Serums und der Intensität der Fälle gibt es nicht. Man findet Individuen, bei denen mehrere 100 ccm keine Folgen ergeben, und andere, bei denen 1 ccm eine heftige Serumkrankheit erregt. Die individuelle Disposition spielt eine sehr große Rolle. Im großen und ganzen trifft es aber zu, daß man, je mehr Serum gebraucht wird, um so zahlreichere und ernstlichere Fälle beobachtet. Dies geht aus Dauts[34]) Statistik hervor. Nach 74 Injektionen, wo die Dosis 2 bis 15 ccm betrug, entstanden Exantheme in 5,4 % nach 28 Injektionen von 20—60 ccm traten dieselben in ca. 32 % auf. v. Pirquet uud Schick fanden nach Einverleibung von 100—200 ccm Serumerscheinungen in 85 % der Fälle.

Übrigens zeigen die verschiedenen Pferdesera große Verschiedenheit der Toxizität, und auch bei dem einzelnen Pferde können in dieser Beziehung große Schwankungen angetroffen werden.

Auch bei den Patienten findet man große individuelle Verschiedenheiten. Als Kuriosum mag angeführt werden, daß ein dänisches Präparat, das gleichzeitig 2 Krankenhäusern zugestellt worden war, aus dem einen derselben zurückgesandt wurde, weil es besonders starke Nachwirkungen gab, während aus dem anderen das Ersuchen einlief, gerade von diesem Präparate noch mehr zu senden, da es sich als besonders unschädlich erwiesen habe.

Selbstverständlich hat man auf vielfache Weise versucht, die Serumkrankheit, welche die Serumbehandlung häufig begleitet, zu vermeiden. In einigen Instituten versuchte man es, die Pferde 24 Stunden hindurch vor dem Aderlaß hungern zu lassen, da man meinte, es handle sich hier um giftige, aus dem Darmkanal stammende Stoffe; die Erfahrung lehrte indes, daß dieses Verfahren die Zahl der Serumerkrankungen nicht herabsetzte.

Bujwid[24]) war zu dem Resultate gekommen, daß das Serum giftiger wirke, wenn es den immunisierten Tieren zu früh entnommen würde. Deshalb empfiehlt er, Pferden Blut nicht vor Ablauf von 15 Tagen nach der letzten Toxininjektion zu entnehmen. Ferner meint Bujwid festgestellt zu haben, daß das Pferdeserum in der ersten Zeit nach der Blutentnahme besonders toxisch wirke; er gibt deshalb den Rat, das Serum wenigstens einige Monate vor dem Gebrauch zu lagern. Man erblickt allerdings häufig Krankheit nach ganz frischem Serum, dasselbe gilt aber von lange Zeit hindurch aufbewahrten Präparaten; sogar jahrelang aufbewahrtes Serum kann eine heftige Serumkrankheit hervorrufen. Rosenau und Anderson[97]) fanden, daß 8 1/2, Besredka, daß 13 Jahre altes Serum auf Meerschweinchen, die mit Serum vorbehandelt worden waren, stark toxisch wirkte. Dziergowsky[41]) meint, sich auf Rauchfuss' Erfahrungen stützend, die Nebenerscheinungen treten weit seltener nach Seruminjektion von frisch immunisierten Tieren auf. Nach den Erfahrungen von Aaser trifft dieses nicht immer zu; sein Serum von mehrere Jahre hindurch immunisierten Pferden zeigte sich sehr wenig toxisch.

Eine sichere Verhütung der Übelstände erfolgt auch nicht durch die von Spronck[110]) eingeführte Erwärmung des Serums. Er stellt die Flaschen erst in kaltes Wasser, das im Laufe 1/2 Stunde bis auf 58° gebracht und darauf etwa 20 Minuten lang bei 59°—59,5° erhalten wird. Hierdurch glaubte er, in 2/3 der Fälle die Serumkrankheit zu verhüten. Diesem Verfahren wird das Diphtherieserum in mehreren Instituten unterzogen, aber auch nach Injektion dieses Serums kann man zahlreiche Nachwirkungen sehen. V. Pirquet und Schick fanden keinen Unterschied zwischen erwärmtem und nichterwärmtem Serum. Dasselbe gilt von den Beobachtungen in Dänemark. Nach den Untersuchungen von Rosenau, Anderson und Lewis scheint der toxische Stoff auch nicht durch 6stündige Erwärmung auf 60° zerstört zu werden. Dies soll dagegen durch Erhitzung auf 100° im Laufe von 15 Minuten geschehen. Ein genaueres Studium des Verhaltens des Anaphylaxie auslösenden Körpers und des Antitoxins bei Erwärmung wäre deshalb sehr erwünscht.

Die Konzentrierung des Antitoxins durch Ausfällung und Dialyse, wie sie zuweilen angewandt wird, hilft nicht ganz über die Schwierigkeiten hinweg, da gleichzeitig der toxische Stoff konzentriert wird. Dieser wird auch bei der Globulinausfällung mitgerissen. Wie oben erwähnt, soll das nach Gibsons[52]) Methode konzentrierte Antitoxin indes bedeutend weniger Nebenwirkungen erregen, als gewöhnliches Serum (Park und Throne[88])).

Die Behandlung des Serums durch Eintrocknung, Gefrieren und mittels Antiseptika hat keine sonderlich guten Resultate geliefert; ebensowenig Versuche, mittels spezifischer Präzipitine die toxischen Stoffe des Serums zu fällen; möglicherweise wird das in der jüngsten Zeit begonnene eingehende Studium uns dieselben unschädlich machen lehren.

Eine Behandlung der Injizierten ist von Netter[78]) empfohlen, der angibt, daß man mit Kalksalzen die Entstehung der Serumkrankheit verhindern kann. Die Menge der Kalksalze muß jedoch der Serummenge und der Zahl der Injektionen parallel gehen. Dies ist aus folgender Zusammenstellung ersichtlich:

Kinder, die weniger als 20 ccm Serum erhielten zeigten Serumkrankheit

	in Fällen	in Proz.
Behandelt 105	1	0,95
Nicht behandelt 118 . .	14	11
20—40 ccm Serum		
Behandelt 117	2	1,7
Nicht behandelt 117 . .	22	20
mehr als 40 ccm Serum		
Behandelt 23	3	13
Nicht behandelt 20 . . .	5	25

Die behandelten Kinder haben an 3 Tagen je 1 g Chlorkalzium erhalten.

Wenn die Dosen 40 ccm überschreiten, versagt die Behandlung mit Kalksalzen in den angewandten Dosen.

Auch bei den Reinjizierten meint Netter eine deutliche Wirkung der Behandlung mit Kalksalzen gesehen zu haben.

Die therapeutische Wirkung.

Es darf jetzt als außer Zweifel angenommen werden, daß wir im Diphtherieheilserum ein Spezifikum von eklatanter Wirkung gegen die Diphtherie besitzen. Die Unklarheit, die während der ersten Zeiten der Serumtherapie vorhanden war, ist geschwunden. Die Anzahl der hartnäckigen Skeptiker ist auf ein Minimum reduziert; anderseits ist man jetzt auch darüber im reinen, daß die starke und andauernde Herabsetzung der Diphtheriemortalität, die man beobachtet hat, seitdem die Antitoxinbehandlung allgemein geworden ist, nicht dieser allein zu verdanken ist, sondern an vielen Orten auch von einem spontanen Sinken der Morbidität der Diphtherie herrührt.

Es liegt ganz außerhalb des Rahmens dieser Übersicht, die klinische Seite der Diphtherieheilserumbehandlung zu beleuchten. Es sollen hier nur ganz wenige Aufschlüsse mitgeteilt werden.

Aus dem gewaltigen statistischen Material, das die Resultate der Serumbehandlung gegen die Diphtherie zum Gegenstand hat, führe ich hier nur eine oft (nach Dieudonné[37]) zitierte Zusammenstellung an:

Autor	Summe der Fälle	Sterblichkeit in Proz.	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	Nach dem 6. Tag	Unbekannt
Welch	1489	14,2	2,3	8,1	13,5	19,0	29,3	34,1	33,7	17,6
Hilbert	2428	18,3	2,2	7,6	17,1	23,8	33,9	34,1	38,2	—
Sammelforschung der American Paediatric society	5794	12,3	4,9	7,4	8,8	20,7	35,3	—	—	—
Sammelforschung im österreichisch. Sanitätswesen	1103	12,6	8,0	6,6	9,8	25,5	28,8	30,7	21,0	31,8
Sammelforschung des Kais. Gesundheitsamtes . .	9581	15,5	6,6	8,3	12,9	17,0	23,2	—	26,9	—

Ausführliche Literaturangabe s. u. a. FAHR[48]) und SCHELLER[103]).

Indes wird der Wert der meisten Statistiken sehr wesentlich dadurch eingeschränkt, daß das notwendige Kontrollmaterial nicht hinlänglich ist. In der Regel besteht dieses in Beobachtungen, die aus Perioden vor der Serumtherapie herstammen, was sie in Berücksichtigung der großen spontanen Schwankungen der Epidemien nur wenig brauchbar macht. Wünscht man eine wirkliche Aufklärung darüber, welchen Vorteil die Serumbehandlung gebracht hat, so muß das Kontrollmaterial ganz derselben Beschaffenheit sein wie die serumbehandelten Fälle. Eine solche, mit besonderer Sorgfalt nach dieser rationellen Methode ausgeführte größere Statistik verdanken wir FIBIGER[49]), dessen Arbeit keine hinlängliche Beachtung zu finden scheint. Dieselbe wurde im Kopenhagener Blegdamhospital ausgeführt. Hier wurden während eines ganzen Jahres die jeden zweiten Tag aufgenommenen Patienten mit Serum behandelt, die an den zwischenliegenden Tagen ankommenden Patienten erhielten dagegen keine Einspritzungen. Das Resultat war:

Unter 204 mit Serum behandelten Diphtheriefällen*) ohne Kroup starben 5, d. h. ca. 2 %,
unter 201 ohne Serum behandelten Diphtheriefällen ohne Kroup starben 14, d. h. ca. 7 %,
unter 35 mit Serum behandelten Kroupfällen starben 3, d. h. ca. 8 %,
unter 43 ohne Serum behandelten Kroupfällen starben 15, d. h. ca. 35 %.

Diese Zahlen, die sich auf ein absolut vergleichbares Material stützen, zeigen, um wieviel die Sterblichkeit unter den mit Serum behandelten Fällen geringer ist als unter den nicht mit Serum behandelten. Ferner fand man, daß bei den ersteren die Beläge schneller abgestoßen wurden. Es entstand kein Kroup unter den mit Serum behandelten Diphtheriepatienten, die ohne Kroup angekommen waren. Dagegen erwies es sich, daß die Serumbehandlung auf das Fieber, die Albuminurie und die Parese keinen Einfluß übte (s. RAUCHFUS[94]), WOINOW[119])).

Der Zweck der antitoxischen Diphtherietherapie soll sein: 1) die Menge Diphtherietoxin, die bereits im Gewebe gebunden sein kann, unschädlich zu machen; 2) das im Kreislaufe zirkulierende Toxin zu neutralisieren; 3) durch die Antitoxinkonzentration im Blute das neugebildete Toxin, welches in dasselbe aufgenommen wird, unwirksam zu machen und zu verhindern, daß es in die vitalen Organe gelange.

In der Praxis sind bei einer rationellen Antitoxintherapie verschiedene Verhältnisse zu berücksichtigen.

Der Zeitpunkt. Es ist von der größten Wichtigkeit ist, daß die Behandlung möglichst bald eingeleitet wird. Dies wird auch von fast allen Statistiken hervorgehoben, die uns zeigen, daß die Mortalität am geringsten ist, wenn die Behandlung an einem der ersten Krankheitstage ausgeführt wird, und um so mehr steigt, je länger es dauert, bevor das spezifische Mittel zur Anwendung kommt. Unter den vielen Statistiken, die dies ergeben, wird hier beispielsweise folgende Tabelle von KOSSEL[37]) und E. FABER[47]) angeführt.

*) Bakteriologisch festgestellte Diphtherie.

Tabelle 4. Nach KOSSEL.

Krankheitstag	Behandelt	Geheilt	Gestorben	Heilung in Proz.
I.	7	7	0	100
II.	71	69	2	97
III.	30	26	4	87
IV.	39	30	9	77
V.	25	15	10	60
VI.	17	9	8	47
VII.—XIV.	41	21	20	51
Unbekannt	3	2	1	—
	233	179	54	77

Tabelle 5. Nach E. FABER.

Krankheitstag	Behandelt	Geheilt	Gestorben	Heilung in Proz.
I.	99	92	7	92,9
II.	641	593	48	92,5
III.	763	694	69	91,0
IV.	555	492	63	88,6
V.	334	282	52	84,4
VI.	171	142	29	83,0
VII.	80	63	17	78,7
Später als VII. Tag	196	157	39	80,1
Unbekannt	298	263	35	—
Zusammen	3137	2778	359	88,6

In den Kroupfällen fand FABER im Gegensatz zu den meisten anderen Beobachtern keine Wirkung der Serumbehandlung. Seiner Meinung nach rührt dies davon her, daß die Fähigkeit der Serumbehandlung, die Mortalität der Diphtherie herabzusetzen, hauptsächlich auf deren Fähigkeit beruht, den Vergiftungstod zu verhindern, während deren Einfluß auf die anderen Haupttodesursachen, z. B. Pneumonie, nicht so bedeutend ist, daß er sich neben den anderen bestimmenden Faktoren geltend machen kann.

Dosierung. Trotz des gewaltigen klinischen Materials ist man noch nicht darüber ins klare gekommen, welche Mengen Antitoxin am besten zur Anwendung gebracht werden sollten. Eine klare Beantwortung dieser Frage läßt sich erst geben, wenn man die Beziehungen zwischen Toxin und Antitoxin im Tierkörper genau kennt und wenn man in jedem einzelnen Falle wüßte, wieviel Toxin zu neutralisieren ist. Da dies unbekannt ist, kann man nur ganz im allgemeinen die Regel aufstellen, daß es am sichersten sein wird, stets soviel Antitoxin einzuführen, als die Verhältnisse gestatten. Eine Beschränkung in diesem Punkte wird zunächst durch 2 Umstände geboten. Der eine sind die Kosten, und dieser fällt heutzutage an den vielen Orten weg, wo die

Öffentlichkeit unter irgend einer Form die Kosten der Serumbehandlung bestreitet. Wichtiger ist die Rücksicht auf die Serumkrankheit, welche bewirkt, daß man in einigen leichten Fällen, namentlich bei Erwachsenen, die Serumbehandlung zu vermeiden sucht.

Es herrscht im ganzen bei den Klinikern eine deutliche Tendenz, die Antitoxinmenge zu vermehren. Während man in den ersten Tagen der Serumtherapie nur Antitoxinmengen von 100—200 Immunisierungseinheiten benutzte, sind später 1000—2000 I.-E. injiziert worden und in mehreren Ländern, z. B. in Frankreich, England, den Vereinigten Staaten und Dänemark, hält man 3000—4000 I.-E. für Anfangswerte in mittelschweren Fällen. In schweren Fällen kommen häufig noch weit größere Dosen, 6000—8000—10 000 I.-E. bis sogar 50 000—100 000 I.-E., zur Anwendung, und einige Forscher (z. B. Mc Collom[64]), Molinié[75])) glauben, deren Nutzen bei schweren Vergiftungen erfahren zu haben. Die Injektionen werden während der folgenden Tage wiederholt, bis die Heilung gesichert ist. Man macht keinen durchgreifenden Unterschied zwischen Kindern und Erwachsenen (Kindern unter 2 Jahren gibt man häufig die halbe Dosis), indem man es für richtig hält, auf jeden einzelnen Fall Rücksicht zu nehmen, statt feste Regeln aufzustellen (siehe z. B. Comby[29]), Hellström u. a.[54])).

Applikationsweise. In der weit überwiegenden Anzahl der Fälle wird das Serum unter die Haut der Brust, des Abdomens oder der äußeren Seite des Schenkels eingespritzt. Die kleine Einstichstelle verschließt man mit Kollodium. Massage wird nicht angewandt. Behufs einer rationellen Antitoxintherapie ist es indes von Wichtigkeit zu erfahren, auf welche Weise das Antitoxin aus dem subkutanen Gewebe resorbiert wird. Anderswo hat man darauf aufmerksam gemacht, daß dies verhältnismäßig langsam geschieht. Untenstehender, von Henderson-Smith[109]) und dem Verf. ausgeführter Versuch gibt nähere Aufschlüsse über das Verhalten.

Einem gesunden Manne (Körpergewicht 70 kg) wurden subkutan am Abdomen 20 ccm antidiptherischen Serums eingespritzt, das 450 I.-E. pro ccm, im ganzen 9000 I.-E. enthielt. Während der folgenden Tage wurde die Antitoxinmenge in Blutproben aus der V. mediana gemessen.

Die Ergebnisse sind aus untenstehender Tabelle und Kurve (Fig. 4) ersichtlich.

Blutprobe genommen am	h	1 ccm Serum Gehalt von I.-E.
7./11.	1,0 p. m.	0
—	6,0 p. m.	Injektion von 9000 I.-E.
—	10,45 p. m.	0,1
8./11.	8,0 a. m.	0,225
9./11.	12,30 a. m.	0,68
9./11.	1,30 p. m.	1,0
10./11.	2,30 p. m.	1,13
11./11.	2,45 p. m.	1,13
13./11.	8,0 p. m.	0,68
20./11.	2,30 p. m.	0,17
22./11.	2,30 p. m.	0,14
27./11.	2,30 p. m.	0,08
6./12.	2,30 p. m.	0

Diese Kurve illustriert mit derselben Deutlichkeit wie die früher angeführten die Langsamkeit der Resorption. $4^{3}/_{4}$ Stunden nach der Injektion enthält das Blut nur 0,1 I.-E. pr. ccm; es dauert ca. 48 Stunden, bis es 1 I.-E. pr. ccm erreicht, und erst 3 Tage nach der Einverleibung des Serums findet man das Maximum 1,13 I.-E. pr. ccm. Darauf sinkt die Antitoxinmenge, noch 20 Tage später läßt sich das Antitoxin im Blute nachweisen.

Antitoxineinheiten

Tagen

Fig. 4.

Die langsame Resorption, die bei einer ausgesprochenen Diphtherievergiftung, wo der Blutdruck niedrig ist, wahrscheinlich noch schlechter wird, erklärt möglicherweise das ungünstige Resultat, das die Antitoxinbehandlung trotz der Anwendung großer Dosen in vielen Fällen ergeben hat: Die großen Mengen Antitoxin, die man zu geben glaubte, sind in Wirklichkeit dem Kranken nicht zu nutze gekommen, weil der Tod eintrat, bevor die Resorption der erforderlichen Menge stattgefunden hat.

In schweren Fällen, wo die Einverleibung großer Mengen Antitoxins in den Kreislauf schnell geschehen muß, wird die intravenöse Applikation der subkutanen bei weitem vorzuziehen sein, da bei letzterer viele kostbare Zeit verloren geht.

Es sind denn auch Berichte von Klinikern veröffentlicht worden, die gute Ergebnisse kolossaler, intravenös eingespritzter Quantitäten Antitoxin gesehen haben meinen (ARLOING[3]), CAIRNS[26]), CAGNONI[25]), MUIR[76]) usw.).

Bei intravenöser Applikation würde man sich wahrscheinlich mit geringeren Mengen Antitoxin begnügen können als bei subkutaner. Das Mißliche ist, daß die Technik bei Kindern mit kleinen Venen bedeutende Schwierigkeiten darbietet. Außerdem könnte nach den neueren Untersuchungen über Anaphylaxie (siehe v. PIRQUET und SCHICK[91])) die intravenöse Injektion vielleicht mit Gefahr verbunden sein, wenn das Individuum früher bereits eine Seruminjektion erhalten hat. Bisher hat die Reinjektion mit homologem Serum keine

Folgen nach sich gezogen, da die meisten Kliniker das Serum subkutan und nur relativ geringe Menge injizieren. Bei Reinjektionen, die intravenös gemacht werden, müßte Serum einer anderen Tierart verwendet werden (Pferde-Rinderserum). Daß die intravenöse Applikation bei Erstinjizierten sonst keine Bedenklichkeiten erregen kann, hat die Erfahrung gelehrt, z. B. aus der Pestepidemie in Porto, wo die Serumtherapie erst dann gute Resultate gab, als das Antitoxin intravenös eingespritzt wurde.

Dasselbe fand CRUVEILHIER[32]), der an Meerschweinchen die Bedeutung der Applikationsstelle für die heilsame Wirkung des Diphtherieantitoxins studierte. Er wies nach, daß intercerebrale Injektionen ein etwas besseres Resultat ergaben als die subkutanen, daß der intravenöse Weg jedoch den anderen weit überlegen war.

Auch C. J. MARTIN, BARTHÈLEMY[8]), H. VAN DE VELDE[118]), COURMONT[31]) u. a. haben die Vorteile nachgewiesen, welche die intravenöse Antitoxinbehandlung vor der subkutanen besitzt.

Neuerdings hat MORGENROTH betont, daß die intramuskuläre Injektion bessere Resorptionsbedingungen als die subkutane ergibt.

Es wäre selbstverständlich sehr bequem, wenn das Antitoxin sich durch den Verdauungskanal einverleiben ließe Zahlreiche klinische und experimentelle Untersuchungen haben ergeben, daß die Resorption auf diesem Wege (sowohl per os als per rectum eingeführt) schlecht gelingt. Bessere Resultate sind von MC. CLINTOCK und KING[63]) angegeben.

Therapeutisch ist die Einverleibung durch den Verdauungskanal nicht empfehlenswert.

Während die nützliche Wirkung der Serumtherapie bei mehreren diphtherischen Symptomen evident ist, fiel es stets auf, daß die Anzahl der Paresen nicht merkbar abnahm, nicht einmal bei reichlicher Anwendung des Antitoxins.

Die Behandlung der ausgesprochenen Parese mit Antitoxin scheint von vornherein nur geringe Aussicht zu haben. Schon lange bevor die Symptome sich deutlich äußern, zeigt das Nervensystem entschiedene pathologisch-anatomische Veränderungen [siehe z. B. DREYER[38])], und in diesem Zeitpunkt haben sogar enorme Mengen Antitoxin keine Wirkung. Zu demselben Resultat sind ROSENAU und ANDERSON[99]) gekommen.

Die meisten Kliniker halten denn auch die Antitoxinbehandlung der diphtherischen Paresen für wirkungslos. Wenn verschiedene französische Ärzte (z. B. COMBY, MARFAN und MOURNIAC[29]) u. a.) dennoch den Gebrauch von Diphtherieserum auch in solchen Fällen stark anraten, geschieht dies, teils weil man keine andere Behandlung hat, teils weil sich zu dem Zeitpunkte, wo der Patient unter Behandlung kommt, möglicherweise noch ein wenig freies oder doch nur locker gebundenes Toxin vorfinden könnte.

Diphtherieheilserum als Prophylaktikum.

Es liegt jetzt hinlängliches Material vor, um mit Sicherheit anzunehmen, daß man imstande ist, mittels einer verhältnismäßig kleinen Menge Diphtherieantitoxins (500—1000 I.-E.) eine vorübergehende Immunität gegen Diphtherie zu erzeugen. Dies geht aus einer sehr großen klinischen Erfahrung hervor, die in mehreren Sammelstatistiken zu finden ist, z. B. in der vom Kaiserlichen Gesundheitsamte veröffentlichten. (Siehe auch die Zusammenstellung von FAHR[48]).) Wie überein-

stimmend die Anschauungen in diesem Punkte sind, bezeugte der XIII. internationale Kongreß für Hygiene usw. in Brüssel[30]), wo die Frage nach dem Werte des antidiphtherischen Serums als Prophylaktikum Gegenstand einer Diskussion war und wo Berichterstatter aus einer großen Reihe von Ländern sich in fast ganz gleicher Weise äußerten.

Die erlangte Immunität tritt schnell ein und dauert ca. 3 Wochen hindurch. Ein Blick auf die Kurve (Fig. 4) zeigt uns, daß wenigstens einige Stunden verfließen, bis der Kreislauf die erforderliche Antitoxinmenge enthält. Ferner sieht man, daß die Antitoxinkonzentration des Blutes langsam abnimmt, daß aber noch 20 Tage nach der Einspritzung 0,08 I.-E. gefunden werden. Dies stimmt damit überein, daß die klinische Erfahrung die Dauer der Immunität auf 3 Wochen feststellt. Welche Antitoxinkonzentration im Blute erforderlich ist, um Immunität hervorzubringen, läßt sich zur Zeit nicht entscheiden.

Die übliche Dosis beträgt 500—1000 I.-E. Höhere Mengen werden seltner angewandt, teils aus Rücksicht auf die Serumkrankheit, teils weil die Dauer der Immunität nicht im Verhältnis zur injizierten Menge zunimmt. Wie die Kurve zeigt, sinkt die Antitoxinkonzentration stark während der ersten Tage — um so stärker, je größer die Antitoxinmenge ist — und durch eine merkbare Steigerung der Dosis wird deshalb nur wenig gewonnen.

Es gibt nicht gar wenige Fälle, in welchen Diphtherieinfektion während der ersten Tage nach der Einspritzung von Antitoxin eingetreten ist. Von solchen Kranken pflegt man anzunehmen, sie seien schon im Augenblicke der Immunisierung infiziert gewesen, und die Erfahrung zeigt, daß die Krankheit dann in der Regel einen gutartigen Verlauf nimmt.

Es dürfte deshalb triftiger Grund vorliegen, zu einer noch ausgedehnteren Anwendung des antidiphtherischen Serums als Prophylaktikum aufzufordern, namentlich an Orten, wo man befürchtet, die diphtherische Ansteckung könnte sich von einem Infektionsherde aus verbreiten, wie in Familien mit vielen Kindern, in Schulen, Krankensälen, Kasernen usw.

In der Regel werden Einverleibungen subkutan unternommen. Vor kurzem haben Mc Clintock und King[63]) nachgewiesen, daß nach Eingabe per os größere Mengen Antitoxin, als gewöhnlich angenommen, in den Kreislauf eindringen. Ob diese Beobachtung für die Diphtherieprophylaxis praktische Bedeutung erhalten werden, muß noch dahingestellt bleiben.

Literatur.

1) Abba, Über die Dauer des toxischen und antitoxischen Vermögens bei Diphtherietoxin und -antitoxin. Centralbl. f. Bakt. 1898, Bd. XXIII.
2) Anderson, Maternal transmission of immunity to Diphtheria toxine and hypersusceptibility to horse serum in same animal. Bull. No. 30. Hyg. Lab. U. S. Publ. Health and Mar. Hosp. Serv. Wash.
3) Arloing, Einfluß des Einführungsweges bei d. therap. Wirk. d. Diphtherieheilserums. Ref. Münchner med. Wochenschr. 1899.
4) Aronson, Weitere Untersuchungen über Diphtherie und das Diphtherie-Antitoxin. Berliner klin. Wochenschr. 1894, pag. 453.
5) Atkinson, A preliminary note on the fractional precipitation of the globulin and albumin of normal horses serum and diphtheric antitoxic serum and the antitoxic strenght of the precipitates. The Journal of experimental Medicine 1899.
6) Bandi, Über die Bereitung eines antibakteriellen Diphtherieserums. Centralbl. f. Bakt. 1903, Orig., Bd. XXXIII.
7) Banzhof and Gibson, The fractional precipitation of antitoxic serum. The Journal of Biological Chemistry 1907, Vol. III, pag. 253.

8) Barthèlemy, Influence de la voie d'introduction sur le développement des effets préventifs et curatifs des sérums antitoxiques. Thèse, Lyon 1902.
9) v. Behring und Boer, Die Wertbestimmung des Diphtherieheilserums. Ges. Abhandl. z. ätiolog. Therap. von ansteckenden Krankheiten, 2. Teil.
10) Behring und Knorr, Über den Immunisierungswert und Heilwert des Tetanusserums bei weißen Mäusen. Zeitschr. f. Hygiene 1893, Bd. XIII.
11) v. Behring, Infektion und Desinfektion. Leipzig 1894, pag. 231 u. 232.
12) Belfanti, S. e Carbone, T., Contributo alla conoscenza dell' antitossina difterica. Archiv. par le science med., XXII, No. 2. Ref. Centralbl. für Bakt. 1898, Bd. XXIII, pag. 906.
13) Besredka, Comment empêcher l'anaphylaxie. Soc. biol. 62, Juni 1907. Bioch. Centralbl., Bd. VI, No. 2007.
14) Besredka, Toxicité des sérums thérapeutiques. Sa variabilité et son dosage. Ann. de l'Inst. Pasteur 1907, pag. 77.
15) Besredka et Steinhardt, De l'anaphylaxie et de l'antianaphylaxie vis-à-vis du sérum de cheval. Ann. de l'Inst. Pasteur 1907, pag. 117.
16) Bonhoff, Versuche über die Möglichkeit der Übertragung des Rotzkontagiums mittelst Diphtherieheilserums. Berl. klin. Wochenschr. 1897, No. 5.
17) Brieger, Versuche zur Reinigung des Ricins und des Diphtherieantitoxins. Festschrift f. Koch, 1903, pag. 445.
18) Brieger u. Boer, Über Antitoxine und Toxine. Zeitschr. f. Hyg., Bd. XXI, pag. 259.
19) Brieger und Ehrlich, Beiträge zur Kenntnis der Milch immunisierter Tiere. Zeitschr. f. Hyg., Bd. XIII, pag. 336.
20) Brieger, L. und Krause, M., Neuer Beitrag zur Konzentrierung der Immunkörper im Diphtherieserum. Berliner klin. Wochenschr. 28. Juli 1907, pag. 946.
21) Brodie, A preliminary report of some experiments upon the chemistry of the diphtheria-antitoxin. Journ. of Pathol. and Bact., Vol. IV, pag. 460.
22) Brunner und Pinkus, Beiträge zur Reindarstellung der Antitoxine. I. Ein neues Verfahren zur Reinigung der Heilsera, speziell des Diphtherieserums. Biochem. Zeitschr.. 1907, Bd. V, pag. 381—393.
23) Bruno, Über Diphtherieagglutination und Serodiagnostik. Berl. klin. Wochenschrift 1898, pag. 1127.
24) Bujwid, Über eine Methode der Konzentrierung des Diphtherie- und anderer therapeutischer Sera mittels Ausfrierung. Centralbl. f. Bakt., Bd. XXII, pag. 287.
25) Cagnoni, Intravenöse Injektion von Diphtherieserum. Ref. Wiener med. Wochenschrift 1899.
26) Cairns, Treatment of Diphtheria by intravenous injection of antitoxin. The Lancet, 20. Dez. 1902.
27) Clintock, T. Mc and King, Walter E., The oral administration of antitoxins for prevention of diphtheria, tetanus and possibly sepsis with some observations on the influence of certain drugs in preventing digestion and promoting absorption from the alimentary canal. Journ. of infect. dis. 1906, Vol. III, pag. 701.
28) Cobbett, Der Einfluß des Filtrierens auf das Diphtherieantitoxin. Centralbl. f. Bakt. 1898, Bd. XXIV, pag. 386, 415.
29) Comby, Valeur thérapeutique de la sérothérapie dans la diphthérie. Archive de médicine des enfants 1903. Siehe auch: Mourniac, Du traitement des paralysies diphthériques tardives par les injections de sérum antidiphthérique. Thèse. Paris 1905.
30) Compte Rendu du XIII Congrès international d'Hygiène et de Démographie Bruxelles, Tome II, pag. 30.
31) Courmont, J., Injections intraveineuses de sérums thérapeutiques. Bull. Soc. med. des hôp des Paris, 15. Juni 1905, pag. 504.
32) Cruveilhier, De la valeur thérapeutique des injections de sérum dans la diphtérie suivant les doses et la voie de pénétration. Ann. de l'Inst. Pasteur 1904.
33) Ders., De la valeur thérapeutique de l'antitoxine dans le sérum antidiphtérique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, pag. 249.
34) Daut, Zur Statistik der Serumexantheme. Jahrb. f. Kinderheilk. 1897, Bd. XLIV, pag. 289. Cit. n. v. Pirquet und Schick.
35) Decroly et Ronsse, Pouvoirs toxique et antitoxique du sang après injection intraveineuse du venin, toxine ou antitoxine. Arch. internat. de Pharmacodynamie et de Thérapie 1899, Tome VI.
36) Dieudonné, Arb. aus d. Kais. Gesundheitsamte, Bd. XIII.
37) Ders., Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie, 1903.
38) Dreyer, Georges, Experimentelle Undersögelser over Difterigiftens Toxoner. Kopenhagen 1900.
39) Dönitz, Über die Grenzen der Wirksamkeit des Diphtherieheilserums. Arch. internat. de Pharmacodynamie et de Thérapie 1899, Tome V.

40) Ders., Die Wertbemessung der Schutz- und Heilsera. (KOLLE und WASSERMANN, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.)
41) DZIERGOWSKY, Über die Immunisierung gegen Diphtherie und die Herstellung des Diphtherieserums. (Russisch.) Ref. Centralbl. f. Bakt., Bd. XXXIV, pag. 85.
42) Ders., Zur Frage „Über das Verhalten des Diphtherieheilserums bei der Filtration durch das Chamberlandsche Filter." Centralbl. f. Bakt. 1897, Bd. XXI, pag. 333.
43) Ders., Zur Frage über die Beziehungen zwischen dem antidiphtherischen Heilserum und dem Diphtherietoxin. Arch. internat. de Pharmacodyn. 1899, Bd. V.
44) EHRLICH und WASSERMANN, Über die Gewinnung der Diphtherieantitoxine aus Blutserum u. Milch immunisiert. Tiere. Zeitschr. f. Hyg. 1894, Bd. XVIII, pag. 239.
45) EHRLICH, KOSSEL und WASSERMANN, Über Gewinnung und Verwendung des Diphtherieheilserums. Deutsche med. Wochenschr. 1894, pag. 353.
46) EHRLICH, P., Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. Klin. Jahrb. 1897, Bd. VI.
47) FABER, ERIK, Der Einfluß der Serumbehandlung auf die Diphtheriemortalität. Jahrb. f. Kinderheilkunde, N. F., Bd. LIX, pag. 620.
48) FAHR, TH., Pathologie der Diphtherie. Lubarsch-Ostertags Ergebnisse etc., 1906. Bd. XI, 1. Abt. Allg. Ätiologie, 1907, pag. 310.
49) FIBIGER, Om Serumbehandling af Difteri. Hospitalstidende 1898. — Die Resultate der Serumbehandlung bei Diphtherie im Blegdamsspital zu Kopenhagen. Compt. rend. du XII Congrès internat. de médecine. Moscou 1897, Tome III, pag. 243.
50) FREUND und STERNBERG, Über Darstellung des Heilkörpers aus dem Diphtherieheilserum. Zeitschr. f. Hygiene 1899, Bd. XXXI.
51) GAY and SOUTHARD, Journ. of medical Research 1907, Vol. XI, pag. 143.
52) GIBSON, The contraction of antitoxin for therapeutic use. The Journal of Biological chemistry 1906, Vol. I, pag. 161.
53) GIBSON and COLLINS, On the fractionation of agglutinins and antitoxin. The Journal of Biological chemistry 1907, Vol. III, pag. 233.
54) HELLSTRÖM, Om antidifteriserumbehandlingen. Hygiea 1900.
55) IDE et LEMAIRE, Etude sur la répartition de l'antitoxine diphtérique dans les groupements albumineux du sérum. Arch. internat. de Pharmacodynamie et de Thérapie, Vol. VI, pag. 477.
56) JOHANNESEN, Über Injektionen mit antidiphtherischem Serum und reinem Pferdeserum bei nicht diphtheriekranken Individuen. Deutsche med. Wochenschr. 1895.
57) KINYOUN and HITCHENS, On the deterioration of diphtheria antitoxin. Centralbl. f. Bakt., Ref. 26. Juni 1907, Bd. I, pag. 1—4.
58) LEDINGHAM, On the relation of the antitoxin to the globulin-content of the blood serum during diphtheria immunisation. The Journal of Hygiene 1907, Vol. VII, pag. 65.
59) LEWIS, PAUL, A., The hypersensitiveness of the guineapig to horse serum. Proc. of the Soc. f. exper. Biology and medicine 1907, Vol. V, No. 1, pag. 8.
60) Ders., The induced susceptibility of the guineapig to the toxic action of the blood serum of the horse. The Journal of exper. medic. 1907, Vol. X, pag. 1.
61) LIPSTEIN, Über Immunisierung mit Diphtheriebazillen. Deutsche med. Wochenschrift 1902, pag. 821.
62) LUBOWSKI, R., Über einen atoxischen und avirulenten Diphtheriestamm und über die Agglutination der Diphtheriebazillen. Zeitschr. f. Hyg. 1900, Bd. XXXV.
63) MC CLINTOCK and W. KING, The oral administration of antitoxins for prevention of diphtheria, tetanus, and possibly sepsis with some observations on the influence of certain drugs in preventing digestion and promoting absorption from the alimentary canal. The Journal of infect. diseases, 30. Okt. 1906, Vol. III.
64) MC COLLOM, JOHN H., A Plea for larger doses of antitoxin in the treatment of Diphtheria. Medical and surgical reports 1900, Boston City Hospital.
65) MADSEN, TH., Discuss. 12 allm. svenska läkar mótet i Malmö 1905. Hygiea 1905.
66) Ders., Experimentelle Undersögelser over Difterigiften. Kopenhagen 1896.
67) Ders., Über Messung der Stärke des antidiphtherischen Serums. Zeitschr. f. Hyg., Bd. XXIV, pag. 423.
67a) Ders., Tetanusgift im Serum eines diphtherieimmunisierten Pferdes, fünf Tage vor dem Ausbruch von Tetanus. Centralbl. für Bakt. 1908. Orig. Bd. XLVI, p. 276.
68) MARENGHI, Über die gegenwärtige Wirkung des antidiphtherischen Serums und des Diphtherietoxins. Centralbl. f. Bakt. 1897, Bd. XXII, pag. 520.
69) MARTIN, Propriétés du sérum antidiphthérique. C. r de la soc. de biologie 1903.
70) MARTINI, Über das Verhalten des Diptherieheilserums bei der Filtration durch das Chamberlandsche Filter. Centralbl. f. Bakt. 1896, Bd. XX, pag. 796.

71) MARX, Mitteilungen aus der prüfungstechnischen Praxis. Festschr. f. Koch.
72) Ders., Experimentelle Untersuchungen über die Beziehung zwischen dem Gehalt an Immunitätseinheiten und dem schützenden und heilenden Wert der Diphtherieheilsera. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XXXVIII, pag. 372.
73) Ders., Die Bestimmung kleinster Mengen Diphtherieantitoxins. Centralbl. für Bakt. 1904. Orig. Bd. XXXVI, pag. 141.
74) MILLER, On the keeping qualities of antidiphtheritic serum. Centralbl. f. Bakt., 1905, Orig. Bd. XXXVIII, pag. 233.
75) MOLINIÉ, Sérothérapie intensive dans les cas de diphthérie grave. Thèse. Paris 1901.
76) MUIR, Intravenöse Einspritzung von Diphtherieheilserum. Lancet 1904. Ref. Münchner med. Wochenschr. 1905.
77) MÜLLER, FELIX, Über die Resistenz des Diphtherieheilserums gegenüber verschiedenen physikalischen und chemischen Einflüssen. Centralbl. f. Bakt. 1898, Bd. XXIV, pag. 251, 316.
78) NETTER, A., Influence des quantités de sérum injectées et du nombre des injections sur les éruptions sériques. Necessité d'augmenter les quantités de sels de chaux dans les cas d'injections répétées on supérieures à quarante centimètres cubes. Soc. de Biol., Bd. LX, No. 6. Centralbl. f. Bakt., Ref. Bd. XXXIX, pag. 307.
79) Ders., Des applications médicales du pouvoir antitoxique des sels de calcium et de leur emploi dans l'albuminurie. Soc. biol. 1907, Tome LXII, No. 8. Ref. Bioch. Centralbl., Bd. VI, No. 1021.
80) NICOLAS, Production de la réaction de Gruber et Durham du sérum antidiphthérique sur le bacille de Löffler. Comptes rendus de la soc. de biol. 1896.
81) Ders., Apparition du pouvoir agglutinant dans le sérum des sujets traités par le sérum antidiphthéritique. C. r. de la soc. de biol. 1897.
82) Ders., L'agglutination de Bac. de Loeffler par le sérum antidiphthéritique estelle constante? Comptes rendus de la soc. de biol. 1898.
83) OTTO, Die staatliche Prüfung der Heilsera. Arb. aus d. Kgl. Inst. f. exp. Therapie Frankfurt a. M. 1906.
84) Ders., Das Theobald-Smithsche Phänomen der Serumüberempfindlichkeit. v. Leuthold-Gedenkschr., 1906, Bd. I, pag. 1 (Ref. Biochem. Centralbl., Bd. V, Nr. 617.
85) Ders., Über die Haltbarkeit der Heilsera in der tropischen und subtropischen Zone. Archiv f. Schiffs- und Tropenhygiene 1906, No. 24. Ref. Centralbl. f. Bakt. I, Ref. Bd. XL, pag. 656.
86) Ders., Zur Frage der Serumüberempfindlichkeit. Münchner med. Wochenschr. 1907, Bd. LIV, No. 34. Bioch. Centralbl., Bd. VI, Nr. 2005.
87) PALMIRSKI und ORLOWSKI, Über den Einfluß verschiedener physikalischer Momente auf das Diphtherieheilserum. Ref. Centralbl. f. Bakt. 1896, Bd. XIX, p. 916.
88) PARK u. THRONE, The results of the use of refined diphtheria antitoxin, Gibsons „Globulin Preparation" in the treatment of diphtheria. The Americ. Journ. of the Med. Sc. Novbr. 1906.
89) PICK, Zur Kenntnis der Immunkörper. Beitr. z. chem. Pathol. u. Physiol., Bd. I.
90) PICK u. SCHWONER, Beiträge zur Kenntnis des Diphtherie-Antitoxins und seiner Beziehungen zum Toxin. Wiener klin. Wochenschr. 1904, pag. 1055.
91) v. PIRQUET u. SCHICK, Die Serumkrankheit. 1905.
92) v. PIRQUET, Klinische Studien über Vakzination und vakzinale Allergie. 1907.
93) PRÖSCHER, Über eiweißfreies Diphtherie-Antitoxin. Münchener med. Wochenschr. 1902, pag. 1176. Patentanspruch 13 757 (P 30) Gewinnung eiweißfreier Antitoxine, 21. Juni 1902 (zit. nach BRIEGER, Festschr. für KOCH.).
94) RAUCHFUSS, Über die Anwendung des Diphtherieheilserums in Rußland und ihre Erfolge. Compt. rend. du XII. Congrès international de médecine Moscou 1897, Vol. III, Sect. VI, pag. 146.
95) Report of the committee on antitoxic and immunizing sera. Public Health papers and reports, Vol. XXX, part. II, 1905.
96) ROSENAU, The immunity unit for standardizing Diphtheria Antitoxin. Bull. Nr. 21. Hyg. Lab. U. S. Publ. Health and Mar.-Hosp. Serv., Wash.
97) ROSENAU u. ANDERSON, A study of the cause of sudden death following the injection of horse serum. Bull. Nr. 29. Hyg. Lab. U. S. Publ. Health and Mar.-Hosp. Serv., Wash., 1906.
98) Dies., Studies upon Hypersusceptibility and Immunity. Bull. Nr. 36. Hyg. Lab. U. S. Publ. Health and Mar.-Hosp. Serv., Wash.
99) Dies., The influence of antitoxin upon post-diphtheritic paralysis. Bull. Nr. 33. Hyg. Lab. U. S. Publ. Health and Mar.-Hosp. Serv., Wash.

100) Roux, Mesure de l'activité des sérums. X. Congrès internat. de méd. Paris 1900.
101) Roux, Martin u. Chaillou, Trois cents cas de diphtérie traités par le sérum antidiphtérique. Ann. de l'Institut Pasteur 1894, pag. 644.
102) Salge, Über den Durchtritt von Antitoxin durch die Darmwand des menschlichen Säuglings. Jahrb. f. Kinderheilk. etc., N. F., Nr. 60, Heft 1. Zitiert nach Otto.
103) Scheller, R., Diphtherie. Kolle u. Wassermann: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. II. Ergänzungsband, pag. 97, 1907.
104) Schwoner, Josef, Über Differenzierung der Diphtheriebazillen von den Pseudodiphtheriebazillen durch Agglutination. Wiener klinische Wochenschrift 1902, pag. 1274.
105) Ders., Ein Beitrag zur Kenntnis der Pseudodiphtheriebazillen. Wiener klin. Wochenschr. 1903, pag. 1385.
106) Seng, W., Über die qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Eiweißkörper im Diphtherieheilserum. Zeitschr. f. Hyg. 1899, Bd. XXXI.
107) Sittler, Sur la durée de l'immunité conferée par les injection de sérum antidiphtérique. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. LXIV.
108) Smith, Theobald, The antitoxin unit in diphtheria. The Journal of the Boston Soc. of Medic. Sciences, Vol. V. Okt. 1900.
109) Smith, J. Henderson, On the absorption of antibodies from the subcutaneous tissues and peritoneal cavity. The Journal of Hygiene, 1907. Vol. VII, pag. 205.
110) Spronck, Influence favorable du chauffage du sérum antidiphtérique sur les accidents post-sérothérapiques. Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, pag. 696.
111) Steinhardt, Edna u. Banzhof, Edwin, The relative value of antitoxin and other curative substances in antidiphtheric serum. Proc. of the Soc. f. Experimental Biology and Medicine 1907, Vol. V, Nr. 1, pag. 24.
112) Tizzoni. Virchow: Festschrift III, pag. 48.
113) Uffenheimer, Der Nachweis des Toxins in dem Blute des Diphtheriekranken. Münchener med. Wochenschr. 1906, pag. 1607.
114) Vaughan u. Wheeler, Journ. of infect. diseases, Vol. IV, pag. 476, 1907.
115) Wassermann, A., Über Konzentrierung der Diphtherie-Antitoxine aus der Milch immunisierter Tiere. Zeitschr. f. Hyg. etc., Bd. XVIII, pag. 235.
116) Ders., Über eine neue Art von Diphtherieserum. Deutsche med. Wochenschr. 1902, pag. 785.
117) van de Velde, H., Beitrag zur Kenntnis der antitoxischen und antiinfektiösen Kraft des Antidiphtherieserums. Centralbl. f. Bakt. etc., Bd. XXII, pag. 534.
118) Ders., De la valeur de l'absorption sous-cutanée chez les lapin des substances, antitoxiques et agglutinatives des sérums. Arch. de physiologie, Nr. 1, Janv. 1898.
119) Woinow, Statistik der Parallelbeobachtungen an 750 Diphtheriekranken, welche mit und ohne Diphtherieheilserum behandelt wurden. Botkins Hospitalzeitung 1898, Nr. 3 u. 4. Zit. n. Rauchfuss. Die Anwendung des Diphtherieheilserums. XII. Cong. internat. de Médic. Moscou, Vol. III, pag. 204.

VI.

Botulismusantitoxin.

Von

Thorvald Madsen

in Kopenhagen.

Ende 1897, nicht lange nachher, als VAN ERMENGEM das Botulismustoxin nachgewiesen hatte, gelang es KEMPNER[4]) das spezifische Antitoxin darzustellen.

Es zeigte sich, daß es mit großen Schwierigkeiten verbunden war, kleinere Tiere, wie Kaninchen und Meerschweinchen, zu immunisieren; es war nicht möglich, eine aktive Immunität bei genannten Tierarten zu erzielen, selbst wenn mit äußerst geringen Giftdosen begonnen wurde. Die Tiere gingen, auch wenn die stets subkutan vorgenommene Injektion in größeren Intervallen wiederholt wurde, nach kürzerer oder längerer Zeit unter kachektischen Erscheinungen zugrunde. Statt eine Immunisierung der Versuchstiere zu erzielen, wurde vielmehr bei diesen Versuchen die natürliche Widerstandsfähigkeit des Organismus herabgesetzt.

Inzwischen zeigte FORSSMAN[1]), daß diese Tiere immunisiert werden könnten, wenn die Immunisierung mit einem durch Wärme geschwächten Toxin eingeleitet würde.

Hierzu verwandte er ein Toxin, von dem 0,01 ccm ein Meerschweinchen von 300 g in zwei Tagen tötete. Durch eine 35 Minuten lange Erwärmung bis zu 60° wurde es so geschwächt, daß 3 ccm erforderlich waren, um ein Meerschweinchen in vier Tagen zu töten. Mit diesem auf diese Weise geschwächten Toxin konnte man bei Kaninchen und Meerschweinchen mit 0,2—0,3 ccm beginnen und langsam bis zur 100fach tödlichen Dosis steigen. Auf diese Weise kann man ein Serum erzielen, das 1000fach ist.

Die Immunisierung gelang indessen bei Ziegen bedeutend leichter, KEMPNER veröffentlicht ausführliche Immunisierungsprotokolle über zwei Ziegen. Bei der einen wurde mit 0,0002 ccm eines Kulturfiltrates begonnen, dessen tödliche Minimaldosis für Meerschweinchen 0,0001 ccm betrug. Nach 4—7 Tagen, stets nachdem die Reaktion abgelaufen war, wurde um zirka das Doppelte gestiegen. Nach Verlauf von 115 Tagen erreichte man eine Dosis von 200 ccm, 11 Tage später erfolgt die Blutentnahme (Prüfungswert 1000 Immunitätseinheiten).

38 Tage später wurde die Injektion mit 100 ccm, 100 ccm, 200 ccm und 30 Tage darauf mit 300 ccm wiederholt. Die Blutentnahme zeigte neun Tage nach dieser Einspritzung, daß der Prüfungswert bis auf 100000 Immunitätseinheiten gestiegen war.

Bei einer andern Ziege, die mit dem Toxin einer Kultur, welche von Schweinefäces isoliert war, immunisiert wurde, stieg Kempner anfangs auf ähnliche Weise wie bei der vorigen um die doppelte Dosis. Als 0,1 ccm (tötende Dosis 0,0001 ccm) erreicht war, wurde damit bis zum 4—5fachen Multiplum fortgesetzt, so daß schon nach $2^1/_4$ Monaten die Dosis von 100 ccm erreicht wurde ($3^1/_2$ Monate bei der vorigen Ziege).

Der Zeitpunkt für eine neue Injektion ist nach Kempner abhängig von der Temperatur und namentlich von dem Gewicht der Tiere. Forssman erzielte ebenfalls ohne Schwierigkeit Antitoxin bei Ziegen. Er empfiehlt, die Immunisierung langsam, mit Zwischenräumen von 8—14 Tagen, auszuführen, weil man dadurch das Tier schont. Er erhielt in sieben Monaten mit 152 ccm Toxin ein ebenso starkes Serum wie Kempner mit 1099 ccm und ein ebenso wirksames Toxin. Dieser Unterschied in den Ergebnissen kann vielleicht auf individuelle Eigentümlichkeiten bei den verwendeten Ziegen zurückgeführt werden.

Vielleicht rührt er auch von Eigentümlichkeiten in der Antitoxinkurve des Botulismus her. Forssman und Lundström[3]) fanden, daß die Antitoxinmenge des Blutes nach einer subkutanen Einspritzung zuerst etwas fällt, danach vom 4.—8. Tage schnell steigt, die Akme langsam um den 15. Tag erreicht, um dann schnell wieder zu sinken.

Die maximale Antitoxinkonzentration kommt also fast ebenso spät wie bei Tetanus, bei welchem Ehrlich und Brieger den Höhepunkt am 17. Tage konstatierten, während er z. B. bei Diphtherie auf den 9. bis 11. Tag fällt. Es ist von großem Unterschiede für die Antitoxinkurve, ob das Toxin subkutan oder intravenös injiziert wird. In letzterem Falle erhält man nicht so hohe Antitoxinwerte und die Akme fällt anstatt auf den 15. auf den 10. Tag[2]).

Kempner bezeichnet bei den von ihm vorgenommenen Messungen des Botulismusantitoxins als Normalserum ein solches, von dem 1 ccm genügt, um die Testdosis (für Meerschweinchen von 250 g Körpergewicht in zwei Tagen tödlich) unschädlich zu machen. Genügt hierzu 0,001 ccm, bezeichnet er das Serum als 1000wertig.

Das Kriterium dafür, ob alles Toxin neutralisiert ist oder nicht, ist die Schlaffheit der Bauchmuskeln.

Forssmans Aichung[1,3]) war eine andere, indem er von einer bestimmten Serummenge ausging; diesem wurde so viel Toxin zugesetzt, bis die Mischung ein Meerschweinchen von 250 g in 4—5 Tagen tötete. Die Zahl der hierfür pro Kubikzentimeter Serum nötigen Testdosen wurde als die Wertigkeit des Serums bezeichnet.

Die Todeszeit der Meerschweinchen nach 4—5 Tagen bedeutet, daß in der Mischung nur eine tödliche Dosis frei enthalten ist, denn die Tiere, welche nicht in dieser Zeit nach der Injektion starben, überleben. — Die Mischungen von Toxin und Antitoxin enthielten immer bei bis 100000wertigen Sera 200 Testdosen, bei noch höherwertigen Sera 500 Testdosen Gift.

Die Bestimmung der gewöhnlichen Grenzwerte L_0 und L_+ kann man leicht an Meerschweinchen vornehmen. Als Beispiel werde

folgende Versuchsreihe angeführt, wo 0,1 ccm Toxin, ca. 250 tötende Dosen, verschiedene Mengen Antitoxin zugesetzt werden.

Tabelle 1.

0,1 ccm Toxin + n ccm Antitoxin		
0,0020		Keine krankhaften Symptome.
0,0018		Geringe Muskelschlaffheit in 3 Wochen.
—		Geringe Muskelschlaffheit 2 Tage dauernd.
0,0017		Geringe Muskelschlaffheit 2 Tage dauernd.
0,0016		Geringe Muskelschlaffh. 1 Woche dauernd.
—	† $2^1/_2$ Tage	
0,0015		Geringe Muskelschlaffh. 1 Woche dauernd.
—		Geringe Muskelschlaffh. 2 Wochen dauernd.
0,0014	† 3 Tage	
—		Geringe Muskelschlaffheit 3 Wochen, Gewichtsverlust.
0,0012	† 3 Tage	
0,0010	† 3 „	
0,0002	† 1 „	

Wie man sieht, muß man hier, ebenso wie bei dem Diphtheriegift, die Antitoxinmenge bedeutend erhöhen, um von (L_+) die Mischung (L_0) zu erreichen, die bei Meerschweinchen ganz unwirksam ist. Die letzten Reste des freien Giftes in der Mischung geben sich durch die eigentümliche Schlaffheit der Bauchmuskulatur zu erkennen.

Durch Versuche an Kaninchen haben Otto und Sachs[9]) festgestellt, daß Toxin-Antitoxinmischungen nach dreistündigem Stehen bei Zimmertemperatur sich bei intravenöser Einverleibung erheblich toxischer zeigten als bei subkutaner. Wenn man aber nach Herstellung des Gemisches 24 Stunden wartete, so war diese Differenz nahezu völlig ausgeglichen. Die Untersucher sind der Meinung, daß dies auf den Umstand zurückgeführt werden müßte, daß das Botulismustoxin, ebenso wie das Diphtherietoxin, sich langsam mit seinem Antitoxin verbindet, so daß 24 Stunden nötig sind, damit die Reaktion fertig sei.

Bei Messungen der Mischungen von Botulismustoxin und -antitoxin kommt es nicht ganz selten vor, daß ein Bruchteil der Mischung sich viel toxischer zeigt, als die Mischung selber (Madsen[7]).

Als Beispiel diene folgender Versuch:

(Tabelle 2 s. pag. 137.)

Der Ausgangspunkt ist eine Mischung von 0,013 ccm Antitoxin mit 1 ccm Botulismustoxin, die ca. 2500 tötende Dosen enthält.

Hiervon injiziert man auf Meerschweinchen von derselben Größe verschiedene Bruchteile bis zu $^1/_{2500}$. Während die Mischung selbst physiologisch ganz unwirksam ist, nimmt die Giftigkeit, je weniger einverleibt wird, zu.

$^1/_{20}$ wirkt tödlich, und $^1/_{100}$ zeigt das Maximum der Toxizität, worauf noch kleinere Bruchteile in der giftigen Wirkung langsam abnehmen.

Nach Otto und Sachs schwindet dieses eigentümliche Giftigwerden durch Verdünnung bei 24stündigem Stehen der Gemische nahezu ganz.

Im Verhältnis zwischen dem Botulismustoxin und -antitoxin stoßen wir wieder auf die gewöhnliche Erscheinung, daß dieselbe Menge Anti-

Tabelle 2.

Bruchteil der Mischung 1 ccm Toxin + 0,013 ccm Antitoxin	Tod nach Tagen	Symptome
1/1		Keine.
1/5		Spürchen Schlaffheit.
1/10		Schlaffheit 7 Tage dauernd.
1/10		Schlaffheit 4 Tage dauernd.
1/20	† 5 1/2	
1/50	† 4 1/2	
1/100	† 2	
1/200	† 3 1/2	
1/400	† 4 1/2	
1/800	† 8	
1/1000		Schlaffheit 7 Tage dauernd.
1/2000		Spürchen Schlaffheit.
1/3000		Spürchen Schlaffheit.

toxin auf eine gegebene Menge Toxin stärker paralysierend wirkt, wenn die beiden Stoffe in vitro gemischt werden als bei getrennter Einspritzung.

Das Antitoxin wirkt, wie andere Antitoxine, sicher prophylaktisch, wenn es einige Stunden vor der Vergiftung in genügender Menge eingespritzt wird.

Es besitzt auch heilende Wirkung. Es gelang Kempner, Meerschweinchen, die 24 Stunden nach erfolgter Intoxikation deutlich ausgesprochene klinische Vergiftungssymptome darboten, durch entsprechende (6 ccm eines 10000wertigen Serums) Antitoxindosen am Leben zu erhalten, ohne daß etwa nach Wochen und Monaten diese Tiere nachträglich an Kachexie zugrunde gingen, während die Kontrolltiere nach 48 Stunden starben.

Kempner und Pollack[5]) haben bei diesen Heilversuchen histologische Untersuchungen der Nervenzellen angestellt und glauben beobachtet zu haben, daß das Serum botulismusvergiftete Tiere retten kann, auch wenn die Nervenzellen bereits beträchtlich alteriert waren, und daß das Serum imstande war, die affizierte Zelle allmählich zur normalen Figuration wieder zurückzuführen.

Forssman bestätigte Kempners Resultate, fand aber gleichzeitig, daß der Heileffekt des Serums bedeutend geringer war, wenn das Toxin intrapleural appliziert wurde. Bei dieser Einverleibung wirkt das Toxin fünf bis neunmal stärker als bei der subkutanen, und es gelang nur die Tiere früh (12 Stunden nach der Injektion) mit Serum zu retten, während dies nicht möglich war, sobald sich deutliche Zeichen der Vergiftung (24 Stunden nach der Injektion) zeigten.

Eine andere Substanz, die schwächend auf die Toxizität des Botulismusgiftes wirkt, ist das normale Zentralnervensystem. Auf Grundlage der Untersuchungen von Marinesco[8]), Kempner und Pollack[5]) über das Verhalten des Zentralnervensystems bei der Botulismusvergiftung, prüften Kempner und Schepilewsky[6]) die Eigenschaft des Zentralnervensystems, die Wirkung des Botulismustoxins aufzuheben und kamen zu dem Ergebnis, daß man in analoger Weise wie beim Tetanus nachweisen könnte, daß das normale Gehirn und Rückenmark

von Meerschweinchen einen Schutz gegen das Botulismustoxin gewährt, während kein anderes untersuchtes Organ diese Eigenschaft besitzt.

Das Gehirn von eben getöteten Meerschweinchen, das bei 250 g schweren Tieren ein Durchschnittsgewicht von 3,3 g hat, wurde in einem Reibmörser fein zerrieben und in ca. 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Das Gewicht des Rückenmarks betrug ca. 0,9 g und wurde in ca. 3 ccm Kochsalzlösung zerrieben. Mit einer bestimmten Menge Gehirn- oder Rückenmarkemulsion wurden nun verschiedene Mengen Toxin, nach der letalen Minimaldosis berechnet, vermischt und subkutan auf Mäuse eingespritzt. Zur Kontrolle wurden teils entsprechende Mengen Botulismustoxin, teils Mischungen des Toxins mit dem Gehirngewicht entsprechende gleich große Stücke anderer Organe injiziert.

Bei gemischter Injektion von Gehirn und Gift konnte 1 ccm Emulsion gegen die dreifache letale Dosis, aber nur unsicher gegen höhere Dosen schützen. Bei getrennter Einspritzung auf beide Seiten der Maus konnten nur die Hälfte der Mäuse gegen die zweifache tödliche Dosis geschützt werden.

Bei 24 Stunden vorher erfolgter Injektion von Gehirn und Rückenmarkemulsion normaler Meerschweinchen konnten Mäuse gegen die zweifache tödliche Dosis immunisiert werden.

Das wirksame Prinzip ist an die Nervenzellen gebunden und ist in Wasser unlöslich. Kochen verträgt es nicht.

Eine ähnliche, wenn auch geringere Schutzwirkung findet sich bei einer ganzen Reihe anderer Substanzen wie Öl, Lecithin, Cholesterin, Tyrosin, Antipyrin usw.

Literatur.

1) FORSSMAN, Bidrag til Kännedomen om Botulismens Bakteriologi. Lund 1900.
2) Ders., Studien über die Antitoxinbildung bei aktiver Immunisierung gegen Botulismus. Centralblatt für Bakt. 1905, Bd. **38**, Orig., pag. 463.
3) FORSSMAN et LUNDSTRÖM, Sur la marche de la courbe d'antitoxine dans l'immunisation active contre le botulisme. Ann. de l'Institut Pasteur 1902.
4) KEMPNER, Weiterer Beitrag zur Lehre von der Fleischvergiftung. Das Antitoxin des Botulismus. Zeitschr. für Hygiene, Nr. **26**, pag. 481.
5) KEMPNER und POLLACK, Die Wirkung des Botulismustoxins (Fleischgiftes) und seines spezifischen Antitoxins auf die Nervenzellen. Deutsche med. Wochenschrift 1897, Nr. 32.
6) KEMPNER und SCHEPILEWSKY, Über antitoxische Substanzen gegenüber dem Botulismusgift. Zeitschr. für Hygiene, Nr. **27**, pag. 213.
7) MADSEN, TH., Über das Wurstgift und sein Gegengift. Centralblatt für Bakt. I, 1905, Ref. Bd. XXXVII, s. auch Verhandl. der dänisch. Akad. der Wissensch. 1904, 16. Dezember.
8) MARINESCO, Lésions des centres nerveux produites par la toxine du bacillus botulinus. Comptes rendus de la société de biologie 1896, Tome III, pag. 989. Presse médicale 1897, Nr. 8.
9) OTTO und SACHS, Über Dissoziationserscheinungen bei der Toxin-Antitoxinverbindung. Zeitschr. für exper. Pathologie und Therapie 1906, Bd. III.

VII.

Tetanusantitoxin.

Von

Dr. M. v. Eisler und Dr. E. Pribram

in Wien.

Tetanusantitoxin.

Historisches.

Auf der Suche nach antibakteriellen Antikörpern machte v. BEHRING die interessante, und für die ganze Immunitätslehre wichtige Wahrnehmung, daß das Blut tetanusimmuner Kaninchen Tetanusgift zerstörende Eigenschaften besitzt. Gleich in der ersten Arbeit, in welcher er im Jahre 1890 gemeinsam mit KITASATO jene bedeutsame Tatsache mitteilte, konnte er bereits drei weitere Sätze beweisen, die noch heute die Grundlage der antitoxischen Therapie bilden:

1. Die erwähnten Eigenschaften sind auch im extravaskulären Blute und in dem daraus gewonnenen zellfreien Serum nachweisbar.

2. Diese Eigenschaften sind so dauerhafter Natur, daß sie auch im Organismus anderer Tiere wirksam bleiben, sodaß man imstande ist, durch die Blut- bzw. Serum-Transfusion hervorragende therapeutische Wirkungen zu erzielen.

3. Die Tetanusgift zerstörenden Eigenschaften fehlen im Blute solcher Tiere, die gegen Tetanus nicht immun sind, und wenn man das Tetanusgift nicht immunen Tieren einverleibt hat, so läßt sich dasselbe auch noch nach dem Tode der Tiere im Blute und in sonstigen Körperflüssigkeiten nachweisen.

Diese Gift zerstörende Eigenschaft nannte v. BEHRING „antitoxisch“, ihr materielles Substrat „Antitoxin“, um zum Ausdruck zu bringen, daß nicht die Bazillen es sind, sondern das von ihnen produzierte „Toxin“, gegen welches es seine Wirksamkeit richtet.

Nachdem auf diese Weise ein praktisch äußerst wertvolles Mittel gefunden war, das vom Blute aus als Gegengift im engsten Sinne des Wortes eine Heilwirkung auszuüben versprach, arbeiteten die hervorragendsten Forscher auf dem Gebiete der Serumtherapie mit größtem Eifer und Fleiß Methoden aus, durch welche man heute in den Stand gesetzt ist, hochwertiges Antitoxin darzustellen, seine Wirksamkeit in exakter Weise zu messen, und zeigten den Weg, in welcher Weise das

in den Handel gebrachte Präparat dem Organismus einzuverleiben sei, damit es seine Wirkung am besten entfalten könne. Bereits im Oktober 1891 stellten Koch, Kitasato, Schütz und v. Behring in einer Konferenz den Arbeitsplan zur Immunisierung von Pferden fest, nachdem sie sich durch eine Reihe von Untersuchungen über die besten Methoden informiert hatten. Neben diesen Forschern waren es vor allem Ehrlich und Brieger, welche mit ihren Mitarbeitern den Verlauf der Antitoxinproduktion verfolgten, und Methoden zur Konzentrierung und Reinigung des Antitoxins ausarbeiteten. In Deutschland haben sich noch Buchner, Knorr und später Ransom und v. Behrings Schüler, in Italien Tizzoni und seine Schülerin Cattani, in Frankreich Roux und Vaillard an der Forschung beteiligt, die auch heute noch durchaus nicht abgeschlossen ist, wie die neuesten Arbeiten v. Behrings beweisen. Die Nennung dieser Hauptvertreter möge jedoch hier genügen.

I. Darstellung des Antitoxins.

Die Darstellung des Tetanusantitoxins zerfällt in zwei Phasen: A. einen physiologischen und B. einen chemischen Teil.

A. Immunisierung. Der physiologische Abschnitt der Darstellung (die Immunisierung) erfordert neben der strengen Einhaltung aller Detailvorschriften noch die genaue Kenntnis der Reaktionen des Organismus auf die Einverleibung des Toxins, die es ermöglicht, die Giftwirkung ganz zu vermeiden, oder wenigstens auf ein Minimum herabzusetzen. Wer es unternimmt, ein Antitoxin darzustellen, muß als Physiologe auf jede Reaktion seines Versuchstieres achten, und sich darüber Rechenschaft geben können. Er muß aber auch das Toxin genau kennen, mit welchem er arbeitet. Deshalb seien hier einige Bemerkungen über die Wahl des Toxins und seine Prüfung, sowie über die Wahl des Tieres vorausgeschickt, welches sich am besten für praktische Zwecke zur Immunsisierung eignet.

1. Wahl und Prüfung des Toxins („Rohgift“). Die Bereitung des Toxins ist im Vorhergehenden ausführlich besprochen worden. Hier sei nur daran erinnert, daß es zweckmäßig ist, den zur Verwendung gelangenden Kalbfleischnährboden statt mit der sonst üblichen Soda mittels Magnesiumkarbonats zu neutralisieren, und durch einen Zusatz von 1 ‰ Milchsäure die physiologische Wirkung des Tetanusgiftes zu steigern (Roux und Yersin) Dabei soll die Bouillon 2 % Chloride (mindestens ½ % NaCl) und 1 % Pepton enthalten. Über den Zusatz von $CaSO_4$ s. Bd. I, pag. 105. Nach 7—10 Tage langem Aufenthalte im Brutschranke und möglichst rascher*) Filtration durch Berkefeldsche Kieselguhr-, nachher Pukall-Filter aus gebranntem Ton, kann das Gift entweder in flüssigem Zustande (Konservierung durch Zusatz von Karbolsäure, sodaß eine 0,5 %ige Lösung entsteht), oder nach Ausfällung mit Ammonsulfat (Darstellung und Reinigung Bd. I, pag. 111, 113) oder neutralem Bleiazetat (Reinigung mit Na_2SO_4 pag. 115) verwendet werden. Bei Fällung des Rohgiftes durch Ammonsulfat ist es unbedingt notwendig, sobald größere Dosen davon injiziert werden, das Gift durch 24stündiges Dialysieren von Ammonsulfat möglichst zu befreien. Über Pulverisierung und Konservierung des Rohgiftes pag. 112. Hier sei noch erwähnt, daß das

*) Bei langsamer Filtration geht in das Filtrat weniger Toxin über als bei rascher.

Gift feinst gepulvert und vor Licht und Feuchtigkeit geschützt werden soll. (Also dunkler Exsikkator, in welchem man die Schwefelsäure sehr oft erneuern muß!)

Der Wirkungswert des Toxins, („direkter Giftwert"), dessen Kenntnis für die Immunisierung erforderlich ist, wird in folgender Weise bestimmt (v. Behring): Man sucht zunächst die tötliche Minimaldosis für Mäuse, das heißt diejenige Menge, welche eine weiße Maus von ca. 20 g im Laufe von 4 Tagen sicher tötet. Zu diesem Zwecke stellt man sich die 100 fache, 500 fache, 1000 fache Verdünnung des Toxins in Wasser her, und injiziert davon je 0,1 ccm weißen Mäusen von ca. 20 g unter eine Hautfalte in der Steißgegend. Findet man nun, daß z. B. bei der Injektion von 0,1 ccm der 1000 fachen Verdünnung die Mäuse in 4—7 Tagen zugrunde gehen, so injiziert man die doppelte Menge dieser Verdünnung, also 0,2 ccm. Starben die injizierten Mäuse unter dem charakteristischen Bilde des Tetanus in 3—4 Tagen, so ist 0,0002 g der betreffenden Bouillon die minimale letale Dosis. —

Für die Wahl des Toxins ist nach Behrings neueren Untersuchungen nicht allein der direkte Giftwert maßgebend, sondern auch die Kenntnis des indirekten Giftwertes und des sogenannten Differentialwertes.

„Indirekter Giftwert": Der indirekte Giftwert wird gefunden, indem man diejenige Verdünnung des Giftes sucht, welche mit $^1/_{1000}$ Testantitoxin (Normalserum*) eine Mischung gibt, welche für Mäuse eben noch unschädlich ist. (Die v. Behringsche Neutralitätsformel*) für eine solche Mischung lautet: $^1/_{1000}$ A.-E. + x Gift = Lo). Im speziellen halte man sich an folgendes Prüfungsschema: Man löst, wenn man festes Testantitoxin als Ausgangsmaterial benutzt, dieses in soviel Wasser mit 0,3 % Karbolsäuregehalt auf, daß eine Stammlösung entsteht, von der ungefähr 1 ccm $^1/_{10}$ Antitoxingehalt enthalten soll, und füllt in eine Reihe von Erlenmeyerschen Kölbchen je 1 ccm dieser Stammlösung und 0,5, 1,0, 1,5, 2 usw. bis 4 etc. ccm des zu prüfenden Giftes hinzu. Alle Kölbchen werden schließlich auf 40 ccm (mit Aq. destill.) aufgefüllt, die Mischung gut durchgeschüttelt, 30 Minuten stehen gelassen und schließlich je 0,4 ccm davon Mäusen unter die Haut eingespritzt. (Eine Maus von 12 g soll ca. 0,4 ccm erhalten, also bei Mäusen von verschiedenem Gewicht je 3 g Maus 0,1 ccm Flüssigkeit.) — Findet man nun, daß die Mischung mit 1 ccm das Tier unversehrt läßt, während die mit 1,5 ccm Toxin die Mäuse tötet, so müssen Zwischenverdünnungen von 1,0, 1,1, 1,2 usw. ccm angelegt werden. Jene Menge, welche keine Erscheinungen mehr hervorruft (sie sei z. B. 1,1), wird in die Neutralisierungsformel statt x eingesetzt: $^1/_{1000}$ A.-E. + 0,011 Gift = Lo. In 40 ccm waren nämlich 1,1 ccm Gift, in 0,4 also 0,011. Dies ist demnach der indirekte Giftwert des geprüften Toxins.

v. Behring verwendet jetzt zu praktischen Zwecken ein etwas einfacheres Prüfungsschema und läßt dabei das Gewicht der Mäuse außer acht, da Schwankungen von 10—15 g bei der Bestimmung des indirekten Giftwertes keinen nennenswerten Unterschied ausmachen: Man mischt 2 ccm Tetanusantitoxinlösung, welche $^1/_{100}$ Antitoxineinheit enthält (= 0,0001 g Testantitoxin) mit 2 ccm einer zehnfachen Verdünnung des zu prüfenden Kulturfiltrates und spritzt von dieser Mischung 0,4 ccm einer (10—15 g schweren) Maus ein. Bleibt die Maus gesund, so wird das Kulturfiltrat als minderwertig beseitigt, wird sie hingegen tetanus-

*) Erklärung des Begriffes und der Formel unter „Wertbemessung pag. 152 fg.".

krank und stirbt nach frühestens 4 Tagen an Tetanus, dann ist die Prüfung beendet, das Gift ist 20fach. Stirbt die Maus früher an Tetanus, so wird untersucht, ob auch noch mit 0,01 ccm Kulturfiltrat $^1/_{1000}$ A.-E. neutralisiert wird. Die giftigsten Kulturfiltrate waren in v. Behrings Versuchen $^1/_8$ fach. Nach Ammonsulfatfällung erzielt man leichtlösliches Trockengift mit 40 mal so großer Wirksamkeit.

„Differentialwert.“ Unter Differentialwert*) versteht v. Behring jenen Giftzusatz, welchen man braucht, um die eben krankmachende Dosis (L —) in die eben tötliche Dosis (L +) zu verwandeln, und bezeichnet als D = Wert diesen Zusatz für Toxin allein (bei Ermittlung des direkten Giftwertes), als d = Wert jenen Giftzusatz bei der indirekten Bestimmung (also im Toxin-Antitoxingemisch).

Für die Wahl des Toxins gelten nun folgende Erfahrungen:

1. Die frischen Kulturfiltrate müssen in der Menge von höchstens 0,02 ccm $^1/_{1000}$ Antitoxineinheit bis zur tötlichen Dosis zu neutralisieren imstande sein. (Sie müssen also in 1 ccm mindestens 2,000000 + ms = $^1/_{20}$ G.-E. enthalten*). Alle minderwertigen sind zu verwerfen.

2. Tetanusgifte mit sehr hohem d = Werte eignen sich zur Immunisierung und Antitoxingewinnung viel besser als solche mit kleinem d = Werte. Man wird also bestrebt sein, abgeschwächte Gifte zur Immunisierung zu verwenden, deren krankmachende Dosis weit unter der tödtlichen liegt. Zur Immunisierung eignen sich also vor allem alte, unter Toluolzusatz aufbewahrte Kulturfiltrate, bei welchen der direkte Giftwert mit der Zeit abnimmt. (Die Abnahme des indirekten Giftwertes erfolgt bedeutend langsamer.) Rascher erreicht man die Abschwächung durch Jodtrichlorid (v. Behring). — Dagegen vernichten hohe Temperaturgrade sowohl den direkten als den indirekten Giftwert, dürfen also zur Abschwächung nicht angewendet werden. Einen ganz eigenartigen Einfluß übt die Einwirkung des Tageslichtes und des direkten Sonnenlichtes auf Tetanuslösungen aus: Der indirekte Giftwert bleibt nach der Belichtung fast vollständig erhalten, und die Abschwächung des direkten Giftwertes (für Mäuse) betrifft in erheblichem Maße nur den Wert für die tödliche Minimaldosis, nicht für die krankmachende Minimaldosis, so daß also der D = Wert in belichteten Tetanusgiftlösungen außerordentlich groß wird. — Noch anders verändert Passage durch den Kaninchenkörper, vielleicht eine im Kaninchenkörper vorkommende Diastase („Tetanotoxinase“, Behring) das Gift, indem das Blut tetanusvergifteter Kaninchen sich für Kaninchen stärker erweist als bei der Prüfung an Mäusen und Meerschweinchen. — Eine besondere Eigenschaft zeigen die Mischungen von Antitoxin und Toxin mit unausgeglichenem Giftreste (Knorr). In solchen Mischungen ist $d > D$, d. h. man braucht mehr Toxin zur Erreichung der tötlichen Minimaldosis als in antitoxinfreien Flüssigkeiten, sie eignen sich demnach ganz besonders zur Immunisierung (vgl. pag. 148, 158).

2. Wahl des Tieres. Die verschiedenen Tierarten sind, wie wir im Abschnitt über das Tetanustoxin gehört haben, nicht von gleicher Widerstandsfähigkeit gegen die Vergiftung mit Tetanustoxin. Die Widerstandsfähigkeit (Resistenz) ist wohl zu unterscheiden von der Reaktionsfähigkeit im weitesten Sinne des Wortes. Die Dosis nämlich, welche überhaupt im Tierkörper noch nachweisbare Veränderungen hervorruft

*) Siehe Zeichenerklärung pag. 153.

ist für alle Warmblüter*), die für praktische Zwecke allein in Frage kommen, nahezu dieselbe, oder wenigstens nicht sehr verschieden. Die widerstandsfähigeren Tiere finden aber eher Zeit, sich durch Antitoxinproduktion gegen das Gift zu schützen (KNORR), weil es später von den giftempfindlichen Geweben gebunden wird als bei empfindlichen Tieren. So würde es also scheinen, als ob man bei der Wahl der Tierart die widerstandsfähigeren zu wählen hätte, um rascher und gefahrloser zum Ziele zu gelangen. Uns kommt es aber hier nicht auf die absolute Immunität des Tieres, sondern auf den Antitoxingehalt seines Blutes an, und dieser entspricht der Differenz zwischen dem ursprünglichen und dem künstlich erzeugten Grade der Widerstandsfähigkeit. (v. BEHRING, TIZZONI.) Man wird also die empfindlicheren Tiere für praktische Zwecke vorziehen. Meist wählt man größere Tiere, unter ihnen das Pferd, als das empfindlichste, oder die viel weniger empfindliche Ziege, unter Umständen auch das Schaf. (Rinder geben selbst bei Anwendung stärkster Toxindosen nicht annähernd soviel Antitoxin wie Pferde.) Es ist dabei stets darauf zu achten, daß die Tiere gesund, nicht zu jung und nicht zu alt sind. (Pferde z. B. sollen 5—6 Jahre alt sein.) Auf das Alter der Tiere ist im Einzelfalle besondere Rücksicht zu nehmen. Für Laboratoriumzwecke kommen unter den kleineren Tieren fast nur Kaninchen in Betracht.

3. Reaktion des Organismus auf die Toxininjektion und Verlauf der Antitoxinproduktion.

a) Reaktion des Organismus auf eine einmalige Injektion von Tetanustoxin; Beginn der Antitoxinproduktion. Es kann hier natürlich nur von Toxindosen die Rede sein, welche den Tieren keinen dauernden Schaden zufügen. Wenn wir von den tödtlichen Dosen absehen, können die verabfolgten Dosen krankmachend, physiologisch wirksam, oder ganz unwirksam sein. Auch die unwirksamen Dosen kommen hier nicht in Betracht, wenn die Tiere nicht vorbehandelt sind und das Toxin nicht abgeschwächt wurde. Die physiologisch wirksamen und krankmachenden Dosen fallen bei empfindlichen Tierarten unter dieser Vorausetzung ziemlich nahe zusammen, so daß wir es meist mit letzteren zu tun haben. Den Abstand zwischen der eben krankmachenden und der tödtlichen Dosis nennt man den Differenzwert des Giftes. Injiziert man einem Tiere eine krankmachende Dosis des Tetanustoxins, so ist es, solange Krankheitssymptome allgemeiner**) Natur (Abmagerung, Temperaturerhöhung, verminderte Freßlust, Unbehilflichkeit der Bewegungen, eventuell Kontrakturen der Rückenmuskeln) andauern, empfindlicher gegen Tetanustoxin als im frischen Zustande. Während dieser Zeit ist kein Toxin im Blute nachweisbar, das man nur während der Inkubationszeit findet. Sobald sich die Tiere erholen, beginnt die Antitoxinproduktion, und nun vertragen sie mehr, als die für die Kontrolltiere tödtliche Minimaldosis. Der Zeitpunkt des Beginnes der Antitoxinproduktion kann in jedem Einzelfalle variieren, ist aber nach dem Gesagten leicht zu erkennen (Temperaturmessung, Körpergewicht etc.).

b) Um die Reaktion des Organismus auf mehrmalige Toxininjektionen und den Verlauf der Antitoxinproduktion zu studieren, haben EHRLICH und BRIEGER und v. BEHRING die Ausscheidungsprodukte

*) Bei wechselwarmen Tieren kommt noch die Höhe der Temperatur in Betracht. Der Grad der Antitoxinbildung ist übrigens oft unabhängig vom Auftreten von Krankheitserscheinungen (Alligator, auch Vögel).

**) Lokale Reaktionen kommen nicht in Betracht.

der Versuchstiere (Milch, Harn) jeden zweiten Tag auf ihren Antitoxingehalt geprüft, und sind auf diese Weise zur Kenntnis von dem gesetzmäßigen Ablauf der Antitoxinbildung gelangt. Ehrlich und Brieger, welche ihre Untersuchungen an der Milch einer bereits am Ende ihrer Trächtigkeitsperiode immunisierten Ziege anstellten, machen ihr Versuchsergebnis in einer Kurve anschaulich, die sie erhielten, indem sie auf der Abszisse die Zeit (Tage), auf der Ordinate den Antitoxingehalt der Milch*) eintrugen. Diese Kurve sei hier wiedergegeben, da sie die Folgen einer Injektion an dem bereits immunisierten Tiere am besten illustriert (Fig. 1).

Fig. 1. Reaktion des Organismus auf mehrmalige Toxininjektionen. (Verlauf der Antitoxinproduktion.) Ehrlich und Brieger.

Die erste Wirkung der Injektion besteht darin, daß bereits am nächsten Tage der Wert der Milch von 4000 A.E. (Antitoxineinheiten) auf 1000 herabsank, eine Zeitlang gleich blieb, am fünften Tage zu steigen begann, um am 17. Tage sein Maximum (9000 A.E.) zu erreichen. Von da ab fiel der Wert langsam aber gleichmäßig ab, um am 29. Tage

*) Der Schutzwert der Milch betrug zu Beginn der Untersuchungen 4000 A.E. Über die Bedeutung dieser Zahl und die Auswertung des Antitoxins s. Kap. II, pag. 152 fg.

nach der Injektion sich auf einen Endwert von 4000 dauernd einzustellen, der nun Wochen hindurch unverändert blieb. Zur Erklärung der Erscheinung sei nur erwähnt, daß zuerst das im Körper kreisende Toxin einen Teil des bereits vorhandenen Antitoxins bindet; dann findet eine Überproduktion von Antitoxin statt, bis zum doppelten oder mehrfachen der ursprünglichen Höhe, endlich stellt sich der Organismus auf einen bestimmten Endwert ein (meist nach 2 Wochen).

Günstigster Zeitpunkt für die Immunisierung: Aus diesen Tatsachen geht für die Immunisierung hervor, daß man in der ersten Periode nicht injizieren darf, weil die Gefahren für das Versuchstier zu groß sind. Am besten wird die folgende Injektion jedesmal zu einer Zeit gemacht, zu welcher der Körper reichlich über Antitoxin verfügt, das ist also bei der Ziege etwa am 17.—18. Tage nach der letzten Injektion. Zu dieser Zeit darf man sogar größere Mengen Toxin injizieren als später. Fig. 2 (ebenfalls der Arbeit von Ehrlich und Brieger entnommen) zeigt, wie die Antitoxinproduktion weiter ansteigt, wenn die Injektion zur Zeit der höchsten Antitoxinproduktion erfolgt. Auch für den Zeitpunkt der besten Ausbeute an Antitoxin ergeben sich aus diesen zwei Kurven Anhaltspunkte*).

4. Methoden der Immunisierung: Um in der Praxis Tiere gegen Tetanus möglichst gefahrlos hoch zu immunisieren, erteilt man ihnen zunächst eine Grundimmunität. Dies kann auf zweierlei Weise geschehen: entweder man injiziert den Tieren ein Toxin, dessen Differenzwert (s. oben) man künstlich erhöht hat, mit anderen Worten: abgeschwächte Toxine (älteres Verfahren). Oder man erhöht die Empfindlichkeitsbreite der zu immunisierenden Tiere dadurch, daß man ihnen vor Injektion des Toxins anfangs Antitoxin (womöglich homologes, d. h. derselben Tierart) injiziert (neueres Verfahren).

Die Abschwächung der Kulturen kann man auf verschiedene Weise erzielen. Am wenigsten eignet sich die Erwärmung auf 55—65° C (Vaillard), besser die Abschwächung durch H_2S nach Brieger, der das Toxin nach Einleiten von H_2S in zugeschmolzenen Röhrchen 4 Tage lang im Brutschrank stehen läßt, dann den Schwefelwasserstoff durch reinen Wasserstoff verjagt und das Toxin injiziert. Die besten Resultate erzielte v. Behring durch Zusatz von Jodtrichlorid, eine Methode, die im folgenden ausführlich beschrieben werden soll. Roux und Martin benützten Lugolsche Lösung (0,2 %) zur Abschwächung des Giftes. Babes und Pawlowsky, ebenso Knorr verwendeten Gift-Antitoxingemische mit unausgeglichenem Giftreste zur Erzeugung der Grundimmunität und bilden damit den Übergang zu jener Methode, welche die passive mit der aktiven Immunisierung kombiniert.

Bei der Immunisierung selbst soll man, wie aus dem über die Reaktion des Organismus auf die Injektionen Gesagten hervorgeht, nicht zu häufig, sondern in ganz bestimmten, für jede einzelne Tierart getrennt zu besprechenden, Abständen vorgehen. Dabei soll namentlich im Anfang darauf geachtet werden, daß die empfindlicheren Tiere über die schnell tötende Dosis etwa im Laufe von 2 Monaten hinweggebracht

---

*) Der hier geschilderte Injektionsmodus wird in neuester Zeit nicht mehr gehandhabt, weil sich herausgestellt hat, daß die Tiere zuweilen gerade zur Zeit des höchsten Antitoxingehaltes des Blutes gegen Einverleibung großer Dosen des Antigens außerordentlich empfindlich sind. („Überempfindlichkeit", Anaphylaxie, vgl. Bd. I, pag. 274, 1064). Man injiziert aus diesem Grunde besser jeden 5. Tag kleinere Dosen. (Vgl. Bd. II, pag. 147.)

werden, dann erst besitzen die Tiere die gewünschte Grundimmunität. Natürlich muß man stets den Endzweck der Immunisierung im Auge behalten. So muß man z. B. dort, wo man die Milch zur Antitoxindarstellung gewinnen will, zur Vermeidung anämischer Zustände schon die krankmachende Dosis möglichst vermeiden. Bei der richtigen Einhaltung der im folgenden gegebenen Vorschriften für die einzelnen Tierarten und bei einiger Übung wird es übrigens stets zu vermeiden sein, daß die Versuchstiere erkranken. Die folgende Darstellung lehnt sich eng an die von v. Behring in seinen grundlegenden Arbeiten über die Immunisierung von Tieren gegen Tetanus an. Seine Methode bildet die Grundlage für alle anderen, und es wird genügen, wenn diese eine ausführlich mitgeteilt wird, da die kleinen Modifikationen der anderen sich daraus von selbst ergeben.

Fig. 2. Toxininjektion zur Zeit des höchsten Antitoxingehaltes im Blute. Ehrlich u. Brieger.

Zur Immunisierung eines Pferdes bedarf man einer größeren Menge, mindestens 200 ccm Tetanusbouillon (Filtrat) von solchem Wirkungswerte, daß 0,1 bis 0,2 ccm einer 500fachen Verdünnung jede Maus innerhalb 3 Tagen unter typischen Tetanuserscheinungen tötet. Diese 200 ccm Kultur erhalten zur Konservierung einen Karbolsäurezusatz bis zum Gehalte von 0,5% und werden in folgende vier Portionen geteilt:

Nr. 1. 20 ccm ohne weiteren Zusatz.
Nr. 2. 40 ccm erhalten einen Zusatz von 0,125% Jodtrichlorid.
Nr. 3. 60 ccm erhalten einen Zusatz von 0,175% Jodtrichlorid.
Nr. 4. 80 ccm „ „ „ „ 0, 25% „

Zeichenerklärung.

o—— gemessene Temperaturen o-·-·-·- Injectionen mit Tetanus-Toxin (in cm³).

„Lord" 8jähr. Wallach.

März 1896 — April 1896 — Mai 1896 — Juni 1896 — Juli 1896 — August 1896 — September 1896

Tetanus-Toxin + 0·25% JCl₃ — + 0·175% JCl₃ — + 0·125% JCl₃

Tetanus-Toxin allein.

Temperatur — Tetanus-Toxin-Mengen

Fig. 3. Temperaturtabelle eines mit Tetanustoxin immunisierten Pferdes.

Das Pferd erhält zuerst von der Mischung Nr. 4 subkutan 10 ccm, nach weiteren 8 Tagen wieder 20 ccm, den Rest nach weiteren 3 Tagen. Die Mischung Nr. 3 wird dann in zwei Portionen à 30 ccm in achttägigen Interwallen injiziert, die Mischung Nr. 2. in zwei Portionen à 20 ccm. Nun überzeugt man sich nach einem Probeaderlaß, welchen Antitoxingehalt das Serum des Pferdes besitzt. (Methode s. Kap. II. pag. 153). Beträgt er für Mäuse unter 1 : 100, so darf man von der Kulturflüssigkeit ohne Zusatz (Nr. 1.) höchstens 0,25 ccm zur weiteren Immunisierung verwenden. Ist der Antitoxingehalt größer als 1 : 100, so darf (nach 8 Tagen) gleich mit 0,5 ccm begonnen werden. Von da an verdoppelt man die Dosis virulenten Toxins jeden fünften Tag. Diese Vorschriften dürfen, wie erwähnt, nicht mechanisch befolgt werden, sondern die Reaktion des Organismus muß stets durch Temperaturmessungen, Körpergewichtsaufnahme und Berücksichtigung des Allgemeinbefindens kontrolliert werden. Sobald irgendein Bedenken vorliegt, bleibt man bei der zuletzt angewendeten Dosis oder geht gegebenenfalls auf die nächstvorhergehende schwächere zurück, und steigt erst später mit der nötigen Vorsicht. Trotzdem man auf diese Weise mit der Immunisierung sehr hoch gehen kann, ist es nicht ratsam, die Immunisierung durch Anwendung großer Toxinmengen hoch zu treiben, da die hochimmunisierten Tiere überempfindlich werden (vgl. pag. 144). Sunt certi denique fines! ruft v. Behring aus, als ihm bei dem Versuche, den Antitoxingehalt einer Ziege, welche bereits die 125000 fache tödliche Dosis anstandslos vertragen hatte, beim Steigen auf das Doppelte der genannten Menge das Tier plötzlich unter rapider Zunahme der Symptome an Tetanus zugrunde ging. Am Morgen des Todestages enthielt die Milch noch 50 000 Immunitätseinheiten, das Blut, unmittelbar nach dem Tode entnommen, noch 60 000. Dieser lehrreiche Fall, der durchaus nicht vereinzelt dasteht, sei hier mitgeteilt, um zu zeigen, daß man selbst bei strengster Einhaltung aller Vorschriften namentlich bei hochimmunen Tieren vor üblen Zufällen nie vollkommen sicher ist.

Wie bei vorsichtiger Immunisierung nach der angegebenen Vorschrift die Temperatur den deutlichsten Hinweis auf das weitere Verhalten bei der Injektion gibt, zeigt Fig. 3, welche aus den Aufzeichnungen des k. k. serotherapeutischen Institutes in Wien rekonstruiert wurde. Die Erklärung der Zeichen geht aus der Tafel selbst hervor. Die Kurve zeigt, wie vorsichtig man mit der Toxininjektion nach Erzielung der Grundimmunität vorzugehen hat (1. Juni bis 31. Juli), ehe man zur jedesmaligen Verdoppelung der Dosis schreitet.

Der hohe Temperaturanstieg (40,7°) nach der Injektion von 200 ccm reinen Toxins am 24. September, dem schon nach der vorhergehenden Injektion eine Warnung vorausgegangen war, zwang dann (Ende der Kurve), mit der Dosis tiefer herabzugehen. —

Bei Ziegen hat man ähnlich vorzugehen wie bei Pferden, da sie aber weniger empfindlich sind, darf man rascher zur nächst höheren Dosis übergehen. Man verwendet, jeden 2.—3. Tag injizierend, etwa 5 Wochen lang abgeschwächte Kulturfiltrate, dann unverändertes Toxin, mit dem man jeden 5. Tag auf das doppelte steigt. — Bei Schafen darf man gleich mit 10 ccm der Mischung Nr. 3) beginnen, injiziert zweimal in 5 tägigen Pausen, dann (stets jeden 5. Tag) erst 5, dann 10, dann 20 ccm der Mischung Nr. 2), um schließlich (wieder nach 5 Tagen) 1 ccm des Toxins ohne Zusatz einzuspritzen, und sie alle fünf Tage zu verdoppeln. (Dabei ist außer auf Temperatur und Körpergewicht be-

sonders auf Darmkoliken zu achten!) — Bei Kaninchen vereinfacht man den Vorgang, indem man mit dem 20. Teile der tödlichen Minimaldosis beginnt und im Laufe von 4 Wochen auf das doppelte steigt. (Will man abgeschwächtes Toxin nehmen, so hat man 5 ccm der Mischung Nr. 4, 8 Tage später 5 ccm der Mischung Nr. 3, dann Nr. 2 zu injizieren). (Die Größe der Tiere ist zu berücksichtigen!) — Bei Mäusen beginnt man mit 0.4 %igen Jodtrichloridtoxin und steigt in achttägigen Intervallen, jedesmal 0,4 ccm inijzierend. (Trotz aller Vorsicht gehen doch ca. 50 % der Mäuse ein.)

In neuerer Zeit bedient man sich, wie erwähnt mit großem Vorteil der Toxinantitoxingemische mit unausgeglichenem Giftreste bei der Immunisierung größerer Tiere. Dabei kommt die Tatsache sehr zustatten, daß der indirekte Giftwert unter allen Umständen bei allen Tierarten gleich gefunden wird. Man stellt sich zunächt eine konzentrierte Mischung von Toxin mit Antitoxin her, die man an kleinen Laboratoriumstieren auf ihre eben noch krankmachende Wirkung (L—) prüft. Durch systematische Steigerung der Dosierung erreicht man eine Grundimmunität, auf deren Basis dann mit antitoxinfreiem Gift weiter immunisiert werden kann. —

Statt die Mischung von Toxin und Antitoxin im Reagenzglase vorzunehmen, kann man die Entgiftung im Tierkörper vor sich gehen lassen, indem man zuerst das Antitoxin und nach 18 bis 24 Stunden (nicht früher! vgl. pag. 157) das Toxin injiziert. Da der relative Antitoxinbedarf zur Neutralisierung des Tetanusgiftes nicht nur in vitro, sondern auch im Tierkörper bei getrennter Injektion (vgl. pag. 157, 158) mit steigender Dosierung immer geringer wird, ist es gestattet, bei den folgenden Injektionen, welche alle 2—3 Tage gemacht werden dürfen, mit der Toxindosis rascher zu steigen als mit der Antitoxinmenge, bis man schließlich, auf kleinere Toxininjektionen zurückgehend, dieses ohne Antitoxin geben darf, womit die Grundimmunität erreicht ist. Dies ist die Methode, welche derzeit im k. k. serotherapeutischen Institute in Wien als die zweckdienlichste angewendet wird.

Erwähnenswert ist schließlich noch eine Methode von mehr theoretischem Interesse, durch welche es gelingt, ein Tier sehr rasch hoch zu immunisieren (H. Meyer, zitiert bei v. Behring). Auf Grund seiner Untersuchungen über die Fortleitung des Toxins im Nerven (vgl. Bd. I, pag. 130). durchschnürte Meyer den Hauptnervenstamm eines Hinterbeines beim Kaninchen und injizierte dann Tetanustoxin unter die Haut des gelähmten Gliedes. Dadurch verhinderte er die direkte Wanderung des Toxins zum Zentralnervensystem und zwang es, seinen Weg durch die Lymphbahnen zu den Blutgefäßen zu nehmen, wodurch für die Antitoxinproduktion (welche ja erwiesenermaßen nicht im Zentralnervensystem stattfindet) besonders günstige Bedingungen geschaffen wurden. Er begann dabei mit ziemlich großen Giftdosen und erzielte im Laufe eines Monats in einem Falle einen Antitoxingehalt des Blutes von 0,2 A.-E. in 1 ccm Serum, in einem zweiten Falle von 0,45 A.-E., während man bei der aktiven (isopathischen) Immunisiernng sonst nach frühestens 6 Wochen langer Behandlung günstigenfalls einen Antitoxingehalt von etwa 0,1 A.-E. pro ccm Serum erzielt. —

B. Gewinnung des Antitoxins. Wir haben bereits gehört, daß das Antitoxin nicht bloß aus dem Blute gewonnen werden kann, sondern in schonender Weise auch aus den Sekreten und Exkreten der Tiere (Milch, Harn, Speichel, Darmentleerungen usf.). Für praktische Zwecke

kommen nur Blut und Milch in Betracht. Die Blutentnahme ist meist zu bevorzugen: 1. weil die Immunisierung bei nicht stillenden Tieren leichter und sicherer zum Ziele führt, 2. weil der Antitoxingehalt der Milch über einen oberen Grenzwert schwer hinaufgetrieben werden kann, während das Blutserum zu gleicher Zeit bereits bedeutend mehr Antitoxin enthält, 3. weil die Reinigung des Antitoxins im Serum leichter gelingt als die in der Milch. Der Darstellung auf chemischem Wege seien einige Worte über deu Aderlaß vorausgeschickt: Als günstigster Zeitpunkt für den Aderlaß würde nach dem oben Gesagten jene Zeit sich am besten eignen, zu welcher die Kurve der Antitoxinproduktion ihren Gipfel erreicht hat (also 17 Tage nach der letzten Toxininjektion). Für das Tier scheint es jedoch schonender zu sein, den Aderlaß etwas früher oder später vorzunehmen. Dem Aderlaß geht ein Probeaderlaß voran, durch welchen man sich von dem Gehalt des Serums an Antitoxin überzeugt, und durch welchen gleichzeitig die Gerinnungsfähigkeit des Blutes geprüft wird (gleichzeitig ein Kriterium für die Gesundheit des Tieres!). Über den Aderlaß selbst vgl. den allgemeinen Teil dieses Handbuchs.

Das Antitoxin kann aus dem Serum (Milch) entweder mechanisch durch Aussalzen oder chemisch durch Paarung mit Metallsalzen und nachherige Zerlegung in die Komponenten der entstandenen Doppelverbindung gewonnen werden*).

1. Aussalzen des Antitoxins: Die ersten, welche sich dieser Methode bedienten, waren Tizzoni und Ehrlich u. Brieger. Wir wollen hier nicht den langen, mühsamen Weg verfolgen, welchen die Autoren gehen mußten, um zu einer möglichst reichen Ausbeute zu gelangen, sondern gleich jenen nennen, welchen Brieger und Boer als den erfolgreichsten für praktische Zwecke am meisten empfehlen**).

Es ist dies die kombinierte Natriumchlorid- und Chlorkalium- (oder Jodkalium-) Fällung, welche vor allen anderen Aussalzungsmethoden den Vorteil hat, daß man das Antitoxin aus Blut und Milch quantitativ gewinnt, und daß dabei im Gegensatze zu anderen Methoden die schließliche Ausbeute an Antitoxin dem Antitoxingehalte des Serums proportional ist. Die Ausführung gestaltet sich folgendermaßen: 10 ccm Blutserum (Milch) werden mit 10 ccm Aqua destillata verdünnt, darin 4 g KCl (oder JK) gelöst, die Flüssigkeit mit 4—5 g fein zerriebenem NaCl tüchtig durchgeschüttelt und diese Mischung der Brutwärme (30—37 ° C) überlassen. Das Antitoxin ballt sich mit einem Teil des Albumens zu unlöslichen Niederschlägen zusammen, welche mit Wasser ohne Verlust ausgewaschen werden können. In schwach alkalischem Wasser geben diese Niederschläge das wirksame Prinzip quantitativ ab. Da die Reaktion auf Massenwirkung beruht, die Ausbeute an Antitoxin also umso größer wird, je länger die Salze auf die Flüssigkeit einwirken können, ist es zweckmäßig, mit dem Auswaschen des Niederschlages so lange zu warten, bis die Reaktion ihr Optimum erreicht hat. Das ist nach etwa 18—20 Stunden (bei 37 ° C). Dann saugt man den Niederschlag über Ton ab, trocknet im Exsikkator und dialysiert

*) Ob es sich hier wirklich um einen chemischen Vorgang, oder nicht auch um einen physikalisch-chemischen Vorgang (Ausflockung) handelt, bleibe dahingestellt. Die obige Darstellung entspricht der Auffassung in Briegers Originalarbeiten.

**) Über die Aussalzungsmethoden und ihre theoretischen Grundlagen vgl. Bd. II: „Darstellung der Antitoxine mittels chemischer und physikalischer Methoden" (E. Pribram).

zur Entfernung der Salze. Auf diese Weise erhält man aus 10 ccm Blutserum 0,4 g Trockensubstanz, welche das Antitoxin quantitativ enthält, nebenbei aber noch reichlich Eiweißsubstanzen. Um diese möglichst zu entfernen, löst man den Niederschlag in 10 ccm Wasser und versetzt mit dem gleichen Volumen fein gepulverten Magnesiumsulfats, läßt die Flüssigkeit 2—3 Stunden im Brutschrank stehen und filtriert bei 37° C (also noch im Brutschrank!) den dabei entstandenen Niederschlag ab, und wäscht ihn möglichst rasch mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung. Längeres Stehenlassen im Brutschrank ist zu vermeiden, weil das Antitoxin dadurch an Wirksamkeit verliert. Der Niederschlag wird abermals dialysiert und es bleibt ein Pulver von 0,2 g als Trockenrückstand. (Aus 1 l Ausgangsmaterial erhält man auf diese Weise ca. 1 g.) Das erhaltene Pulver ist in Wasser sehr leicht löslich. Statt der zuletzt erwähnten Dialyse kann man den mit $MgSO_4$ ausgewaschenen und gut getrockneten Niederschlag nach Ehrlichs Vorschlag mit reinem Chloroform schlemmen. Man verliert so weniger Antitoxin als durch Dialyse. Brieger und Boer empfehlen, den Niederschlag zunächst mit einem Gemisch durchzuschütteln, das 3 Teile Tetrachlorkohlenstoff und 1 Teil Chloroform enthält. Durch den Zusatz von Tetrachlorkohlenstoff wird die Klärung der Emulsion beschleunigt, was man übrigens auch durch Zugießen von Chloroform erreichen kann. Die das wirksame Prinzip enthaltenden Bestandteile sammeln sich auf der Oberfläche der Flüssigkeit und können leicht abgeschöpft oder durch ein trockenes Filter abfiltriert werden. Die Verwendung des Chloroforms bei der Reinigung empfiehlt sich gegenüber der Dialyse auch deshalb, weil man auf diese Weise gleichzeitig ein antiseptisches Material erzielt. Ein anderer Vorzug dieses Verfahrens ist der, daß man den mit Chloroform behandelten Niederschlag, wenn er vorher einigermaßen trocken war, nicht erst im Vakuum trocknen muß, da er von selbst sehr rasch trocknet. Hat man Milch als Ausgangsmaterial verwendet, so ist die durch das Chloroform erzielte Entfettung ein weiterer Vorteil.

Die meisten Aussalzungsmethoden (Tizzoni, Brieger und Ehrlich, Brieger und Cohn) haben wohl nur mehr historischen Wert.

2. Gewinnung des Antitoxins durch Paarung mit Metallsalzen. Prinzip: Das Antitoxin wird mit einem Metallsalz derart gepaart, daß eine stabile, widerstandsfähige Doppelverbindung geschaffen wird, von der nun das Eiweiß leicht abgespült werden kann. Diese Paarung muß auf nicht zu eingreifende Weise wieder in ihre Komponenten zu zerlegen sein.

Das beste Verfahren ist die Paarung an ein Zinksalz: 10 ccm Serum werden mit dem fünffachen Volumen Wasser verdünnt, mit 20 ccm einer 1 %igen $ZnSO_4$ = lösung versetzt, der Niederschlag nach kurzem Stehenlassen abfiltriert. (Im Filtrat entsteht häufig noch nachträglich eine Trübung, welche jedoch kein Antitoxin enthält.) Der Niederschlag wird vorsichtig, mit möglichst wenig Wasser (in viel Wasser löslich!) ausgewaschen, dann in schwach alkalischem Wasser (1 Tropfen NaOH zu 20 ccm Wasser) gelöst, und CO_2 eingeleitet. Es entsteht ein Niederschlag, in welchen der Zinksalzpaarling hineingerissen wird. Der Niederschlag wird nun im Exsikkator getrocknet, in Wasser gelöst. Dabei lösen sich nur die Zn-Albuminate, nicht aber das Zn-Antitoxin, das abfiltriert wird, und mit schwachen Alkalien oder Kochsalzlösung aufgenommen, in Lösung geht. Durch weiteres Einleiten von CO_2 kann das Antitoxin aus seiner Zn-Verbindung wieder befreit werden, indem

der größte Teil des Zinks eliminiert wird. — Statt $ZnSO_4$ kann man auch $ZnCl_2$ verwenden. Der Gang der Darstellung ist dann ungefähr derselbe, nur erhält man das Zinkchloridantitoxin beim Einleiten von CO_2 nicht in den Niederschlag, sondern es bleibt in Lösung, wird abfiltriert, getrocknet, durch Lösung der Zinkalbuminate in Wasser von diesen befreit, mit schwachen Alkali oder Kochsalz gelöst, und durch weiteres Einleiten von CO_2 gereinigt.

Eine andere Methode ist die Fällung mit $HgCl_2$, welches mit dem Eiweiß das Antitoxin quantitativ ausfällt. Ausführung: Das Blutserum wird mit sehr geringen Mengen NaCl versetzt, und dann mit Sublimat gefällt. Durch den NaCl-Zusatz wird der Paarling in Lösung gehalten. Der Eiweißniederschlag wird abfiltriert, das Filtrat 24 Std. dialysiert, im Vakuum getrocknet und nochmals gelöst. Man erhält auf diese Weise eine schwer lösliche amorphe Masse, die aber noch $HgCl_2$ enthält. — Fällung mit neutralem Bleiacetat: Neutrales (nicht basisches) Bleiacetat wird mit einer Spur NH_3 in recht verdünnter Lösung zum Serum zugegossen, die meisten Eiweißkörper fallen auf diese Weise aus, das Bleiantitoxin bleibt in Lösung. Die filtrierte Flüssigkeit wird mit $(NH_4)_2SO_4$ geschüttelt, dialysiert und getrocknet. (10 ccm Serum geben 0,06 eines leicht löslichen Pulvers, das quantitative Antitoxinwirkung des Ausgangsmaterials besitzt. Ein Nachteil dieser Methode ist der, daß die Bleiverbindungen sich bei geringstem Überschuß der Reagentien, namentlich des Ammoniaks, lösen. —

Konservieren des Antitoxins: Flüssiges Serum erhält zur Konservierung ein Zusatz von 0,5 % Phenol oder 0,4 % Trikresol. Um sich davon zu überzeugen, ob der Phenolgehalt unschädlich ist, wird einer Maus von 15 g $1/2$ ccm Serum subkutan injiziert. Sie darf der Giftwirkung des Phenols nicht erliegen. Ein mehr oder weniger starkes Zittern als leichte Vergiftungserscheinung infolge des Phenolgehaltes des Serums spricht nicht gegen seine Verwendbarkeit. (Über nähere Details und Prüfung auf etwaigen Toxingehalt oder Tetanuskeime muß auf den allgemeinen Teil dieses Handbuches verwiesen werden.) — Um trockenes Serum aufzubewahren ist es von Vorteil, Röhrchen mit kleinen Antitoxinmengen zu beschicken, weil für Prüfungs- und Versuchszwecke doch nur kleine Mengen verwendet werden. Marx verfährt in der Weise, daß er das getrocknete Serum, etwa 0,5 g in so viel Wasser löst, daß 0,5 ccm der Lösung gerade 0,2 A.E. entsprechen. Man trocknet nun je 0,5 ccm in den Serumröhrchen eines Vakuumapparates im Exsikkator (etwa über Nacht) und erzeugt dann nach Zusammensetzung des Apparates das vollständige Vakuum. Das Serum bildet in den Gefäßen einen gerade noch sichtbaren Schleier, der in 20 ccm Wasser gelöst, eine Antitoxinlösung ergibt, welche in 1 ccm genau $1/100$ A.E. enthält. („Standardserum".) Die Aufbewahrung in wässerigem Glyzerin, wie sie für das Diphtherieheilserum angewendet wird, ist für das Tetanustoxin nicht zu empfehlen, da es nicht so haltbar ist wie ersteres. —

Eigenschaften: Das Antitoxin ist löslich nur in Wasser, unlöslich in Alkohol und Aether. Es ist sehr empfindlich gegen Säuren und Alkali, ebenso gegen Pepsinverdauung (bei Gegenwart von Säure!). Gegen Trypsinverdauung ist es ziemlich resistent. (Pröscher). Durch Dialysiermembranen gehen geringe Mengen hindurch, der größte Teil wird zurückgehalten (Brieger und Ehrlich, Wassermann). Bei 68 ° C wird gelöstes Tetanusantitoxin fast vollständig zerstört, im trockenen

Zustande verträgt es jedoch höhere Temperaturen (Camus.) Kälte übt keinen Einfluß aus. — Im Blutserum ist das Tetanusantitoxin an die Globulinfraktion gebunden. —

II. Wertbemessung des Tetanusantitoxins.

Mischungswert — Schutzwert — Heilwert: Der Mischungswert eines Serums gibt an, welche Menge davon in vitro die Prüfungsdosis eines Testtoxins von bekanntem Werte eben neutralisiert. Den Schutzwert berechnet man aus dem Prüfungsergebnis an einem Individuum, dem man zuerst das Serum, dann das Toxin injiziert hat. Injiziert man hingegen das Antitoxin nach Einverleibung des Toxins, so ergibt das Prüfungsergebnis den sogen. Heilwert. Das Grundprinzip bei allen Methoden der Wertbemessung ist Ehrlichs Gesetz der konstanten Multipla. Der Gedanke, der diesem Gesetz zugrunde liegt, ist der, daß jede Toxindosis durch eine bestimmte, stets konstante Menge Antitoxin neutralisiert wird. Je nachdem nun, ob man die Toxinmengen variiert und die Antitoxinmengen konstant läßt, oder umgekehrt die Antitoxinmengen variiert und die Toxinmengen konstant läßt, gelangt man zu zwei Methoden, welche bei der Prüfung des Antitoxingehalts einer Flüssigkeit (Serum, Milch, Harn usw.) zur Verwendung kommen können. Die eine Methode bestimmt jenes Multiplum der einfach tödtlichen Dosis des Testtoxins, welches von der zu prüfenden Lösung eben noch neutralisiert wird (ein kleiner Überschuß tötet das Versuchstier). Die andere Methode sucht das Minimum der immunisierenden Substanz, das vor der einfach tödtlichen Dosis schützt. Dieser letzteren Prüfungsart bedient sich v. Behring in allen seinen Versuchsanordnungen, indem er die Prüfungsdosis des Testtoxins stets konstant läßt.

Nomenklatur, v. Behrings Abkürzungen. Da weder das Toxin noch das Antitoxin reine Substanzen sind, ist man genötigt, ein willkürlich gewähltes Maß bei der Wertbemessung einzuführen. Anfangs wählte man das Toxin als Maß, indem man die minimale letale Dosis eines beliebigen Toxins als Ausgangsgift am Versuchtier feststellte (direkter Giftwert). Da aber das Toxin sich rasch und unvermittelt ändert, wobei der Giftwert rascher abnimmt als die Fähigkeit, Antitoxin zu binden, sah man sich genötigt, ein Antitoxin als Maßstab festzusetzen („Standardserum", „Testantitoxin") und den indirekten Giftwert zu bestimmen (vgl. pag. 3). Eine Dosierung nach Gewicht oder Volumen ist wegen der eben erwähnten Eigenschaft des Toxins nicht möglich, weshalb v. Behring eine physiologische Messungsterminologie einführte, wobei er von der Titrierung der für 1 g Lebendgewicht tödtlichen Minimaldosis ausgeht. Der Einfachheit und Übersicht halber bedient er sich folgender Abkürzungen*).

---

*) 1 Ms bedeutet: 1 g Lebend-Mäusegewicht.
1 + Ms „ Tödtliche Minimaldosis für 1 Ms (kann durch den direkten Giftwert ermittelt werden).
1 + ms „ Die Antitoxin-neutralisierende Energie eines Tetanusgiftes (kann nur durch Zusatz von Antitoxin ermittelt werden). Bei frischen Toxinen ist: 1 + Ms = 1 + ms, später wird infolge des erwähnten labilen Charakters des Tetanustoxins: 1 + ms > 1 + Ms, weil der direkte Giftwert stärker abnimmt als der indirekte.
1 — Ms „ Die Antitoxinmenge, welche von einem Toxin neutralisiert wird (vermöge seines Gehaltes an + ms).

Die Labilität der Gifte erstreckt sich, wie erwähnt, nicht **bloß** auf ihre Toxizität, sondern auch auf ihre antitoxinbindende Energie, d. h. sie verlieren mit der Zeit einen Teil ihres direkten Giftwertes (+ Ms). Um die Beziehungen zwischen direktem und indirektem Giftwert zum Ausdruck zu bringen, dividiert man die Zahl der in 1 g (1 ccm) enthaltenen + Ms durch die Zahl der + ms, und schreibt die gekürzte Bruchform.

Beispiel: Ein frisches Gift hatte ursprünglich 4000000 + Ms und ging später auf 1600000 + Ms zurück. Die Antitoxin neutralisierende Eigenschaft blieb vollkommen erhalten, das Gift hat also 4000000 + ms. Dann schreibt man: Gift Nr. . . $\frac{1\,600\,000}{4\,000\,000} = {}^2/_5$ Gift. (Ein frisches Gift mit dem Index $\frac{+\mathrm{Ms}}{+\mathrm{ms}} = {}^1/_1$ heißt „Gleichgift".) Der indirekte Giftwert wird gefunden, indem man die Neutralisierungsformel eines bekannten Antitoxins für das Gift x einsetzt: $^1/_{100}$ A.-E. + x Gift = Lo (vgl. pag. 3).

Prüfung des Mischungswertes: Will man ein Tetanusantitoxin von unbekanntem Antitoxingehalt für die Praxis auswerten, so legt man sich verschiedene Verdünnungen an (1:100, 1:90, 1:80 usf.). Von diesen Verdünnungen bringt man je 1 ccm in ein Erlenmeyer-Kölbchen, das 38 ccm Aq. destill. enthält, fügt 1 ccm Testgift (Normalgift) hinzu, schüttelt um, läßt 30 Minuten stehen und prüft dann durch subkutane Injektion von 0,4 ccm an einer Maus von mittlerem Körpergewicht (ca. 12 g Gewicht). Bleibt die Maus gesund, so besitzt das Serum mindestens 10 A.-E. in 1 ccm, da 1 ccm einer 100fachen Verdünnung 1 ccm $^1/_{10}$ Normalgift vollkommen neutralisiert hat. Zeigt die Maus aber nach Injektion von 0,4 ccm der Mischung leichten Tetanus, so ist das Serum weniger als 10fach normal. Gesetzt den Fall, es stirbt diese Maus nach einigen Tagen, und von den anderen zeigen alle noch Tetanus bis auf die, welche die mit der 80fachen Verdünnung des Antitoxins hergestellte Mischung erhalten hatte, so wäre noch 1:70 und eine Zwischenverdünnung, etwa 1:85 zu prüfen. Zeigt auch die mit dieser Dosis behandelte Maus noch leichte tetanische Erscheinungen, so ist: $\frac{1 \text{ ccm Serum}}{100 \times 80} = {}^1/_{1000}$ A.-E., das unverdünnte Serum enthält also 8000 $^1/_{1000}$ A.-E. = 8 A.-E. In 0,4 ccm wurden der Maus 0,01 ccm Testgift + 1 ccm $\frac{\text{Ser.}}{100 \times 80}$ eingespritzt, da

---

1 A.E. bedeutet 1 Antitoxineinheit und wurde von v. Behring willkürlich = 40 000 000 — Ms gesetzt, d. h.: jene Menge eines Serums enthält 1 A.E., welche eine Maus von 10 g gegen die viermillionenfache letale Dosis frischen Toxins bei subkutaner Injektion schützt. v. Behring rechnet stets mit $^1/_{1000}$ A.E.

Ein „einfach normales Serum" nennt v. Behring ein Serum, das in 1 ccm . . . 1 A.E. enthält.

1 G.E. bedeutet: 1 Tetanusgiftnormaleinheit, und = 40 000 000 + ms.

Ein Normalgift ist ein Toxin, von welchem 1 ccm . . , 1 G.E. enthält, oder, was dasselbe ist ein Toxin, das durch 1 A.E. neutralisiert wird. v. Behring rechnet mit $^1/_{10}$ Normalgift (dieses enthält in 0,01 ccm . . . 40 000 + ms).

Die Neutralisierungsformel für ein Normaltetanusantitoxin und $^1/_{10}$ Normalgift schreibt v. Behring: $^1/_{1000}$ A.E. + 0,01 ccm T.G. (Testgift) in 0,4 ccm Aq. dest. = Lo (für Mäuse), d. h.: 0,01 ccm des Testgiftes werden durch das aufs 40 000fache verdünnte Serum derart neutralisiert, daß die Mischung für eine Maus von ca. 10 g unschädlich ist. (Lo = „limes glatt", d. h. es treten nach der Injektion keine Krankheitserscheinungen auf. L — (lokalisierter), L = (über größere Muskelpartien ausgedehnter), L = (allgemeiner Tetanus), L+ = „limes Tod" eben tödtliche Dosis).

40 ccm 1 ccm der Serumverdünnung und 1 ccm Testgift enthalten, also 0,4 ccm je 0,01.

Dabei ist zu bemerken, daß die Prüfungsdosis stets ungefähr gleich sein soll, da der relative Antitoxinbedarf in vitro mit steigender Dosierung abnimmt. (s. pag. 18).

Experimentelle Grundlage für die Ermittelung des Schutzwertes und Heilwertes eines Antitoxins: So wichtig die Kenntnis des Mischungswertes ist, so ist er doch kein absolut sicherer Ausdruck für die praktische Verwendbarkeit des Antitoxins. Während beim Diphtherieheilserum der Mischungswert, der Schutz- und Heilwert nach den Untersuchungen von Marx drei einander direkt proportionale Faktoren sind, stellte sich nach v. Behrings neuesten Untersuchungen heraus, daß dieses Gesetz nur für ganz frische Tetanusantitoxin-haltige Sera Giltigkeit hat, während nach längerer Aufbewahrung zwei Sera mit gleichem Gehalte an A.-E. im Tierversuche Differenzen aufweisen können. Deshalb muß für die praktische Verwendbarkeit eines Antitoxins die Prüfung auf Schutz- und Heilwerte im Tierexperiment vorgenommen werden. Diese geschieht durch getrennte Injektion von Toxin und Antitoxin, wobei die Wertbemessung genau in derselben Weise vorgenommen wird, wie bei der Bestimmung des Mischungswertes. Man sucht also, um den Schutzwert zu berechnen, das Minimum der antitoxischen Lösung, welches das Versuchstier vor der nachträglich einverleibten einfach tödtlichen Dosis schützt. Zur Bestimmung des Heilwertes injiziert man erst das Toxin und nachher das Antitoxin. Maßgebend für den Schutz- und Heilwert eines Antitoxins ist in erster Linie der durch die passive Immunisierung erzielte Gehalt des Blutes an Antitoxineinheiten. Dieser ist abhängig außer von der Zahl der injizierten A.E. noch von der Resorption und Ausscheidung des Antitoxins im Tierkörper. Tabelle 1, pag. 154 zeigt, wie im ganzen und großen bei den in v. Behrings Laboratorium untersuchten Tierarten die Aufnahme und Ausscheidung des injizierten Antitoxins vor sich geht.

Aus der Tabelle geht die Zeit hervor, zu welcher im allgemeinen der beste Immunisierungseffekt erzielt werden kann, das ist bei subkutaner Einverleibung meist der Fall, wenn das Antitoxin 18—40 Stunden vor dem Gifte gegeben wird. Je kürzer das Zeitintervall zwischen subkutaner Antitoxininjektion und subkutaner Giftinjektion wird, um so geringer ist die Schutzwirkung des Antitoxins. Ebenso sinkt der Heilwert, je mehr das Zeitintervall zwischen Antitoxin und Giftinjektion 36 Stunden überschreitet. Das Optimum des Antitoxingehaltes des Blutes liegt etwa zwischen der 24. und 36. Stunde nach der Antitoxininjektion, und zwar um so später, je größer die Antitoxindosis war (Knorr).

Bei jungen Individuen macht das maximale Multiplum des Antitoxingehaltes des Blutes nie ein so großes Multiplum des pro 1 g Körpergewicht gegebenen Antitoxins aus als bei ausgewachsenen und älteren Individuen derselben Art. Ebenso haben kranke Tiere z. Z. des Optimums bei gleich großer Injektionsdosis weniger Antitoxin im Blute als gesunde derselben Art. Dies gilt sowohl für Infektionskrankheiten (Tuberkulose usw.) als auch für akute Darmkrankheiten, bei welch letzteren namentlich durch die Darmschleimhaut viel Antitoxin ausgeschieden wird. Auch die Laktation übt einen ähnlichen Einfluß aus, abgesehen davon, daß, wie erwähnt, ein großer Teil des Antitoxins in die Milch übergeht.

Tabelle I. Erscheinen des Tetanusantitoxins im Blute und Verschwinden aus dem Blute bei passiver Immunisierung:

In 1 ccm Serum nach	Pferd				Meerschweinchen (600 g)		Kaninchen			
	Pf. 1 (500 kg) Inj. von: 10 000 — Ms pro 1 g (subkutan)	n*)	(Pf. 2 (500 kg) 2000 — Ms pro 1 g (subkutan)	n	1 666 000 — Ms pro 1 g (subkutan)	n	K. 1 (1000 g) 1 000 000 — Ms pro 1 g (intravenös)	n	K. 2 (1500 g) 666 666 — Ms pro 1 g (intravenös)	n
1 Std.	—	—	—	—	15 000 — Ms	$^7/_{111}$	20 000 000 — Ms	20	150 000 — Ms	$^1/_5$
4 „	10 000 — Ms	1	—	—	1 000 000 — Ms	$^3/_5$	—	—	3 000 000 — Ms	$4^1/_2$
8 „	30 000 — Ms	3	10 000 — Ms	5	2 000 000 — Ms	$1^1/_5$	—	—	5 000 000 — Ms	$7^1/_2$
12 „	60 000 — Ms	6	—	—	3 000 000 — Ms	$1^4/_5$	15 000 000 — Ms	15	8 000 000 — Ms	12
16 „	75 000 — Ms	$7^1/_2$	15 000 — Ms	$7^1/_2$	6 000 000 — Ms	$3^3/_5$	—	—	8 000 000 — Ms	12
20 „	—	—	—	—	8 000 000 — Ms	$4^4/_5$	—	—	8 000 000 — Ms	12
24 „	120 000 — Ms	12	25 000 — Ms	$12^1/_2$	15 000 000 — Ms	9	10 000 000 — Ms	10	8 000 000 — Ms	12
40 „	150 000 — Ms	15	30 000 — Ms	15	20 000 000 — Ms	12	10 000 000 — Ms	10	8 000 000 — Ms	12
6 Tagen	150 000 — Ms	15	—	—	7 500 000 — Ms	$4^1/_2$	2 500 000 — Ms	$2^1/_2$	3 000 000 — Ms	$4^1/_2$
12 „	100 000 — Ms	10	18 000 — Ms	9	1 000 — Ms	$^1/_{1666}$	ca. 30 — Ms	($^1/_{30000}$?)	ca. 30 — Ms	($^1/_{22000}$?)
19 „	90 000 — Ms	9	7 500 — Ms	$3^3/_5$	100 — Ms	$^1/_{16660}$	Kein sicherer Nachweis mehr möglich.			
21 „	85 000 — Ms	$8^1/_2$	—	—	Kein sicherer Nachweis mehr möglich.					
35 „	75 000 — Ms	$7^1/_2$	—	—						
56 „	50 000 — Ms	5	—	—						
80 „	30 000 — Ms	3	60 — Ms	$^3/_{100}$						

*) n gibt an, das Wievielfache der pro 1 g injizierten Antitoxinmenge in 1 ccm Serum nach der angegebenen Zeit wiedergefunden wurde.

Noch ehe das subkutan einverleibte Tetanusantitoxin im Blute erscheint, ist es bereits in der Lymphe nachweisbar. Ransom hat in einer Reihe von Untersuchungen das Auftreten, Verweilen und Verschwinden des Antitoxins in der Lymphe studiert, indem er einem Hunde in den Ductus thoracicus eine Kanüle einlegte, und ihm dann 300 000 — Ms pro 1 g Körpergewicht subkutan (in die linke Inguinalgegend) einspritzte. Beifolgende kleine Tabelle mag als Ergänzung zur obigen hier Platz finden. Sie zeigt, daß das Zeitintervall vom Momente der Antitoxininjektion (Pferdeserum, Hundeserum verhält sich übrigens ebenso), bis zum Augenblick des Auftretens von Antitoxin in der Lymphe bei subkutaner Injektion erheblich kürzer ist, als das bis zum Auftreten meßbarer Antitoxinmengen im Blutserum:

Erscheinen des Tetanusantitoxins in der Lymphe und im Blute nach subkutaner Einverleibung von 300 000 — Ms (Hund).

Intervall vom Momente der Antitoxininjektion bis zum Momente der Entnahme von Lymphe, bzw. Blut	Antitoxinmenge in 1 ccm Lymphserum	n*)	Antitoxinmenge in 1 ccm Blutserum	n
0—15 Min.	Spur	—	—	—
15—30 „	50 — Ms	$^1/_{6000}$	—	—
1—$1^1/_2$ Std.	6 000 — Ms	$^1/_{50}$	100 — Ms	$^1/_{3000}$
2—$2^1/_2$ „	25 000 — Ms	$^1/_{12}$	—	—
3—$3^1/_2$ „	55 000 — Ms	$^1/_5$	—	—
3—$4^1/_2$ „	100 000 — Ms	$^1/_3$	200 — Ms	$^1/_{1500}$

Aus Ransoms Untersuchungen geht also hervor, daß das Antitoxin nach subkutaner Injektion auf dem Wege durch die Lymphbahn die Blutbahn erreicht. Injiziert man das Antitoxin direkt in die Blutbahn, so stellt sich innerhalb relativ kurzer Zeit ein ganz bestimmtes Verteilungsverhältnis her, an welchem sehr lange festgehalten wird. Es tritt dabei, anfangs rascher, allmählich immer langsamer, solange Antitoxin aus dem Blute in die Lymphe über, bis diese etwa $^1/_3$ jener Menge enthält, welche im gleichen Volumen einer gleichzeitig entnommenen Blutprobe nachgewiesen werden kann. Ransom konnte noch nach 68 Std., zu einer Zeit, in welcher bereits ein großer Teil des Antitoxins bereits ausgeschieden war, dieses Verhältnis (1:3) nach intravenöser Injektion feststellen.

Bemerkenswert ist — worauf wir später noch zurückkommen — daß bei intravenöser Injektion nur ein sehr kleiner Teil des Antitoxins aus der Blutbahn in die Zerebrospinalflüssigkeit übergeht, und daß auch bei subarachnoidealer Injektion (im Bereiche des Gehirns oder Rückenmarks) das Antitoxin so schnell und so vollständig in das Blut gelangt, daß nach weniger als 24 Stunden fast das ganze injizierte Antitoxin im Blute wiedergefunden wird.

Schon aus dem über das Erscheinen des Antitoxins im Blute nach subkutaner Injektion Gesagten geht hervor, daß seine Wirkung eine ganz andere, und zwar viel schwächere sein muß, wenn man es später als das Toxin injiziert. Aber auch bei direkter intravenöser Einverleibung braucht man unvergleichlich größere Mengen von Antitoxin, um im

*) n wie pag. 155.

Körper kreisendes Toxin zu neutralisieren, als seinem Schutzwerte entspricht.

Nach intravenöser Injektion einer kleineren Toxinmenge (der doppelten tödlichen Dosis vermochte Dönitz die Tiere noch nach 20 Stunden vor dem sonst sicheren Tode zu retten, allerdings nur mit einer außerordentlich großen Menge Antitoxin, dem 3000fachen der gerade neutralisierenden Dosis, und nach 24 Stunden reichte auch diese Menge nicht mehr aus. Auf Grund dieses Experimentes empfiehlt Dönitz, bei der Serumtherapie des Tetanus ganz energisch vorzugehen und 18 bis 20000 A.-E. auf einmal zu injizieren, und zwar intravenös, um nicht erst die Resorpsionszeit abwarten zu müssen. Spätere Untersucher, vor allem Meyer und Ransom, verwarfen hingegen die intravenöse Injektion auf Grund ihrer durch Experimente gestützten Anschauung, nach welcher das rasch in das Nervensystem aufgenommene Toxin von dem intravenös injizierten Antitoxin nicht mehr erreicht werden kann. Wahrscheinlich läßt sich der Versuch von Dönitz daraus erklären, daß er das Toxin dem Versuchstiere intravenös beibrachte, während Meyer und Ransom das Toxin stets subkutan injizierten. Es ist nun erwiesen, daß das Toxin bei verschiedener Applikationsart verschieden rasch in das Nervensystem gelangt, so z. B. bei intramuskulärer Einverleibung nach $1^1/_2$ Stunden (Marie und Morax). Ähnlich dürfte es bei subkutaner Injektion ziemlich rasch in das Nervensystem gelangen, während es bei intravenöser Injektion wohl länger in Blut und Lymphe verweilt. Da Dönitz, wie erwähnt, mit möglichst kleinen Dosen arbeitete, ist es leicht denkbar, daß nach 20 Stunden erst ein noch nicht letaler Bruchteil des Toxins an die Nervenbahn gelangt war, während der größere Teil vom Antitoxin noch neutralisiert werden konnte.

Dönitz injizierte einem Kaninchen in die eine Ohrvene Toxin und sofort hernach in die andere Ohrvene ein Antitoxin, das in der Verdünnung 1:2000 die gegebene Toxinmenge (das 12fache der letalen Dosis) in vitro neutralisierte. Er mußte, um die Tiere am Leben zu erhalten, auf eine Verdünnung von weniger als 1:1200 herabgehen. Bei einer Zwischenzeit von 4 Minuten zwischen Toxin- und Antitoxininjektion brauchte er dazu die Verdünnung 1:1000, bei 8 Minuten 1:200, nach $^1/_4$ Std. 1:100, nach 1 Std. 1:50. Es beginnt also sofort nach der Injektion des Tetanustoxins die Bindung größerer Giftmengen (bereits in den ersten 4 Minuten), nach 8 Minuten ist mindestens die einfach tödliche Minimaldosis gebunden. Doch gelingt es, wie der erwähnte Versuch zeigt, noch nach 1 Std. mit Hilfe großer Antitoxinmengen das Toxin aus seiner wahrscheinlich noch lockeren Verbindung zu befreien und zu entgiften. Diese Sprengung der Giftverbindung gelingt um so schwieriger, je schwerer die Vergiftung ist und je längere Zeit bis zur Anwendung des Serums verstreicht.

Abgesehen von dieser raschen Giftbindung im Organismus, durch welche die „heilende“ Antitoxinwirkung sehr beeinträchtigt wird, scheint auch das Blut ein für diese Wirkung ungünstiges Medium zu sein, was allerdings nur bei Verwendung sehr kleiner Prüfungsdosen zum Vorschein kommt. Ransom fand, daß Meerschweinchenblut den Antitoxinbedarf für das Toxin erhöht. Dasselbe fand Kitashima, wenn er das Gift durch die Blutbahn des Meerschweinchens hindurchschickte und es dann in vitro zu neutralisieren versuchte.

Eigenschaften des Toxins und Antitoxins in der Mischung Toxin-Antitoxin: 1. Der relative Antitoxinbedarf zur Tetanusgift-

Neutralisierung in vitro wird mit steigender Dosierung immer geringer. Dasselbe ist der Fall, wenn man Antitoxin und Gift getrennt Tieren injiziert (v. Behring, Deutsche Klinik von Leyden und Klemperer Bd. I, 1901). Darin unterscheidet sich Tetanusantitoxin vom Diphterieantitoxin, das sich gerade umgekehrt verhält. (Über die praktische Verwendung dieser Eigenschaft s. pag. 147 und pag. 154).

2. Neutrale Mischungen bedürfen eines sehr großen Zusatzes von Toxin (+ Ms), um die tödliche Minimaldosis zu erreichen, und zwar braucht man um so mehr Toxin, je mehr + Ms in der Mischung neutralisiert waren.

3. Mischt man eine 10prozentige klare Lösung eines Tetanusgiftes mit soviel Antitoxin, daß die Mischung einen Giftüberschuß enthält, so zeigt dieser Giftüberschuß einige sehr merkwürdige Eigenschaften: Nach Buchner, später v. Behring und Knorr wirkt der unausgeglichene Giftrest einer solchen Mischung auf verschiedene Tierarten verschieden, namentlich ist das Inkubationsstadium außerordentlich verlängert (4 Tage und mehr).

4. Verdünnt man eine Mischung mit unausgeglichenem Giftreste, welche eben noch tödlich wirkt, so darf man die Verdünnung außerordentlich weit treiben, ohne daß die Mischungen von ihrer Wirkung etwas einbüßt.

Prophylaktische und therapeutische Anwendung des Tetanusserums.

Während die Erfolge der Serumtherapie mit Diphtherieantitoxin allgemein anerkannt sind, ist die Beurteilung der erfolgreichen Behandlung mit Tetanusantitoxin außerordentlich schwierig, z. T. weil die Krankheit mehr oder weniger sporadisch auftritt, vor allem aber wegen der häufigen plötzlichen Veränderungen im Verlaufe des Krankheitsbildes, und wegen der nicht seltenen spontanen Heilungen. Auf Grund wiederholter Statistiken (Engelmann, Köhler, v. Behring, Schuckmann u. a., die meisten mit günstigem, Schuckmann mit negativem Resultat) läßt sich bei kritischer Prüfung der einzelnen Krankheitsgeschichten nur sagen, daß sehr frühzeitige und ausgiebige Behandlung mit Tetanustoxin zuweilen lebensrettend gewirkt hat, nicht selten aber vollständig erfolglos war. — Unzweideutige Erfolge sind hingegen mit prophylaktischer Serumbehandlung erzielt worden, nach welcher der Wundstarrkrampf aufallend leicht verläuft.

Die prophylaktische Behandlung des Tetanus bedient sich zweier Methoden. Die eine besteht in der subkutanen Impfung. Nach v. Behrings Vorschrift sollen 10—20 Antitoxineinheiten, also etwa 1—2 ccm eines hochwertigen Antitoxins natürlich unter streng antiseptischen Kautelen unter die Haut (Bauchhaut) eingespritzt werden. Sehr schöne Erfolge teilt Suter aus der Genfer Klinik mit, wo seit mehreren Jahren jeder Patient mit offener Wunde prophylaktisch mit Tetanusserum behandelt wurde. Der genannte Autor stellt 12 Fälle zusammen, in denen der Tetanus nach prophylaktischer Serumbehandlung auffallend leichte Symptome darbot. Einer anderen Methode bedient sich Calmette beim Tetanus neonatorum, indem er das getrocknete Heilserum als Streupulver auf die offene Nabelwunde bringt. Dieser Schutz soll sich in Indo-China, wo $^1/_5$ der Kinder an Tetanus zugrunde geht, als vollkommen ausreichend erwiesen haben.

Die therapeutische Behandlung hat eben wegen der zweifelhaften und geringen Erfolge die verschiedensten Wege eingeschlagen, um das Tetanusantitoxin dem Organismus einzuverleiben:

1. Subkutane Injektion. Diese ist die einfachste und deshalb gebräuchlichste Methode. Man wird sie auch dann nicht vermissen können, wenn man nebenbei eine der anderen Methoden anwendet, weil sie die einzige ist, welche gestattet, sehr große Dosen ohne besondere Gefahren zu injizieren, und die Injektionen so oft zu wiederholen, als es wünschenswert erscheint. Als Ort ist für die Injektion die Infektionsstelle zu bevorzugen, und nach v. Behrings Vorschlag wenigstens ein Teil der zu verabreichenden Menge in der Nähe der Wunde zu injizieren. Die Menge des auf einmal injizierten Serums soll nicht über 20 ccm betragen. Da in 1 ccm flüssigen Serums höchstens 10 Antitoxineinheiten enthalten sind, injiziert man auf diese Weise höchstens 200 A.E. bei einer Injektion, und soll nicht weniger als 100 A.E. injizieren.

2. Die intravenöse Injektion des Tetanusserums wird wohl jetzt überhaupt nicht mehr gehandhabt, da Ransom s. o.) gezeigt hat, daß das Tetanustoxin aus dem subkutanen Gewebe mittels der Lymphgefäße aufgenommen wird.

3. Die intraneurale Injektion: Die Einspritzung wird in die dem Verletzungsgebiete angehörigen Nervenstämme vorgenommen. Man legt sie zu diesem Zwecke durch einen Einschnitt frei, sticht eine feine Hohlnadel in sie hinein, und injiziert in schräger, zentripetaler Richtung eine möglichst antitoxinreiche Flüssigkeitsmenge, mit welcher man den Nerven aufbläht. Es ist nach Küster zweckmäßig, noch an einer zweiten, mehr zentripetal gelegenen Stelle desselben Nerven die Einspritzung zu wiederholen. Der Vorschlag Rogers, möglichst viele Einspritzungen in einem Nervenstamme zu machen, ist unbedingt von der Hand zu weisen, da der Nerv auf diese Weise in unnötig großer Ausdehnung geschädigt wird (Küster), wodurch die supponierte Fortleitung des Antitoxins sehr beeinträchtigt oder gar unmöglich gemacht werden kann. Übrigens muß man auf den Eintritt schmerzhafter Neuritiden gefaßt sein. Die Methode ist recht umständlich, schmerzhaft, und gestattet leider nur wenig Antitoxin dem Körper beizubringen. Küster berichtet über sichere Erfolge (in zwei Fällen), andere sind sehr skeptisch (Kocher). Aus den erwähnten Gründen muß stets gleichzeitig die subkutane Injektion vorgenommen werden, wodurch die Beurteilung des Heilerfolges sehr erschwert wird.

4. Die intrazerebrale Injektion und intraspinale Injektion, beide als schwere Eingriffe wohl nur chirurgischen Anstalten vorbehalten. Kocher führte die intrazerebrale Injektion einigemale aus, indem er nach Anbohrung des Schädels intradural oder in die Seitenventrikel*) Antitoxin injizierte. Hopkins berichtet über gute Resultate.

5. Die subdurale (subarachnoideale) Lumbalinjektion wird in gleicher Weise ausgeführt wie die Biersche Anästhesie. Da der Liquor cerebrospinalis nach Stintzing, Küster, beim Menschen meist sehr toxinhaltig ist, wird empfohlen, möglichst viel davon bei der Lumbalpunktion abfließen zu lassen (natürlich unter steter Kontrolle des Druckes!) Nach der Injektion wendet man Beckenhochlagerung an, um auch höher gelegene Abschnitte des Rückenmarkes mit dem Antitoxin in möglichst innige Berührung zu bringen. (Küster.) Die Einfachheit des Eingriffes gestattet, ihn öfter zu wiederholen. Luckett empfiehlt, auf diese Weise täglich ein- oder auch mehrmals 10—20 g Antitoxin einzuspritzen. Die

*) Letztere Applikationsmethode ist aus später zu erörternden Gründen nicht zu empfehlen (vgl. unter subdurale Injektion).

subdurale Injektion ist ebenso wie die Injektion in die Seitenventrikel (s. o.) gleichbedeutend mit einer Injektion in den Subarachnoidealraum (bewiesen durch Injektion einer Farblösung, Roux und Borrel, Ransom). Meyer und Ransom lehnen diese Applikationsmethode ab, da sie auf Grund ihrer Untersuchungen das Antitoxin in die Nervensubstanz bringen wollen, wohin es nur nach Verletzung derselben gelangt. Da Stintzing, wie bereits erwähnt, beim Menschen reichlich Toxin in der Zerebrospinalflüssigkeit vorfand, während Ransom es nach intravenöser Injektion im Tierexperimente daselbst nicht wiederfinden konnte, ist es noch fraglich, ob nicht der verschiedenartige Infektionsmodus diese Differenz erklärt. Sollte sich der Befund Stintzings regelmäßig wiederfinden, so wäre die sogenannte subdurale Injektion nach Lumbalpunktion immerhin gerechtfertigt.

Als Material zur Antitoxinbehandlung des Wundstarrkrampfes werden flüssige und trockene Präparate verwendet. Das in Deutschland am meisten verwendete ist v. Behrings Tetanusheilserum, hergestellt von der Marburger Firma Dr. Siebert und Dr. Ziegenbein, wo sowohl ein flüssiges (à 100 A.-E.) als auch ein festes Präparat (à 20 A.-E.) vorrätig gehalten wird. Beiliegende Gebrauchsanweisung wird den Präparaten beigegeben, und gibt über die Anwendungsweise ausführlichen Aufschluß:

Behrings Tetanusheilserum.

Gebrauchsanweisung für Marburger Tetanusheilserum. 15. VIII. 1903. (Dargestellt von Prof. v. Behring, staatl. geprüft von Prof. Ehrlich im Frankfurter Institut für experimentelle Therapie.)

Das Marburger Tetanusheilserum, dessen alleiniger geschäftlicher Vertrieb uns von Prof. v. Behring übergeben ist, wird von uns in den Handel erst dann gebracht, nachdem seine Wirksamkeit und Unschädlichkeit im Auftrage des preußischen Kultusministeriums von Prof. Ehrlich kontrolliert worden ist.

Wir geben das Heilserum in zwei Abfüllungen ab, nämlich zu je 100 Antitoxineinheiten = A.-E. à 15 Mk. und zu 20 A.-E. à 3 Mk.

100 A.-E. repräsentieren bei subkutaner Einspritzung die einfache Heildosis für Menschen und Pferde, wenn die Einspritzung alsbald nach der festgestellten Tetanusdiagnose vorgenommen wird.

20 A.-E. sind subkutan einzuspritzen, wenn eine Verletzung stattgefunden hat, von welcher man vermutet, daß dabei eine Infektion mit Tetanusvirus erfolgt ist, z. B. Verletzungen durch Holzsplitter, rostige Nägel, Glasscherben usw., Quetschwunden, Hautverletzungen, bei welchen Erdpartikel oder Kleiderfetzen in die Gewebe gelangt sind; Operationswunden, erzeugt durch unreine Instrumente — Nabelschnurdurchschneidungen, Kastrationen, Operationen auf Schlachtfeldern, Plazentaentfernungen — überhaupt solche Läsionen, welche erfahrungsgemäß besonders häufig zur Entstehung des Tetanus Veranlassung geben.

Die subkutane Einspritzung ist in allen Fällen, in welchen man die Infektionsstelle kennt, so auszuführen, daß das Heilserum möglichst innig in Kontakt kommt mit den infizierten Geweben. Andernfalls spritze man es in die Subklavikulargegend ein, von wo es sehr schnell in die Blutbahn aufgenommen wird. Wo in der infizierten Wunde Fremdkörper vorhanden sind, ist, nach deren Entfernung, das infizierte Gewebe mit parenchymatösen Heilseruminjektionen zu behandeln.

Durch die neueren Untersuchungen im Marburger Pharm. Institut ist mit absoluter Sicherheit festgestellt, einerseits, daß der Tetanusinfek-

tionsstoff von der Achsenzylindersubstanz der peripherischen Nerven aufgenommen und zum zentralen Nervensystem fortgeführt wird, andererseits, daß das Tetanusantitoxin nicht imstande ist, auf dem Nervenwege den Infektionsstoff zu erreichen. Weiterhin ist durch ad hoc angestellte Experimente bewiesen worden, daß man durch Antitoxininjektion in das giftresorbierende Nervenparenchym den sehr langsam erfolgenden Gifttransport zum Rückenmark künstlich unterbrechen und dadurch die deletäre Wirkung der tetanischen Infektion verhüten bzw. nach schon eingetretenem Tetanus vermindern kann.

Beim Menschen ist eine derartige Nerveninjektion in der Marburger Chirurgischen Klinik tatsächlich in einem sehr akut verlaufenden Tetanusfall*) mit Erfolg ausgeführt worden. Wo Tetanusfälle schon in chirurgischer Behandlung sich befinden, ist neben der subkutanen Heilserumbehandlung der Versuch, den schon von dem Nervensystem aufgenommenen Giftanteil durch neutrale Injektionen unschädlich zu machen, dringend anzuraten. Die experimentelle Begründung dieser Indikation ist ausführlich dargelegt in der Arbeit von Hans Meyer und Fred Ransom: „Untersuchungen über den Tetanus" (Archiv für experim. Pathol. und Pharmakol., Bd. XLIX). Im übrigen verweisen wir auf Behrings Publikation: „Experimentelle und statistische Beweismittel für therapeutische Leistungen" im Märzheft der Ther. der Gegenw. 1900 (G. Klemperer).

Von besonderer Wichtigkeit ist noch zu wissen, daß das Tetanusantitoxin aus dem Blute des Menschen ziemlich schnell wieder verschwindet und daß man deswegen die Heilserumeinspritzung wiederholen muß, falls am Infektionsherd sich noch Tetanusvirus befindet, welches immer neues Gift abscheiden kann.

Aus dem Pasteur-Institut in Paris ist der Vorschlag gemacht worden, pulverisiertes Trockenantitoxin in tetanusinfizierte Wunden zu streuen. Dieser Vorschlag ist experimentell gut begründet und wir geben deswegen auch kleine Fläschchen zum Preise von 3 Mk. mit 20 A.-E. Trocken-Antitoxin ab, welches zum Einstreuen in infizierte Wunden besonders geeignet ist.

Dieses Trockenpräparat kann aber auch in 10 ccm sterilisierten 1 %-igem Kochsalzwasser gelöst, zur parenchymatösen Injektion in infizierte Gewebe mit Vorteil verwendet werden. Wegen seiner großen Haltbarkeit und seines mäßigen Preises ist dieses Trockenpräparat sehr geeignet, um nicht bloß in Apotheken und Krankenhäusern, sondern auch von jedem praktischen Arzte vorrätig gehalten zu werden, so daß im Notfall immer sofort eine Heilserumbehandlung eingeleitet werden kann.

Zur Neutralisierung des im Blute bei Beginn des Tetanus zirkulierenden Tetanusgiftes reicht in der Regel auch schon die kleine Serumquantität mit 20 A.-E. aus und wenn dann hinterher der Kranke zur energischen Heilserumbehandlung in eine chirurgische Krankenhausabteilung gebracht wird, so sind die Aussichten für ein glückliches Überstehen der tetanischen Erkrankung günstiger, als wenn selbst ein Multiplum von 100 A.-E. erst dann eingespritzt wird, wenn die Erkrankung schon weiter vorgeschritten ist und tagelang gedauert hat.

*) Inzwischen noch ein zweiter, ebenfalls in der Marburger Chirurg. Klinik (Küster), ferner ein Fall von Kocher und einer von Roger (letzterer gleichzeitig mit subduraler Einspritzung behandelt), dagegen ein letaler Verlauf (Hertle). (Anm. des Ref.)

Prof. v. Behring hat in seinen Publikationen wiederholt die große Wichtigkeit der sofortigen Heilserumbehandlung nach festgestellter Tetanusdiagnose betont und darauf aufmerksam gemacht, daß ein Zeitverlust in der Heilserumbehandlung von 24 bis 36 Stunden schon über Leben und Tod tetanuskranker Individuen entscheiden kann.

Im Auftrage des Herrn Geheimrat v. Behring fügen wir dieser Gebrauchsanweisung noch die Bitte hinzu, nach dem Ablauf der ärztlichen Beobachtung des behandelten Falles das anliegende statistische Schema unter der Adresse:

An die experimentelle Abteilung des hygienischen Instituts
Marburg a. d. Lahn.

mit den entsprechenden Daten ausgefüllt einsenden zu wollen.

Marburg a. d. Lahn, den 15. August 1903.

Dr. Siebert und Dr. Ziegenbein.

v. Behrings statistisches Schema für die mit Marburger Tetanusheilserum behandelten Tetanusfälle.

I. Behandelnder Arzt ....

II. Behandlung im Privathaus ....

III. Behandlung im Krankenhaus:

a) Innere Abteilung ....

b) Chirurgische Abteilung ....

IV. Nationale des Patienten:

a) Name, Geschlecht und Wohnort ....

b) Alter ....

V. Infektionsmodus:

a) Tag und Art der Verletzung ....

b) Infektionsstelle ....

c) Träger des Infektionsstoffes (Fremdkörper) ....

VI. Prognose nach dem Urteil des behandelten Arztes und Begründung der Prognose ....

VII. Ausbruch der ersten Tetanussymptome, wann und an welchem Körperteil?

....

VIII. Heilserumbehandlung:

a) Beginn der Behandlung ....

1. an welchem Tage? ....

2. welche Applikationsart? (Injektionsmethode, Körpergegend) ....

3. mit wieviel A.E. und von welcher Kontrollnummer der Fläschchen?

....

b) Weitere Serumbehandlung ....

IX. Anderweitige Behandlung:

a) Vor der Heilserumbehandlung: ....

b) Nach der Heilserumbehandlung ....

X. Ausgang:

a) Heilung am ? Tage nach Ausbruch des Tetanus ....

b) Tod am ? Tage nach Ausbruch des Tetanus ....

XI. Besondere Bemerkungen ....

Ein zweites Präparat ist das TIZZONI-CATTANIsche Antitoxin, von Merk in Darmstadt aus Hunde- und Pferdeserum gewonnen. Es bildet ein gelbliches Pulver, das in Fläschchen à $4^1/_2$ g abgegeben wird (ca. 5000000 A.-E.) Davon soll bei Erwachsenen in nicht zu schweren Fällen als Anfangsdosis die Hälfte des Inhaltes einer Flasche (= 2.25 g) in sterilisiertem Wasser gelöst, und zwar 1 g in 10 Tl. Aq., subkutan injiziert werden, die übrigen 2.25 g in weiteren Dosen an den folgenden Tagen. In sehr schweren Fällen darf auch der ganze Inhalt der Flasche auf einmal gegeben werden.

Das Pasteur-Institut in Paris liefert ein dem v. BEHRINGschen ähnliches (flüssiges) Heilserum in Flaschen von 10—20 ccm Inhalt, von welchem 50—100 ccm in ein oder zwei Dosen injiziert werden. —

Literatur.

BABES, Bulletin de l'acad. med. 1895.

BEHRING, Zeitschr. für Hygiene 1892, Bd. XII, pag. 45. — Deutsche mediz. Wochenschrift 1903, Nr. 35, pag. 617. — Deutsche mediz. Wochenschr. 1900, Nr. 2, pag. 29. — Deutsche Klinik v. LEYDEN u. KLEMPERER 1901, Bd. I. — Beiträge zur exper. Therapie, Bd. I, III, VII. — Fortschritte der Medizin 1899, Nr. 21.

BEHRING u. KITASHIMA, Berliner klin. Wochenschr. 1901, Nr. 6, pag. 157.

BEHRING u. KNORR, Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIII.

BEHRING u. RANSOM, Deutsche mediz. Wochenschr. 1898, Nr. 12.

BRIEGER, Zeitschr. für Hygiene 1895, Bd. XIX, pag. 101.

BRIEGER u. BOER, Zeitschr. für Hygiene 1896, Bd. XXI, pag. 259.

BRIEGER u. COHN, Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XV, pag. 439.

BRIEGER u. EHRLICH, Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIII, pag. 336.

BRIEGER, KITASATO u. WASSERMANN, Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XII.

BUCHNER, Münchner mediz. Wochenschr. 1893, Nr. 24/25.

DÖNITZ, Deutsche mediz. Wochenschr. 1897, pag. 428. — Deutsche Klinik v. LEYDEN und KLEMPERER 1903, Bd. I. — Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von KOLLE u. WASSERMANN 1904.

EHRLICH, s. BRIEGER.

ENGELMANN, Münchner mediz. Wochenschr. 1897, Nr. 32—34.

KITASATO, Zeitschr. für Hygiene 1892, Bd. XII, pag. 256.

KITASHIMA, Berliner klin. Wochenschr. 1901.

KNORR, Habilitationsschr. Marburg 1895. — Fortschr. der Medizin 1897, Nr. 17. — Münchner mediz. Wochenschr. 1898, Nr. 11, pag. 321 und Nr. 12, pag. 362.

KÖHLER, Münchner mediz. Wochenschr. 1898, Nr. 45.

MARIE u. MORAX, Annales Pasteur 1902, pag. 819; 1903, pag. 335.

MARX, Festschr. für R. KOCH 1903. — Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVIII (Schutz- und Heilwert des Diphtherieantitoxins).

H. MEYER, zitiert bei BEHRING, Beiträge zur exper. Therapie (l. c.).

MEYER u. RANSOM, Archiv für exper. Pathol. und Pharmakol., Bd. XLIX.

PAWLOWSKY u. MAKSOUTOW, Zeitschr. für Hygiene 1896.

E. PICK, HOFMEISTERs Beiträge 1902.

RANSOM, Deutsche mediz. Wochenschr. 1898. — Berliner klin. Wochenschr. 1901, Nr. 13, pag. 337 und Nr. 14, pag. 373. — Zeitschr. für physiol. Chemie 1900, Bd. XXXIX.

ROUX et MARTIN, Annales Pasteur 1894.

ROUX et VAILLARD, Annales Pasteur 1893, Nr. 7.

SCHUCKMANN, Deutsche mediz. Wochenschr. 1903, Nr. 10, pag. 173.

TIZZONI u. CATTANI, Archiv für exper. Pathol. und Pharmakol. 1890, pag. 432. — Riform. med. 1899, Nr. 241—246.

VAILLARD, Annales Pasteur 1892, pag. 676.

WASSERMANN, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von KOLLE und WASSERMANN, Bd. IV, Heft 1.

VIII.

Das Dysenterieantitoxin.

Von

Dr. R. Doerr

in Wien.

Bevor noch die ätiologische Bedeutung der Befunde Shigas und Kruses allgemein anerkannt und die biologischen Charaktere des neuen Bazillus genauer studiert waren, gingen die beiden Entdecker auch schon daran, Heilsera durch Immunisierung von Pferden zu gewinnen.

Shiga[29]) berichtet in seiner ersten Publikation (1898), daß er die Arbeiten in dieser Richtung bereits begonnen und ist auch schon 1901[27]) in der Lage, bedeutende Erfolge zu registrieren (s. w. u.)

Auch Kruse[19]) zögerte nicht. seine durch Immunisierung von Equiden (Pferden und Eseln) gewonnenen Sera bei der menschlichen Dysenterie kurativ zu verwerten. Er teilte seine Wahrnehmungen i. J. 1903 mit, deren Hauptergebnis darin bestand, daß durch sein Serum „die Schwere der Erkrankung gemildert, die Dauer der Erkrankung und der Rekonvaleszenz abgekürzt, die Zahl der Todesfälle vermindert wird."

An der Richtigkeit der Shiga-Kruseschen Beobachtungen kann, soweit sie den therapeutischen Effekt ihrer Heilsera betreffen, nicht gezweifelt werden. Dagegen müssen wir heute, wie Kraus und Doerr[18]) einwandsfrei dargetan, die Vorstellungen Shigas und Kruses über die Natur der wirksamen Stoffe und die experimentelle Begründung derselben für durchaus unrichtig erklären.

Man wußte eben damals noch nichts von Toxizität der Ruhrbazillen. Die Wahl eines ungeeigneten, gegen das Dysenteriegift refraktären Versuchstieres, des Meerschweinchens, trug das ihrige dazu bei, diese Unkenntnis zu erhalten und die ganze Immunitätsforschung bei der bazillären Ruhr in falsche Bahnen zu leiten.

So kam es, daß Shiga und Kruse ihre Immunsera für rein bakterizid hielten und ihre Wirksamkeit bei Dysenteriekranken mit der Aktion bakteriolytischer Körper begründeten. Bei Shiga finden wir diesen Gedanken allerdings nicht klar ausgesprochen; doch lassen seine Versuche gar keinen Zweifel darüber aufkommen, daß er sich von dieser Idee leiten ließ. Er injizierte Mäusen und Meerschweinchen präventiv Serum (0,002—0,004) und nach 24 Stunden die fünffache Dosis letalis

minima lebender Kultur intraperitoneal. Die Tiere blieben am Leben, während Normalserum (0,005) auch gegen die einfach letale Menge nicht zu schützen vermochte; die Tiere verendeten nach 20 Stunden. Die kurativen Experimente wurden bloß an Meerschweinchen durchgeführt, denen lebende Kultur (2 Ösen) subkutan unter die Bauchhaut eingespritzt wurde, sodann nach verschiedenen Intervallen ein ganzer Kubikzentimeter Immunserum. Die Tiere erkrankten, genasen aber, wenn zwischen Infektion und Einverleibung des Serums nicht mehr als 15 Stunden lagen; die Kontrollen starben marantisch nach sieben Tagen.

Die Versuche Kruses gleichen denen Shigas bis in alle Einzelheiten, wie subkutane Injektion der Kulturen bei Ermittelung der kurativen Wirkung, Dosierung des Immunserums (1,0 ccm) etc. Nur injizierte er behufs Feststellung des prophylaktischen Wertes ein Gemisch der Bazillen mit kleinen Mengen (bis $^1/_{80}$ mg) Immunserums.

Weiter stellte er fest, daß sein Immunserum die Ruhrbazillen auch in vitro aufzulösen vermochte und während er Bedenken trägt, aus dem Erfolge des Tierversuchs auf die Wirkung am ruhrkranken Menschen zu schließen, findet er im Reagensglasversuch eine ausreichende Motivierung für die therapeutische Anwendung seines Serums und eine befriedigende Erklärung der tatsächlichen günstigen Erfolge.

In streng logischer Konsequenz zieht er aus seinen, auf falschen Prämissen aufgebauten Experimenten den Schluß, daß „das Blutserum des normalen Menschen erst durch Zuführung von Ruhrserum in den Stand gesetzt wird, der Ruhrbazillen Herr zu werden“ und nennt die wirksamen Substanzen „im Gegensatz zu den Antitoxinen“ Antilysine, identisch mit den Bakteriolysinen der anderen Autoren. Ja es war ihm „von vornherein klar, daß hier nicht ein giftzerstörendes Serum wie bei der Diphtherie angebracht sei, denn weder bilden die Ruhrbazillen besonders kräftige Toxine, noch entspricht der klinische Verlauf der Ruhr, seltene Fälle ausgenommen, dem Bilde einer Vergiftung. Das Ziel mußte vielmehr sein, die Wucherung der Bazillen aufzuheben, das Weiterschreiten der Infektion zu hindern. Wenn es gelang, ein „bakterizides“ Serum herzustellen, waren die Aussichten bei der Ruhr besser, als bei den meisten anderen Infektionskrankheiten“.

Allerdings war es Shiga[28]), wie er in dem Prioritätsstreit gegen Kruse hervorhebt, aufgefallen, daß man mit rein bakteriziden Seris bisher nichts ausgerichtet hatte, weder beim Typhus noch bei der Cholera, und daß das Ruhrserum somit das einzige Heilserum ist, welches, subkutan angewendet, einen bakteriellen Prozeß günstig beeinflußt, der sich ausschließlich im Darme abspielt. Er begnügt sich aber damit, diesen Widerspruch zu konstatieren, ohne nach einer Erklärung zu suchen. Die wahre Ursache der therapeutischen Erfolge von Shiga und Kruse haben erst Kraus und Doerr[15–18]) ermittelt, indem sie nachwiesen, daß die Ruhrbazillen leicht auslaugbare Toxine enthalten (s. Dysenterietoxin) und daß man infolgedessen bei der Immunisierung mit Kulturen nicht rein bakterizide, sondern auch antitoxische Sera erhält. Diese antitoxische Komponente, deren Existenz natürlich durch Meerschweinchenversuche nicht eruiert werden konnte, ist es aber, welche allein auf den Verlauf der Dysenterie günstig einzuwirken vermag.

Bevor nämlich noch Kruse seine Ansichten in den zitierten Sätzen formuliert hatte, war bereits eine Wandlung in der Auffassung des dysenterischen Krankheitsprozesses eingetreten. War man auch noch weit von der Darstellung echter, löslicher Toxine entfernt, so hatte man doch

schon Kenntnis von der enormen Giftigkeit der Ruhrbazillen selbst und der aus ihnen hergestellten Extrakte, wie sie am Kaninchen deutlich zutage tritt. Da ferner Conradi[4]) im Jahre 1902 beobachten konnte, daß man mit abgetöteten Kulturen oder Autolysaten bei Kaninchen Durchfälle sowie Darmläsionen hervorzurufen vermag, welche mit dem Bild der Dysenterie beim Menschen eine weitgehende Ähnlichkeit aufweisen, so drängte sich schon v. Drigalski[8]) die Überzeugung auf, daß wir die Ruhr als eine „mit mehr oder weniger schweren Vergiftungserscheinungen einhergehende Darminfektion" bezeichnen müssen. Die Untersuchungen von Neisser-Shiga[21]) und namentlich von Vaillard und Dopter[32]) waren ganz darnach angetan, um diese Behauptung zu stützen.

Doch hielt man, wie im Kapitel „Dysenterietoxin" des breiteren erläutert wird, das spezifische Ruhrgift vorzüglich wegen der Unmöglichkeit, dasselbe in keimfreien Bouillonkulturfiltraten nachzuweisen, für ein Endotoxin im Sinne Pfeiffers und solange diese Lehre Gültigkeit besaß, war natürlich auch an ein echtes Antitoxin nicht zu denken.

Wir können daher mit Recht behaupten, daß die systematische Darstellung antitoxischer Sera und ihr Studium erst mit der Entdeckung des Dysenterietoxins durch Rosenthal[24]), Todd[30, 31]) und Kraus und Doerr[15–18]) im Jahre 1904 ihren Anfang nahm. Wie bekannt, gelang es den genannten Autoren gleichzeitig und unabhängig voneinander, aus Bouillonkulturen durch einfache Filtration lösliche, für Kaninchen hochwirksame Gifte zu isolieren und es war eine natürliche Konsequenz, daß auch von allen drei Seiten sofort begonnen wurde, die neuen Toxine zur immunisatorischen Gewinnung von Antitoxin heranzuziehen.

Als erster veröffentlichte L. Rosenthal[24]) in Moskau seine Untersuchungen, die hier nur soweit wiedergegeben werden sollen, als sie die experimentelle Seite der Frage berühren; die therapeutische Wirksamkeit der verschiedenen antidysenterischen Sera sei einer besonderen Besprechung vorbehalten.

Rosenthal stand noch im Banne der Anschauungen Kruses. Er schreibt seinem Serum „stark schützende und heilende Eigenschaften" zu, weil $^1/_{50}$—$^1/_{80}$ mg genügte, um Dysenteriebazillen im Meerschweinchenperitoneum zur Auflösung zu bringen, legt also offenbar auf die bakteriolytische Kraft noch ein bedeutendes Gewicht. Doch hat er den antitoxischen Wert seines Serums jedenfalls klar erkannt und im Kaninchenversuch ausgemittelt. Er fand, daß die zehnfach tötliche Minimaldosis des Toxins in vitro durch 0,005 Serum bei einstündigem Stehen neutralisiert wird; daß aber bei gleichzeitiger, getrennter Applikation von Toxin und Serum viel erheblichere Mengen des letzteren erforderlich sind (0,75 ccm), um die Tiere am Leben zu erhalten. Er versuchte sogar eine allerdings etwas willkürliche Wertbestimmung des Antitoxins, indem er als Antitoxineinheit einen Kubikzentimeter eines Serums bezeichnet, von dem 0,1 die 10fache Dos. let. min. für 300 gr (?) Kaninchen neutralisiert. Da sein Serum fünfmal so schwere Tiere (1500 gr) schon in zwanzigfach geringerer Menge schützte, so bezeichnet er es als hundertfach.

Über den Mechanismus der Serumwirkung bei der menschlichen Dysenterie spricht sich Rosenthal überhaupt nicht aus. Man geht aber kaum fehl, wenn man annimmt, daß er auch hier eine Mittelstellung einnahm, und die bakterizide Komponente in gleicher Weise für den Heileffekt nötig hielt wie die antitoxische. Das ergibt sich überdies aus

dem bei den Serumpferden angewendeten Immunisierungsverfahren, die im GABRITSCHEWSKYschen Institut mit Kulturen und Toxin kombiniert behandelt wurden.

TODD[31]) faßt die Idee des antitoxischen Dysenterieserums ganz rein auf und begründet sie experimentell in völlig klarer Weise. Er immunisierte Pferde lediglich mit steigenden Toxindosen und prüft die erhaltenen Sera zunächst auf ihre neutralisierende Kraft in vitro, wobei er die Toxin-Antitoxingemenge eine halbe Stunde bei 37° C stehen ließ. Bei dieser Versuchsanordnung waren 0,002 ccm Serum ausreichend, um Kaninchen gegen die intravenöse Injektion der 20fachen Dos. let. min. zu schützen. Auch prophylaktisch wirkte das Serum, da große Dosen, (4 ccm) in die rechte Ohrvene gebracht, die Kaninchen gegen eine 24 Stunden später und links injizierte 20fach tödliche Toxinmenge resistent machten.

TODD fand ferner, daß die Verbindung zwischen Toxin und Antitoxin bei 37° C schon in weniger als fünf Minuten in vitro zustande kommt, bei 0° C dagegen erst in ein bis zwei Stunden. Er wies auch nach, daß man durch Immunisierung von Pferden mit Agarkulturen gleichfalls antitoxische Sera erhält, eine für die Beurteilung der SHIGA-KRUSEschen Heilerfolge höchst bedeutungsvolle Tatsache.

Schließlich entging es ihm nicht, daß alle Bazillen vom Typus SHIGA-KRUSE Toxine produzieren, die durch dasselbe Antitoxin neutralisierbar sind, womit ein weiterer wichtiger Beweis für ihre Idendität erbracht war, daß hingegen FLEXNERstämme in Bouillonkulturen niemals lösliche Gifte bilden.

Über die kurative Wirkung seines Antitoxins hat TODD nicht gearbeitet; auch hat er nicht versucht, die Erfolge im Tierexperiment bei dysenteriekranken Menschen serotherapeutisch zu verwerten.

KRAUS und DOERR begannen ihre auf breiter Basis angelegten Untersuchungen im Herbste 1903, völlig unabhängig von ROSENTHAL und TODD, wie schon aus der Tatsache erhellt, daß sie ihre Sera, nachdem die experimentellen Vorarbeiten zu einem gewissen Abschlusse gediehen waren, bereits im Sommer 1904 bei der Krakauer Dysenterieepidemie mit Erfolg in Anwendung brachten. Sie haben in einer größeren Zahl von Publikationen die Ergebnisse ihrer Arbeit wiederholt referiert und schließlich 1906 „Die experimentelle Grundlage einer antitoxischen Therapie der bazillären Dysenterie“[18]) ausführlich begründet.

Insbesondere sind es KRAUS und DOERR, welchen wir die ersten genaueren Aufschlüsse über die auch praktisch bedeutsamen Beziehungen des Antitoxins zum Toxin verdanken, so daß sich die betreffenden Ausführungen so gut wie ausschließlich auf ihre Untersuchungen beziehen.

Technik der Immunisierung.

Bei SHIGA und KRUSE finden sich überhaupt keine Angaben über die Herstellungsart ihrer Sera, nur steht fest, daß beide Kulturen zur Immunisierung verwendeten, da sie ja hauptsächlich auf eine möglichst hohe Bakterizidie hinarbeiteten. Die Sera SHIGAs stammten von Pferden, die KRUSES von Pferden und Eseln.

Dagegen gibt GABRITSCHEWSKY[10]) am 1. November 1903 in der Kaiserlichen Gesellschaft für Naturkunde in Moskau ziemlich detaillierte Aufschlüsse über die Beobachtungen, die er gelegentlich der Bereitung des ROSENTHALschen Serums machen konnte. Es wurde bereits auseinandergesetzt, daß ROSENTHAL der bakteriziden Komponente dysen-

terischer Heilsera noch eine hohe Bedeutung neben der antitoxischen einräumte, und dem Bestreben, ein beiden Anforderungen völlig entsprechendes Serum zu erhalten, entsprang, wie Gabritschewsky ausdrücklich betont, die etwas eigentümliche Art der Immunisierung.

Sie bestand in subkutanen Injektionen einerseits von Toxin, andererseits von lebender Bouillonkultur, in der Weise, daß zunächst mit einer Serie von Toxininjektionen begonnen wurde, der dann ein Turnus mit lebender Kultur folgte u. s. f. Die Intervalle zwischen den einzelnen Injektionen betrugen nur 3—6 Tage. Gabritschewsky gibt an, daß, wenigstens bei einem Pferde, die Kultur schlechter vertragen wurde, als das Toxin, indem die lokale und allgemeine Reaktion stärker ausgeprägt war, und das Tier an Körpergewicht abnahm. Bei einem anderen Pferde bildeten sich nach Injektionen der Kultur zweimal „Abszesse ohne anderweitige Infektion". Auch war es diesem Autor aufgefallen, daß große individuelle Verschiedenheiten in der Empfindlichkeit der Pferde gegen das Dysenterietoxin bestehen; so mußten bei einem Pferde die Injektionen unterlassen werden, da es mit hohen Temperaturen (39,7°) reagierte, nicht fressen wollte und in wenigen Tagen $4^1/_2$ Pud (etwa 2 Kilo) an Gewicht verlor. Im einzelnen gestaltete sich der Immunisierungsprozeß wie folgt:

16. Februar bis 27. März: 14 subkutane Injektionen von Toxin (von 0,5 steigend bis 5,0).
30. März bis 31. April: 5 subkutane Injektionen lebender Bouillonkultur (von 0,5 steigend bis 5,0).
26. April bis 22. Mai: 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 ccm Toxin, hierauf 5,5 und 10,0 ccm Bouillonkultur.
29. Mai: Venaesektion.
2. Juni: Venaesektion.
6. Juni: Venaesektion.
28. Juni bis 1. August: 5, 10, 15, 20, 30 ccm Toxin, hierauf 10, 15, 20, 30 ccm Bouillonkultur.
23. August: Aderlaß.
11. September bis 1. November: Dieselben Mengen wie in der Vorperiode.

Die Intervalle zwischen Venaesektion und letzter Injektion waren, wie man sieht, außerordentlich verschieden. Bei einem zweiten Pferde wurde z. B. mit der Behandlung am 18. Februar begonnen und am 23. April aufgehört (89,5 ccm Toxin und 84,5 ccm lebende Bouillonkultur); der Aderlaß fand aber erst am 17. Juli statt.

Später scheint Gabritschewsky das ganze Verfahren abgekürzt zu haben, da er mit seiner Immunisierungsmethode schon in 3—4 Monaten Ruhrsera von guter therapeutischer Wirkung erhält.

Todd[31]) hat Kaninchen, Ziegen und Pferde immunisiert und zwar ausschließlich mit Toxin.

Trotzdem es Todd gelang, Kaninchen gegen das Toxin zu immunisieren, so daß sie schließlich größere Quantitäten vertrugen, hatte das Serum derselben nur agglutinierende (1:100), aber nicht antitoxische Fähigkeiten. Todd sieht den Grund darin, daß er die Tiere in zu geringem Zeitintervall, von der letzten Injektion an gerechnet (am 9. Tag), entblutete. Wahrscheinlich sind aber kleinere Tiere überhaupt nicht imstande, erhebliche Antitoxinmengen zu bilden.

Einer Ziege, welche 0,1—200 ccm Toxin steigend erhalten hatte, wurde am 13. und 33. Tage nach der letzten Injektion ein Aderlaß gemacht. Beide Male war das Serum deutlich antitoxisch, beim zweiten Aderlaß jedoch in viel höherem Grade. Das brachte Todd eben auf die angeführte Erklärung der negativen Kaninchenexperimente.

Die Immunisierung der Pferde[2]) bestand in subkutanen Injektionen des Toxins.

Zunächst schlug TODD einen rascheren Weg ein; er begann mit 0,5 ccm und injizierte durch 6 Wochen jeden **3. Tag** bis zu 150 ccm Toxin. Dabei zeigten sich jedoch hohe Temperatursteigerungen (102° 2′ F = 38,9 C), es traten wiederholt schwere Diarrhoen, nach der letzten Dosis von 150 ccm interessanterweise eine komplette Lähmung der Hinterbeine auf und das Tier ging ein. Dabei war die Giftlösung nicht sehr stark (Dos. letal. für Kaninchen 1,0 ccm).

TODD begann daher bei einem zweiten Pferde mit 0,1 ccm derselben Giftlösung und verlängerte das Intervall zwischen den einzelnen Injektionen auf mindestens eine Woche. Die Resultate waren jetzt befriedigender; es konnten keine lokalen Schwellungen oder höhere Temperatursteigerungen beobachtet werden, trotzdem das Tier schließlich 400 ccm eines zehnfach stärkeren Toxins (Dos. let. für Kaninchen 0,1 ccm) erhielt.

Zum Vergleiche immunisierte endlich TODD ein drittes Pferd und zwar nur mit Agarkulturen, die zunächst durch $^1/_2$stündiges Erwärmen auf 70° C abgetötet wurden. Die Kulturen waren 20stündig, auf neutralem Schrägagar angelegt, wurden in physiologischer Na-Cl-Lösung emulgiert, abgetötet und subkutan injiziert. Mit $^1/_{10}$ Kultur wurde begonnen und allmählich bis auf 32 Kulturen gestiegen. Später erhielt dasselbe Tier lebende Agarkultur intravenös (bis 10 Kulturen). Abszesse traten nach den subkutanen Injektionen nie auf, jedoch lokale Schwellungen. Die Allgemeinreaktion war besonders nach intravenöser Applikation lebender Kultur intensiv, und nach der letzten Injektion war das Tier sehr schwach und hatte schwere Diarrhoen.

Die Venaesektion machte TODD auf Grund der Ziegenexperimente stets einen vollen Monat nach der letzten Injektion.

Die Sera von KRAUS und DOERR[18]) stammten teils von Ziegen, teils von Pferden.

Die Ziegen wurden noch mit lebender (Kruse II) Kultur subkutan behandelt und zwar entweder 24stündiger Agarkultur oder 8tägiger Bouillonkultur. Trotzdem die Tiere schließlich enorme Mengen vertrugen, waren die antitoxischen Werte nicht sehr bedeutend, wenigstens im Verhältnis zu den Pferden. Die einfach neutralisierende Dosis in vitro sank nicht unter 0,05 ccm, die bindende im Organismus bei getrennter, gleichzeitiger Injektion nicht unter 0,5 ccm.

Die Immunisierung der Pferde fand im Wiener staatlichen serotherapeutischen Institut (Vorstand: Prof. R. Paltauf) statt, und zwar erhielten die Pferde: „Elektra", „Jobst" und „Infant" 8tägige Bouillonkulturen, „Klipp" und „Komtesse" reines Toxin (Stamm Nepustil) subkutan. Die „Elektra" verendete nach mehrmonatlicher Behandlung (1904); die anderen Tiere stehen noch als Dysenteriepferde in Verwendung, doch werden bei „Jobst" und „Infant" seit Mitte 1906 Agarextrakte appliziert.

Die Intervalle zwischen den einzelnen Injektionen betragen regelmäßig 7 Tage; der Aderlaß findet durchschnittlich zwei Wochen nach der letzten Injektion statt, worauf nach 3—5 tägiger Pause die Immunisierung fortgesetzt wird.

In letzter Zeit wurde bei sämtlichen Pferden außer „Jobst" insofern ein geändertes Verfahren eingeschlagen, das sich auch sehr zur Erreichung der Grundimmunität empfiehlt, als am Tage vor der Toxineinspritzung 50,0—100,0 ccm antitoxischen Dysenterieserums sub-

kutan injiziert wurden. Man kann dann ruhig mit 5,0 ccm eines mäßig starken Toxins (Dos. let. f. Kan. 0,5 ccm) beginnen oder mit ebensolchen Mengen Bouillonkultur, ohne eine gefährliche Reaktion befürchten zu müssen. Im übrigen versteigen wir uns nie zu solchen Einzeldosen wie Todd, sondern bleiben, wenn eine gewisse Immunität erreicht ist, ähnlich wie Gabritschewsky bei mäßigen Mengen (30—80 ccm) stehen. Die erzielten Resultate sind mindestens so gut wie bei Todd, und unangenehme Ereignisse werden vermieden. Wir haben auch nie Paraplegien, schwere Diarrhoen u. dgl. beobachtet.

Die lokale Reaktion ist bei Anwendung von Kulturen stärker. Bisweilen (z. B. bei „Jobst") entstehen harte Infiltrate, die nach zirka einer Woche erweichen und bei operativer Eröffnung eine gelbe, wässerige, von kleinen nekrotischen Gewebsfetzen durchsetzte Flüssigkeit entleeren.

Die allgemeine Reaktion ist nach unseren Erfahrungen ziemlich unabhängig vom Immunisierungsmodus (Kultur oder Toxin), sondern wird lediglich bestimmt von der Individualität des Pferdes. Das dokumentiert sich besonders im Verhalten des Fiebers.

Die beiden Pferde „Klipp" und „Komtesse" z. B., welche zunächst mit denselben Mengen des gleichen Toxins unter präventiver Serumbehandlung injiziert wurden, reagierten insofern anders, als das Fieber bei „Komtesse" viel länger währte (ca. 3 Tage) als bei „Klipp", wo die erste und zweite Fiebersteigerung von einem ziemlich jähen Abfall gefolgt waren. Von der 5. Injektion an erhielt „Komtesse" stets nur 30 ccm, „Klipp" dagegen steigende Mengen (30, 40, 50, 60, 70, 80, 80,5 cm); nichtsdestoweniger traten gerade bei „Komtesse" die hohen Temperaturen (39,9, 39,8°) auf und stand der Gipfel selten unter 39,0°, während bei „Klipp" 39,0° nur ein einzigesmal unbeträchtlich überschritten wurde.

Ganz ähnlich verhielten sich zwei mit 8tägigen Bouillonkulturen behandelte Pferde „Jobst" und „Infant". „Jobst" hatte niedrigere Temperaturen als „Infant", der einmal auf 30 ccm Kultur mit 40,4° C reagierte, trotzdem er am Tag vor den Injektionen stets antitoxisches Serum bekam, während „Jobst" unter der vollen Wirkung des Giftes stand. Die Reaktionen, insbesondere die Temperatursteigerungen, bleiben auch nach langer Immunisierung nicht aus, selbst wenn man wieder zu relativ kleinen Quantitäten des Toxins oder der Kultur greift.

Auch Vaillard und Dopter[33]) haben Pferde gegen Dysenterie immunisiert, um therapeutische Sera zu erlangen und ihre Beobachtungen im Mai 1906 (Annal. de l'Inst. Pasteur) veröffentlicht. Sie verharren trotz der Arbeiten von Rosenthal und Todd noch immer auf dem Endotoxinstandpunkt und führen auch keine Scheidung zwischen toxischen Kruse- und atoxischen Flexner-Stämmen durch (Kraus und Doerr[17]).

Im übrigen decken sich ihre Schilderungen der großen Empfindlichkeit der Pferde gegen das Dysenteriegift mit denen der anderen Autoren. Ihre Angabe, daß ein starkes Tier nach 2 ccm Bouillonkultur (subkutan injiziert) in 4 Tagen verendete, beweist nur aufs Neue die Wichtigkeit der kombinierten Serumtoxinbehandlung des Wiener serotherapeutischen Instituts für die Erzielung der Grundimmunität.

Wir möchten dieser letzten Methode auch für den weiteren Verlauf der Immunisierung vor allen anderen den Vorzug geben, wenigstens aber für die Verwendung reinen Toxins plaidieren statt der Injektion von Agar- oder Bouillonkulturen oder der kombinierten Technik Gabritschewsky. Einerseits sind die lokalen Reaktionen geringer, anderer-

seits die mit solchen Seris erzielten Resultate (im Tierexperiment sowohl als auch am Menschen) völlig gleichwertig denen der anderen Autoren.

So liefert „Klipp“, das nur Toxin bekommen hat, gegenwärtig (Aderlaß vom 18. IX. 1906) ein Serum, von dem schon 0,05 ccm Kaninchen gegen die getrennte, gleichzeitige Injektion der sicher letalen Dosis schützt. Allerdings hängt auch hier, ähnlich wie beim Diphtherieheilserum, sehr viel von der Individualität des Tieres ab; die gleich behandelte „Komtesse“ zeigte immer (Aderlässe vom 23. VI. und 18. IX. 1906) niedrigere Werte, selbst beim Bindungsversuch in vitro.

Es ist übrigens sehr schwer, sich über die kurativen Wirkungen der verschiedenen (englischen, japanischen, französischen, russischen, amerikanischen, deutschen) Sera aus der vorhandenen Literatur zu orientieren. Zahlenmässige Aufschlüsse könnten natürlich nur nach einem einheitlichen Prüfungsmodus ausgeführte Tierexperimente geben. Das ist aber bisher nicht versucht worden. Shiga und Kruse prüften statt des Antitoxingehaltes die Bakterizidie, Todd den Bindungswert in vitro, der kein Urteil über die kurative Leistungsfähigkeit zuläßt; Vaillard und Dopter sprechen von einem kurativen Effekt bei Infektion der Kaninchen, und von antimikrobischer oder phagozytärer Kraft des Serums, haben aber doch inkonsequenterweise Heilversuche mit Rosenthalschem Toxin gemacht, wobei sie jedoch das Antitoxin subkutan verwendeten. Rosenthal sagt überhaupt nicht, wie er das Serum kurativ injizierte (ob intravenös oder subkutan).

Die von Kraus und Doerr ausgearbeitete Prüfungsmethode endlich hat sich noch nicht eingebürgert und steht nur im Wiener serotherapeutischen Institut in Benützung.

Über die Grundlage der Wertbestimmung des Dysenterieserums.

Kraus und Doerr verwendeten zunächst Ziegen, später nur mehr Pferde zur Gewinnnung antitoxischer Sera. Vor der Behandlung sowie in vierwöchentlichen Intervallen während der fortschreitenden Immunisierung wurden den Tieren Aderlässe gemacht und die erhaltenen Sera auf ihren Antitoxingehalt in dreifacher Beziehung geprüft. Es wurde festgestellt:

1. Das Neutralisationsvermögen in vitro (Mischungsversuch), wobei die Toxin-Antitoxingemenge etwa 15′ bei Zimmertemperatur miteinander in Kontakt blieben, bevor sie den Tieren injiziert wurden.

2. Die neutralisierende Fähigkeit im Organismus, indem das Toxin in die rechte, das Antitoxin in die linke Ohrvene gleichzeitig eingespritzt wurde und endlich

3. Der kurative Wert, d. h. die Applikation des Serums erfolgte in verschiedenen Zeitintervallen nach Einverleibung des Toxins.

Es ist wohl nicht nötig zu sagen, daß nur Kaninchen als Versuchstiere dienten; die Injektionen auch des Toxins wurden stets intravenös vorgenommen, da die Tiere bei dieser Methode gleichmäßig reagieren, und man von zufälligen Resorptionsverhältnissen unabhängig wird.

Es ergab sich dabei die höchst auffällige Tatsache, daß ein Serum beim Mischungsversuche in vitro einen sehr bedeutenden neutralisierenden Wert besitzen kann, ohne darum auch schon im Organismus zu wirken oder gar kurative Leistungen aufzuweisen.

Es möge hier eine dieser Versuchsreihen wiedergegeben werden, um diese Verhältnisse zu illustrieren: Das Serum einer Ziege, welches vor der Immunisierung selbst in Mengen von 0,5 ccm die einfach letale Dosis nicht zu neutralisieren vermochte, hatte nach weiteren 10 Tagen bereits einen gewissen Bindungswert in vitro:

0,1 Serum + 0,3 Toxin gemischt und intravenös injiziert Kan 35. Bleibt glatt.

Dagegen vermochte selbst die 10fach größere Menge Antitoxin in die andere Ohrvene, jedoch gleichzeitig mit dem Toxin injiziert, das Tier nicht mehr zu schützen.

0,5 Serum intravenös — getrennt, aber gleichzeitig intrav. 0,3 Toxin. Kan. 212. † am nächsten Tage früh.

1,0 Serum intravenös — getrennt, aber gleichzeitig intrav. 0,3 Toxin. Kan. 193. † am nächsten Morgen.

Nach weiteren drei Wochen besaß das Serum dieser Ziege noch denselben quantitativen Wert, d. h. es war noch immer 0,1 ccm erforderlich, um die einfach tödliche Giftmenge in vitro zu binden. Dagegen wirkte das Antitoxin auch bei getrennter, gleichzeitiger Giftinjektion, vermochte also das Toxin nicht nur in vitro, sondern auch im Organismus zu neutralisieren. Es hatte also bei gleichbleibendem Titre seine Reaktionsfähigkeit geändert, es war qualitativ ein anderes geworden:

0,1 Serum + 0,5 Toxin gem. und sofort intravenös. Kan. 194. Lebt.

0,05 Serum + Toxin gem. und sofort intravenös. Kan. 426. † nach 4 Tagen.

0,1 Serum intrav. — getrennt, aber gleichzeitig intrav. 0,5 Toxin. Kan. 194. Am 6. Tag Paralyse, am 7. tot.

0,5 Serum intrav. — getrennt, gleichzeitig intravenös 0,5 Toxin. Kan. 84. Überlebt.

1,0 Serum intrav. — getrennt, gleichzeitig intravenös 0,5 Toxin. Kan. 215. Überlebt.

Kontrolle: Kan. 206 0,5 Toxin intravenös. † am nächsten Morgen.

Bei diesen Versuchen wurde erst Serum, und darnach sofort Toxin injiziert; es verstrich aber doch immerhin eine gewisse Zeit, so daß man ein bis zwei Minuten früher das Serum einbrachte; kehrte man das Verhältnis um, und injizierte zuerst Toxin, so schützte 0,5 Serum nicht mehr, sondern erst 1,0 und fünf Minuten nach der Giftinjektion war auch 1,0 Serum nicht mehr imstande, das Tier zu retten. Einen kurativen Wert hatte also das Serum zu dieser Zeit noch nicht.

Ganz analog waren die Resultate bei der stufenweisen Prüfung eines anderen Ziegenserums, wo nach dem dritten Aderlaß 0,05 ccm beim Mischungsversuch, aber erst 0,5 bei getrennter Injektion zur Neutralisation ausreichten. 10 Minuten nach der Toxininjektion war erst 1,0 wirksam, 15 Minuten später aber nicht einmal 3,0. Es war also eine kurative Wirkung zu registrieren, die aber in keinem Verhältnisse stand zur präventiven, beziehungsweise zum absoluten Bindungswert des Antitoxins.

Es ergeben sich hieraus folgende Schlüsse:

1. Der absolute Bindungswert in vitro ist bei einem bestimmten Dysenterieantitoxin völlig unabhängig vom Neutralisationsvermögen im Organismus.

2. Diese beiden Werte steigen während des Immunisierungsprozesses unabhängig von einander, z. B. in der Weise, daß sich bei gleichbleibendem Bindungsvermögen die früher nicht vorhandene Fähigkeit entwickelt, im tierischen Körper frei zirkulierendes Toxin zu neutralisieren. Es ist klar, daß diese qualitative Änderung in nichts anderem bestehen kann,

als daß das Antitoxin unabhängig von seinen absoluten Mengenverhältnissen eine höhere Avidität zum Toxin erhält, die es in den Stand setzt, diese Verbindung rasch und lebhaft einzugehen oder, was dasselbe bedeutet, daß seine Reaktionsgeschwindigkeit eine Zunahme erfährt. Denn wir können uns die Erscheinung, daß ein in vitro schon in kleinsten Mengen wirksames Serum, im Organismus mit gleichzeitig einverleibtem Toxin überhaupt nicht reagiert, wohl nur so erklären, daß seine Avidität zum Gifte geringer ist als die der empfindlichen Gewebe; daß es sich daher mit dem Gifte viel zu langsam verbindet, um die gefährliche Verankerung desselben an die Körperzelle zu verhüten.

Nach Roux und Cruveilhier sollen die Diphtherieantitoxine sich ähnlich verhalten und soll auch hier der präventive vom kurativen Wert unabhängig sein. Nach Marx stehen aber Heilwirkung und immunisierender Wert beim Diphtherieserum in engstem Konnex. Doch haben Kraus und Schwoner (Ref. am XIV. intern. Hyg.-Kongreß und Centralblatt für Bakt. 1908) gezeigt, daß auch im Diphtherieserum die Menge des Antitoxins in keiner Beziehung zu seiner Avidität steht.

Beim Dysenterieserum ist dies sicher der Fall, und Kraus und Doerr haben daher von allem Anfang das Postulat aufgestellt, daß nur solche Dysenteriesera beim Menschen therapeutisch Anwendung finden sollen, welche vorher im Tierversuch kurativ ausgewertet sind, und daß das bloße Neutralisationsvermögen nicht die Basis der Wertbemessung bilden könne (wie z. B. Rosenthal vorschlägt). Als zu Heilzwecken geeignet, werden gegenwärtig im staatl. serotherap. Institut nur solche Sera bezeichnet, von welchen höchstens 0,1 ccm Kaninchen von 1000 g gegen die getrennte, gleichzeitige intravenöse Injektion der einfach letalen Dosis zu schützen vermag.

Diese zunächst nur aus dem Verhalten der Ziegensera abgeleiteten Gesetze über den Aufbau des Dysenterieantitoxins konnten Kraus und Doerr gelegentlich der Immunisierung von Pferden (Jobst, Infant, Klipp, Komtesse) immer wieder bestätigen, ja es waren die Gegensätze zwischen reinem Bindungsvermögen (bei Injektion des Gemisches) und der Reaktionsgeschwindigkeit (bei getrennter, gleichzeitiger Applikation) vielfach noch stärker ausgeprägt. Erst mit fortschreitender Immunisierung wuchs die Avidität des Immunkörpers, während seine absolute Menge oft beim ersten Aderlaß schon recht erheblich war. Der eigentliche kurative Wert stellte sich meist erst nach drei- bis viermonatlicher, unausgesetzter Behandlung der Pferde ein, erreichte aber dann zum Teil eine sehr beträchtliche Höhe.

Außerordentlich klar lagen diese Verhältnisse beim Pferde „Infant“, und erscheint daher ihre Anführung in extenso gerechtfertigt.

I. Vor der Immunisierung war das Serum unwirksam (Aderlaß vom 28. II.) auch wenn die Toxin-Serumgemische 1 Stunde bei 37° C gehalten wurden, um das Zustandekommen einer Bindung trotz geringer Reaktionsgeschwindigkeit zu ermöglichen:

Versuch vom 11. III.

0,5 Serum + 0,1 Toxin (1 Stunde bei 37° C) intrav. Kan. 54. 12. III. †.

II. Beim ersten Aderlaß (4. IV.) neutralisierte 0,001 g Serum in vitro die Dosis letalis (A.); im Organismus war es selbst in tausendfach größerer Menge unwirksam (B.), natürlich bestand auch kein kurativer Effekt (C.).

A. 2. IV. 0,5 Serum + 0,1 Toxin gemischt, sofort intrav. Kan. 370. Lebt.
2. IV. 0,1 „ + 0,1 „ „ „ „ Kan. 371. Lebt.
2. IV. 0,01 „ + 0,1 „ „ „ „ Kan. 375. Lebt.
6. IV. 0,005 „ + 0,1 „ „ „ „ Kan. 398. Lebt.
6. IV. 0,001 „ + 0,1 „ „ „ „ Kan. 395. Lebt.
B. 6. IV. 1,0 Serum, getrennt gleichzeitig intrav. 0,1 Toxin. Kan. 396. †, 9. VI.
6. IV. 0,5 „ „ „ „ 0,1 „ Kan. 401. † 9. VI.
C. 2. IV. 0,1 Toxin, nach 15 Min. 0,5 Serum. Kan. 380. 5. VI. Paralyse. †.
6. IV. 0,1 „ „ 30 „ 1,0 „ Kan. 389. 7. VI. Paralyse. †.
6. IV. 0,1 „ „ 30 „ 5,0 „ Kan. 393. 7. VI. †.

III. Beim zweiten Aderlaß (9. V.) schützte 0,5 Serum bei getrennter, gleichzeitiger Injektion nicht völlig, verzögerte aber den Eintritt des Todes. Ein kurativer Wert (C.) bestand noch immer nicht.

A. 10. VI. 0,001 Serum + 0,1 Toxin gemischt, sofort intrav. Kan. 150. Lebt.
10. VI. 0,0005 „ + 0,1 „ „ „ „ Kan. 380. Lebt.
B. 10. VI. 0,5 Serum, getrennt gleichzeitig intrav. 0,1 Toxin. Kan. 98. † 17. VI.
C. 10. VI. 0,1 Toxin, nach 15 Min. 1,0 Serum. Kan. 387. 12. VI. Paralyse. 13. VI. †.
10. VI. 0,1 „ „ 30 „ 1,0 „ Kan. 93. 12. VI. †.

IV. Beim dritten Aderlaß (13. VI.) war A. und C. unverändert, B. war gewachsen:

28. VI. 0,5 Serum, getrennt gleichzeitig intrav. 0,1 Toxin. Kan. 366. Lebt.
28. VI. 0,1 „ „ „ „ 0,1 „ Kan. 380. 29. VI. †.
(Mit demselben Resultat wiederholt.)

V. Beim vierten Aderlaß waren A. und B. im Vehältnis zu dem dritten Aderlaß gleich geblieben. Dagegen waren die kurativen Werte beträchlich erhöht:

C. 25. VII. 0,2 Toxin (andere Giftlösung!), nach 15 Minuten 0.5 Serum. Kan. 429. † 27. VII.
25. VII. 0,2 Toxin nach 15 Minuten 1,0 Serum. Kan. 427. † erst am 30. VII.

1,0 ergibt also eine bedeutende Verzögerung der Giftwirkung, da die Kontrolle innerhalb 24 Stunden eingeht. Höhere Dosen schützen die Tiere vollkommen:

2. VIII. 0,2 Toxin, nach 15 Minuten 2,0 Serum. Kan. 410. Lebt.

Selbst nach mehreren Stunden konnte jetzt noch das Toxin durch hohe Serumdosen neutralisiert werden:

2. VIII. 0,2 Toxin, nach 30 Minuten 5,0 Serum. Kan. 442. Lebt.
2. VIII. 0,2 „ „ 4 Stunden 5,0 „ Kan. 346. 4. VIII. Paralyse. †.

dagegen

2. VIII. 0,2 „ „ 6 „ 10,0 „ Kan. 441. Lebt.
3. VIII. 0,2 „ „ 16 „ 10,0 „ Kan. 357. Lebt.

Kontrolle geht in 48 Stunden mit Paralysen ein.

In der gleichen Weise wie der Aufbau scheint sich auch der Abbau der Antitoxine zu vollziehen, natürlich in umgekehrter Richtung, so daß also zunächst der Bindungswert erhalten bleibt, während die Avidität oder Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt.

Sehr bemerkenswert sind auch die Versuche von Kraus und Doerr, bereits vorhandene Krankheitssymptome durch Sera von hoher Avidität wieder rückgängig zu machen. Bestanden hochgradige Paralysen, so war dies allerdings nicht möglich, waren aber erst Schwächezustände, Paresen der Vorder- oder Hinterbeine vorhanden, so war die intravenöse Seruminjektion oft von überraschendem Erfolge. Die Paresen gingen in 24 Stunden zurück, die Kaninchen blieben am Leben. Subkutane Antitoxininjektionen waren ohne Erfolg, auch wenn hohe Dosen gleichzeitig mit dem Toxin injiziert wurden, offenbar, weil die Resorption des Immunkörpers von der Subkutis viel zu langsam erfolgt, um das intravenös eingebrachte und sicher schon in wenigen Stunden zu schweren Organ-

läsionen führende Gift aus seiner Verbindung mit dem empfindlichen Gewebe wieder frei zu machen und zu neutralisieren.

Ein solcher Heilversuch im engsten Sinne des Wortes möge hier Platz finden.

Kan. 426 erhält am 25. VIII. p. m. 0,1 Toxin intravenös;
am 27. VIII. Parese der Vorder- und Hinterbeine;
am 27. VIII. 10 ccm Serum „Infant" intravenös;
am 28. VIII. Geringe Parese der Vorderbeine. Das Tier, welches sich tags vorher bei seitlicher Lagerung nicht aufzurichten vermochte, kann sich heute sofort aufsetzen;
am 29. VIII. Keine Parese, läuft;
am 1. IX. Glatt, bleibt am Leben.

Die große Zahl dieser Experimente und die stets prompt verendenden Kontrolltiere lassen gar keinen Zweifel über die Deutung zu und es ist einleuchtend, daß Sera, welche derartige Wirkungen zu entfalten vermögen, sich von vorneherein zu therapeutischen Zwecken ganz besonders eignen müssen. Die Höhe der Serumdosen kann dabei nicht überraschen; hat doch Dönitz in seinen Untersuchungen über die Grenzen der Wirksamkeit des Diphtherie- und Tetanusserums nachgewiesen, daß die kurativ wirkenden Dosen auch bei diesen Antitoxinen rapide ansteigen, je längere Zeit zwischen Vergiftung und Einverleibung des Serums verstreicht.

Wie erwähnt, sind subkutane gleichzeitige oder kurative Seruminjektionen stets ohne Erfolg; wohl aber wirken sie prophylaktisch, selbst gegen intravenös injiziertes Toxin, wenn das Intervall nicht allzu kurz war.

Im Kapitel Dysenterietoxin (pag. 149) wurde eine zweite, von Kraus und Doerr angegebene Methode der Toxindarstellung durch einfaches einstündiges Auslaugen 24 stündiger Agarkulturen und nachfolgende Filtration beschrieben. Da diese Gifte bei intravenöser Injektion Kaninchen unter denselben Erscheinungen töten wie Bouillonkulturfiltrate und die gleichen anatomischen Veränderungen setzen (Doerr), so war ihre Identität von vornherein wahrscheinlich. Den exakten Beweis lieferte ihre Neutralisierbarkeit durch dieselben, mit Bouillontoxinen gewonnenen Sera.

Ebenso schützt das Antitoxin gegen die gleichzeitige subkutane Injektion lebender oder abgetöteter Kultur: Die Experimente von Kraus und Doerr verliefen nämlich wie folgt:

20. IX. 1 Öse Kruse II + 0,5 Serum „Electra" subkutan. Kan. 168. Lebt.
20. IX. 1 „ „ + 0,1 „ „ „ Kan. 169. Lebt.
20. IX. 1 „ „ + 0,05 „ „ „ Kan. 165. Lebt.
20. IX. 1 Öse Kruse II subkutan. 25. IX. Paralyse und Tod.

10. VII. 1 Öse (Kruse-Krakau abgetötet) subkutan + 1,0 „Elektra". Kan. 35. Lebt.
26. IX. 1 „ (Kruse II abgetötet) subkutan + 0,5 „Elektra". Kan. 166. Überlebt, geht am 12. X. marantisch ein.

26. IX. 1 Öse Kruse II abgetötet subkutan + 0,1 „Elektra". Kan. 163. 30. IX. Paralyse. Tod.

26. IX. 1 Öse Kruse II abgetötet (Kontrolle). Kan. 158. 28. IX. Paralyse und Tod.

Diese Versuche sind nicht ohne Bedeutung. Sie liefern einen weiteren Beweis für die Identität der in den Bakterien enthaltenen Toxine mit den gelösten der Bouillonkulturfiltrate und erschließen uns das Verständnis für die Experimente von Vaillard-Dopter [33]) und von Lüdke [20]), die ihre Bakterienextrakte gleichfalls durch Serum unschädlich machen konnten.

Für die ganze Frage des Dysenterietoxins und Antitoxins war es endlich noch von besonderer Wichtigkeit, zu zeigen, daß beide dem

Gesetze der Multipla

folgen, daß also die vervielfachte Dosis letalis minima durch entsprechend erhöhte Serummengen neutralisiert werden kann. Auch diesen Beweis haben Kraus und Doerr in jüngster Zeit*) erbracht:

Versuch vom 12. VII. 1906:

Kontrollen: 0,5 Toxin intravenös Kan. 486. 13. VII. Paralyse. †.
0,5 „ „ Kan. 139. 13. VII. Paralyse. 14. VII. †.

0,05 Serum „Infant“ + 0,5 Toxin, intravenös.	Kan. 498.	Überleben.
0,1 „ „ + 1,0 „ „	Kan. 493.	
0,5 „ „ + 3,0 „ „	Kan. 475.	
1,0 „ „ + 5,0 „ „	Kan. 31.	

Ebenso am 26. VII.:

0,01 Serum „Infant“ vom 23. VI. + 1,0 Toxin, intravenös.	Kan. 179.	Überleben.
0,05 „ „ „ + 5,0 „ „	Kan. 135.	
0,5 „ „ „ + 10,0 „ „	Kan. 160.	

In der ersten Versuchsreihe vom 12. VII. waren die Serumdosen zu hoch gegriffen, da genauere Bestimmungen ergaben, daß die einfache Dosis letalis schon durch 0,005 ccm des Infantserums gebunden wird; in der zweiten sind die Multipla genau korrespondierend, wenigstens bei den zwei ersten Tieren; das letzte Nr. 160 hatte eine relativ geringe Toxinmenge erhalten, da es nicht gut anging, 50,0 ccm Flüssigkeit intravenös einzuführen.

Es kann somit auch die 20fach tödliche Toxinmenge durch Antitoxin noch völlig paralysiert werden, und liegen die Verhältnisse hier ganz so wie bei der Diphtherie.

Würde es außer der Antitoxinproduktion noch eines Argumentes bedürfen, um die in neuerer Zeit von Lüdke[20]), Flexner und Sweet[9]), sowie von Vaillard und Dopter[33]) noch immer warm verteidigte Lehre von der endotoxischen Natur des Dysenteriegiftes zu stürzen, so wäre es diese Unterordnung desselben unter das Gesetz der Multipla.

Spezifität des Dysenterieantitoxins.

Mit einem (durch Immunisierung mit einem bestimmten Toxin gewonnenen) Serum lassen sich die Toxine aller durch Agglutination und Mannitprobe identifizierten Shiga-Krusestämme in gleicher Weise neutralisieren. (Todd, Kraus und Doerr). Dagegen gelingt es nicht, Mäuse oder Meerschweinchen gegen die intraperitoneale Infektion mit Flexnerbazillen zu schützen; es ist das ja a priori anzunehmen, da die Flexnerbazillen keine spezifischen Gifte produzieren, und das bloß antitoxische Serum den rein infektiösen Prozeß in der Bauchhöhle nach unseren theoretischen Vorstellungen selbst bei der teilweisen Gleichheit des Rezeptorenapparates der beiden Ruhrbazillentypen kaum zu beeinflussen vermag.

Kraus und Doerr fanden in alten Flexnerbouillonkulturen allerdings ganz inkonstante und im Gegensatze zum Krusetoxin äußerst labile giftige, filtrierbare Produkte, die Kaninchen in größeren Mengen bei intravenöser Injektion zu töten vermochten, ohne aber die so typischen, der menschlichen Dysenterie analogen Prozesse im Nervensystem und Intestinaltrakt auszulösen. Sie werden durch Dysenterieantitoxin nicht gebunden.

*) Noch nicht veröffentlichte Versuche

Ebensowenig sind FLEXNERsera (von Ziegen oder Pferden durch Behandlung mit Agar- oder Bouillonkulturen erhalten) imstande, mit dem KRUSEtoxin selbst in großen Mengen zu reagieren.

Abgesehen von den praktischen Konsequenzen, die sich aus dieser strengen Spezifität des Dysenterieantitoxins für seine Anwendung bei den beiden Formen der bazillären Ruhr ergeben und die später noch berücksichtigt werden sollen, erhellt aber auch aus den angeführten Tatsachen, wie unerläßlich die exakte Prüfung der Toxizität für die Kenntnis einer bestimmten Bakterienart sein kann. Nach den Agglutinations- und Präzipitationsversuchen von KRAUS und DOERR ist an einer teilweisen Identität des Rezeptorenapparates bei KRUSE- und FLEXNERbazillen gar nicht zu zweifeln und es ist sehr fraglich, ob bei Verwendung hochwertiger Pferde- statt Ziegensera die Artverschiedenheit der beiden Typen erkannt worden wäre. Das absolute Fehlen der so charakteristisch wirksamen Gifte der SHIGAstämme bei allen FLEXNERarten berechtigt uns dagegen, trotz aller morphologischen und biologischen Ähnlichkeiten, an der völligen Verschiedenheit zweier Bakterien festzuhalten, die klinisch wenigstens ähnliche Krankheitsbilder auszulösen vermögen.

Widerstandsfähigkeit des Antitoxins gegen chemisch-physikalische Agentien.*)

Das Dysenterieantitoxin ist im Vergleich zum Toxin ziemlich labil. Schon längere Aufbewahrung schädigt seine Wirksamkeit. So hatte das Serum des Pferdes „Infant" nach Jahresfrist sein Neutralisationsvermögen in vitro verloren. Im Jahre 1905 (Aderlaß vom 23. VIII.) war es bei getrennter, gleichzeitiger, intravenöser Injektion des Toxins noch in Mengen von 0,1 imstande, die Tiere zu retten. Am 10. VII. 1906 jedoch nicht mehr:

0,1 Serum „Infant" vom 23. VIII. 05 — getrennt gleichzeitig intrav. 0,5 Toxin (einfache Dosis letalis). 11. VII. Paralyse. 12. tot.

Dagegen war dieselbe Menge in vitro wirksam:

10. VII. 0,1 Serum „Infant" vom 23. VIII. 1906 + 0,5 Toxin, gem. und sofort intravenös. Überlebt.

Kontrollen: Kan. 179 am 10. VII. 0,5 Toxin intrav. † 11. VII. früh.
Kan. 41 „ 10. VII. 0,5 „ „ 11. VII. Paralysen. 12. VII. †.

Bei einem anderen Pferdeserum „Jobst" hatte der Abbau noch weitere Fortschritte gemacht, indem das Antitoxin seit Jahresfrist auch quantitativ eine Verminderung aufwies:

10. VII. 0,1 Serum „Jobst" 1905 + 0,5 Toxin gemischt, sofort intravenös. Kan. 495. 17. VII. †.

Daraus würde sich die Notwendigkeit ergeben, die Serumvorräte ähnlich wie bei der Diphtherie von Zeit zu Zeit auszuwechseln, wenn Dysenteriefälle das ganze Jahr hindurch zur Behandlung kämen. Das ist nun, wie bekannt, nicht der Fall; gerade die Dysenterie ist, wenigstens in der gemäßigten Zone, wie kaum eine andere Infektionskrankheit streng auf gewisse Monate, etwa Juni bis November beschränkt. Es empfiehlt sich daher, so vorzugehen, wie dies im Wiener staatlichen serotherapeutischen Institut seit Jahren der Fall ist: Etwa Ende April werden die Serumvorräte in der schon geschilderten Weise auf Bindungsvermögen (Mischungsversuch) und kurativen Wert (getrennte, gleichzeitige Injektion) geprüft, die geeigneten Sera in Fläschchen verfüllt und versand-

*) Nicht veröffentlichte Versuche von KRAUS und DOERR.

fähig aufbewahrt. Durch etwa 6—7 Monate hält sich das Antitoxin nach den Erfahrungen, die Kraus und Doerr gemacht haben, annähernd unverändert, so daß man also mit jedem Vorrat für ein ganzes Jahr ausreicht.

Ebenso empfindlich ist das Dysenterieantitoxin gegen höhere Temperaturen. Einstündiges Erwärmen auf 70° C vernichtet es völlig.

Versuch vom 28. VII. 1906:

28. VII. 0,005 Serum „Infant" + 1,0 Toxin gemischt, sofort intrav. Kan. 110. Lebt.
28. VII. 0,005 Serum „Infant", 1 Stunde auf 70° C erhitzt, dann 1,0 Toxin zugesetzt und eine Stunde bei 37° C gehalten, hierauf intravenös injiziert. Kan. 219. † 29. VII.
28. VII. 0,5 Serum „Infant" (auf 70°), dann + 1,0 Toxin, nach einer Stunde injiziert. Kan. 210. † 29. VII.

Dieses differente Verhalten von Toxin und Antitoxin ließ es auch als möglich erscheinen, das Toxin durch einstündiges Erwärmen auf 70° C, aus seiner ungiftigen Verbindung mit dem Antitoxin durch Zerstörung des letzteren wieder frei zu machen.

Versuch:

(Kontrollen dieselben wie im vorigen; dazu noch für die Hitzeresistenz des Toxins:)
28. VII. 1,0 Toxin, 1 Stunde auf 70° C erhitzt, intravenös. Kan. 212. † 29. VII.
28. VII. 0,005 Serum „Infant" + 1,0 Toxin;
nach kurzer Zeit wird das Gemenge eine Stunde auf 70° C erhitzt, abgekühlt und intravenös injiziert. Kan. 296. † 30. VII.;
ebenso am 1. VIII. 0,005 Serum „Infant" + 1,0 Toxin, das Gemenge auf 70° C erhitzt und intravenös injiziert. Kan. 120. 2. VIII. †.

In gleicher Weise verhielten sich die Multipla:

30. VII. 0,5 Serum „Infant" + 10,0 Toxin, eine Stunde auf 70° C, sodann intravenös, Kan. 482. 1. VIII. †.

Aus diesen Experimenten, welche den Hitzetrennungsversuchen von Calmette[3]) am Schlangengift und von Wassermann[34]) am Pyocyaneustoxin analog sind, ersehen wir, daß es sich auch hier um eine einfache Bindung beider Komponenten, nicht aber um eine Zerstörung des Giftes durch das Gegengift handelt; denn die Toxin-Antitoxingemenge, welche sich im Vorversuch als neutral erwiesen hatten, gewannen durch das Erwärmen die ursprüngliche Giftigkeit der reinen Toxinlösung wieder zurück, eine Erscheinung, die ja nicht anders gedeutet werden kann, als daß das Antitoxin als empfindlicherer Teil der lockeren Verbindung durch die Hitze zunächst zerstört wird, während das, wie schon beschrieben, ziemlich thermostabile Toxin nur eine unerhebliche Abschwächung erfährt.

Anwendung des antitoxischen Dysenterieserums am Menschen.

Bei der strengen Spezifität des Dysenterieantitoxins und dem Umstande, daß wir verschiedene Erreger der epidemischen Ruhr kennen, ist die therapeutische Anwendung des rein antitoxischen Serums natürlich von vornherein begrenzt, beziehungsweise auf jene Fälle beschränkt, welche durch Shiga-Krusesche Bazillen hervorgerufen werden, umsomehr, als Flexnerbazillen überhaupt keine konstanten echten Toxine produzieren. Aber auch solche Kruse-Sera, die, abgesehen von ihrem Antitoxingehalt, noch bakterizid sind (bei Immunisierung mit Kulturen), können bei Flexnerfällen nicht herangezogen werden, seit Kraus und Doerr den experimentellen Nachweis geliefert, daß sie nicht imstande sind, gegen die

intraperitoneale Infektion mit lebenden Flexnerstämmen zu schützen (Mäuseversuche mit „Jobst“-Serum).

Nachdem es sich nun gezeigt, daß Flexnerepidemien nicht gerade zu den Seltenheiten gehören (Flexner, Jürgens, Doerr, Deyke, Duval und Basset, Leiner u. a. m.), ist man also gezwungen, sich zunächst über den ätiologischen Charakter der Epidemie zu orientieren. Die Züchtung der Ruhrbazillen aus dem Stuhle macht glücklicherweise heute ebensowenig Schwierigkeiten als die Feststellung ihres Typus (Mannitprobe, Agglutination, Kaninchenversuch) und genügt die Untersuchung einiger weniger Fälle, da jede Epidemie begreiflicherweise einen einheitlichen Erreger hat.

Man injiziert natürlich möglichst zeitig, am besten sofort, wenn die Diagnose sichergestellt ist, was ja bei der echten Ruhr bald der Fall sein muß. Die Einzeldosis sollte sich nach der Stärke des betreffenden Serums richten; wie wir aber bereits gesehen haben, ist ein einheitlicher Maßstab hierfür noch nicht akzeptiert, und finden wir daher rein empirische oder besser gesagt willkürliche Angaben über die Höhe der Serumdosis oder das therapeutisch wirksame Quantum.

Im Wiener staatlichen serotherapeutischen Institut werden Fläschchen mit 20 ccm ausgegeben, deren ganzer Inhalt (wie die für den Arzt beigegebene Gebrauchsanweisung besagt) die einfache Heildosis darstellt. Das Serum wird nicht karbolisiert, aber sorgfältig auf Sterilität geprüft. Auch Kruse, Shiga, Rosenthal und Lüdke verwendeten meist ähnliche Mengen; Vaillard und Dopter spritzen allerdings nur bei sehr schweren Fällen viel größere Serumquantitäten ein, 80—100 ccm, in mittleren und schweren Fällen gleichfalls 20—30 ccm, Kanel[12]) zirka 60.

Die meisten Autoren (Kraus und Doerr, Kruse, Shiga, Rosenthal, Lüdke, Rosculet) geben übereinstimmend an, daß die einmalige Seruminjektion zur Erzielung eines guten therapeutischen Erfolges ausreicht. Nur wenn eine günstige Beeinflussung des Krankheitsprozesses ausbleibt, wird die nochmalige Applikation derselben Quantität empfohlen (Gebrauchsanweisung des Wiener Serums, Shiga). In schweren Fällen kann man die doppelte Heildosis auf einmal oder gleichfalls an zwei aufeinanderfolgenden Tagen geben.

Vaillard und Dopter teilen die Dysenteriefälle je nach der Intensität des Prozesses, die der Zahl der Stühle meist proportional ist, in folgende Gruppen:

I. Mittlere Fälle (cas moyens)	mit	15—30	Stühlen	täglich,
II. Ernste Fälle (cas sévères)	„	30—80	„	„
III. Schwere Fälle (cas graves)	„	80—150	„	„
IV. Sehr schwere Fälle (cas extrêmement graves)	„	150—288	„	„

Für Gruppe I und II reichten nach ihren Erfahrungen 20 resp. 30 ccm, im Beginne der Krankheit injiziert, aus, um eine sofortige Besserung und rasche Heilung herbeizuführen. Nur wenn die Koliken anhalten, oder die Stühle noch immer zahlreich bleiben, wird die Injektion wiederholt, eventuell mit einer dritten Injektion einer geringeren Menge noch nachgeholfen.

Gruppe III erhält gleich das erstemal 40—60 ccm; am nächsten Tage wird diese Dose wiederholt und wenn die abdominalen Erscheinungen nicht völlig nachlassen, so werden so lange fallende Mengen appliziert, bis die Zahl der Stühle auf 3—5 gesunken ist.

Bei den allerschwersten Fällen endlich werden am ersten Tag 80 bis 100 ccm in zwei Dosen geteilt, gereicht, und diese großen Mengen auch an den folgenden Tagen appliziert, wenn die Schwere der Attaquen es erheischt. Dann erst geht man allmählich mit den Dosen herunter, jedoch nicht plötzlich, wenigstens solange, als die Zahl der Entleerungen noch mehr als 20—30 pro die beträgt.

Auf diese Weise haben Vaillard und Dopter in drei Fällen 240, 380, ja 1080 ccm Serum einverleibt. Es ist nun doch fraglich, ob diese forcierte Behandlung von großem Nutzen ist; man mag ja immerhin in besonderen Fällen die Einzeldosen erhöhen und die Injektionen wiederholen, wie dies Shiga bei der japanischen, Rosenthal bei der russischen Ruhr getan, ohne darum die Riesenmengen der französischen Autoren zu billigen. Von hochwirksamen Seris werden sie auch nicht erforderlich sein, denn die Fälle von Kraus und Doerr waren zum Teil ebenso schwer, wie die von Vaillard und Dopter, ihr Fall 3 und Fall 7 z. B. müßte in Gruppe IV der obigen Skala einrangiert werden und doch war die einmalige Injektion von 30 ccm „Elektraserum“ zur Heilung völlig suffizient. (Gleiches berichten Rosenthal, Rosculet u. a.).

Die Behandlungsschemata für die 3. und 4. Gruppe dürften sich also wohl bei Anwendung entsprechender Sera als überflüssig erweisen; ein sicheres Urteil wird allerdings erst eine einheitliche Wertbestimmung der antidysenterischen Heilsera ermöglichen.

Sämtliche Autoren injizieren **subkutan** unter die Bauchhaut oder die Haut der Flanke. Die Einspritzungen werden gut vertragen und verlaufen meist reaktionslos. Bisweilen treten Serumexantheme auf, Erytheme, Urticaria, Gelenkschmerzen; Rosenthal beobachtete sie bei 13 % der Fälle, ebenso Vaillard und Dopter. Intravenöse Injektionen wurden bisher nicht versucht. Nach den Tierexperimenten von Kraus und Doerr steht nun fest, daß nur intravenös injiziertes Antitoxin gegen in gleicher Weise einverleibtes Toxin kurativ wirkt, daß dagegen subkutan selbst große und gleichzeitig mit dem Toxin applizierte Serummengen, nicht imstande sind, die Tiere zu schützen. Das intravenös injizierte Gift gelangt eben viel schneller zu den Organen, als das Antitoxin, das vom Unterhautzellgewebe nur langsam resorbiert werden kann. Wie Kraus und Doerr wiederholt betonen, lassen aber diese Tierexperimente nicht den Schluß zu, daß man auch beim Menschen das Heilserum intravenös geben müsse, da hier die Giftresorption vom Darme aus langsamer erfolgt, also ähnlich wie die des Antitoxins von der Subkutis und das Gift andererseits gewiß auch nicht auf einmal, sondern erst innerhalb eines gewissen Zeitraumes von den Bakterien gebildet wird. Daß der zweite Faktor eine bedeutende Rolle spielt, geht übrigens auch aus den Versuchen von Vaillard und Dopter hervor, die mit 1—2 ccm subkutan injizierten Serums Kaninchen retten konnten, wenn die Tiere eine sicher tödliche Dosis Kultur 24 Stunden vorher subkutan erhalten hatten; dagegen war die gleiche Menge nach derselben Zeit gegen subkutan eingebrachtes Toxin unwirksam.

Übrigens lehren ja auch die bisherigen Erfahrungen, daß man ruhig die subkutane Seruminjektion beibehalten kann, die weniger umständlich und sicher auch ungefährlicher ist, als die intravenöse.

Die Wirkung der Seruminjektion

haben alle Beobachter ganz übereinstimmend geschildert. Sie erstreckt sich auf die entfernten und lokalen Symptome in der gleichen Weise.

Das Verhalten des Fiebers ist allerdings weniger beweisend. Wie bekannt ist dieses Symptom bei der Dysenterie ziemlich inkonstant; das Fieber besteht meist nur im Beginne, erreicht keine hohen Grade und zeigt keinen typischen Verlauf. Immerhin kann man wenige Stunden nach der Seruminjektion ziemlich regelmäßig einen jähen Temperaturabfall beobachten, wenn man die Patienten zeitig genug, d. h. noch im fiebernden Zustande zur Behandlung bekommt. Auch nimmt die Pulsfrequenz etwas ab. Diese Beeinflussung des Initialfiebers durch das Serum hat am genauesten Shiga beobachtet, vielleicht weil er, die Infektion in den Vordergrund stellend, dem Fieber eine zu große Bedeutung zumaß. Seiner Publikation ist die nachfolgende Kurve entnommen. (Fig. 1.)

Viel gefahrdrohender als das Fieber sind dagegen die im späteren Verlaufe schwerer Fälle nie fehlenden Kollapse. Die Patienten fühlen sich kalt an, namentlich an den Extremitäten, das Gesicht sieht blaß aus, fast bleifarben, die Augen sind haloniert, die Temperatur sinkt unter die Norm, der Puls wird klein, kaum fühlbar und äußerst frequent. Dabei besteht Erbrechen und beständiger Singultus.

nach K. Shiga (Kurve IV.)

Fig. 1.

In solchen Fällen wirkt nun das Serum vorzüglich, auch wenn es erst an dem achten oder zehnten Krankheitstag gereicht wird. Die Körperwärme hebt sich bis zur Norm, der Puls wird voller und kräftiger, das Erbrechen und Schluchzen sistiert, die Haut fühlt sich warm an; das Gesicht bleibt natürlich blaß und anämisch, sieht aber nicht mehr verfallen aus, die Augen haben einen lebhafteren Ausdruck.

Sehr charakteristisch für die durch das Serum herbeigeführte Wandlung ist die Besserung des subjektiven Befindens; die Patienten, die noch vor Stunden aufs äußerste erschöpft, ohne Teilnahme, völlig apathisch, ja regungslos im Bette lagen und meist an absoluter Schlaflosigkeit litten, fühlen sich erleichtert, gekräftigt, ja manchmal vollkommen erholt, und geben ihrer Befriedigung ohne alle Suggestivfragen lebhaften Ausdruck, wobei die meisten selbst die Besserung als direkte Folge der Einspritzung betrachten. Sehr rasch stellt sich auch wieder der Schlaf ein.

Aber auch die **lokalen** Symptome werden durch das Heilserum rasch und energisch gebessert und ich muß gestehen, daß mir eigentlich diese wesentlichere Komponente der Antitoxinwirkung beim Menschen im Anfange nicht recht verständlich war, weil man ja von jeher geneigt schien, wenigstens die anatomischen Veränderungen der Darmschleimhaut mit der Infektion als solcher in Zusammenhang zu bringen oder sie als

direkte Folge lokaler Giftwirkung zu betrachten. Wenn man aber bedenkt, daß (nach eigenen Versuchen, sowie nach Flexner und Sweet) Kaninchen, Hunde, Affen, Katzen, nach Todd auch Pferde für Dysenterietoxin so empfänglich sind, aber nur vom Gewebe aus, nicht vom Darmlumen, daß sie als Folge reiner Toxinwirkung die nämliche Darmerkrankung zeigen wie der Mensch, daß endlich auch beim Menschen die Lokalisation der Veränderungen im Dickdarme auf die Entstehung durch Giftausscheidung aus dem Blute in nicht zu verkennender Deutlichkeit hinweist, so wird man kaum fehlgehen, wenn man auch bei der menschlichen Dysenterie den intestinalen Prozeß wenigstens zum Teil auf die Wirkung resorbierter und im Dickdarm wieder abgeschiedener Gifte zurückführt. Damit wird dann die Wirkung des eingeführten und im Blute zirkulierenden Antitoxins auf den lokalen Vorgang im Dickdarm verständlich; es neutralisiert das Dysenterietoxin im Kreislauf, das sonst durch Elimination im Darme die hämorrhagisch-nekrotisierende Entzündung desselben progredient beeinflussen würde.

Fig. 2.

So finden wir nun in der Tat von Shiga angefangen bis Vaillard und Dopter immer die Angabe, daß das Blut aus den Stühlen verschwindet, daß die Entleerungen zunächst schleimig, dann fäkal-flüssig, schließlich breiig und normal werden. Gleichzeitig schwinden auch die quälenden, durch die intestinale Erkrankung ausgelösten Symptome, wie die oft furchtbaren, unerträglichen Koliken, die Schmerzen, der Tenesmus. Auch diese lokale Besserung vollzieht sich bisweilen in überraschend kurzer Zeit, meist in 24 bis 48 Stunden. Hand in Hand geht damit eine rapide Reduktion der Zahl der Stühle, ein Verhalten, das die meisten Autoren graphisch dargestellt haben.

Von den vorstehenden Kopien zeigt Fig. 2 einen leichten Fall (Lüdke), Fig. 3 einen schweren, endlich Fig. 4 einen jener Fälle, welche der Gruppe IV von Vaillard und Dopter entsprechen.

Den letztgenannten Autoren verdanken wir überhaupt eine große Zahl gut beobachteter Fälle. Bemerkenswert wäre besonders das Auftreten von Rezidiven nach wirksamer Serumbehandlung, die sich aber ebenso wie die erste Attacke antitoxisch heilen lassen und die Mitteilung eines Falles von chronischer Dysenterie, der, nachdem er bereits 5 Monate allen medikamentösen Mitteln getrotzt hatte, durch drei Seruminjektionen geheilt werden konnte, jedenfalls ein großer Erfolg.

Entschieden zu bestreiten ist aber die Angabe von Vaillard und Dopter, daß Flexnerfälle durch Kruseserum genau so beeinflußt werden, wie Kruseinfektionen. Dem widersprechen, abgesehen von den angeführten theoretischen Bedenken, auch eigene Erfahrungen. Bei der in Wien beobachteten Flexnerepidemie[29]) wurde Shiga-Kruseserum in etwa der Hälfte der Fälle angewendet und konnte der Chefarzt der Infektionsabteilung des Garnisonsspitales Nr. 1 St. A. Franz einen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Kranken nicht konstatieren.

Wenn überhaupt alle statistischen Angaben nur mit Vorsicht verwertet werden dürfen, so ist dies, wie Kruse sehr klar auseinandersetzt, ganz besonders bei der Dysenterie der Fall, wo z. B. Kinder eine viel höhere Mortalität haben als Erwachsene; dazu kommt, daß die Auspizien der Serumtherapie viel ungünstiger liegen können, ja müssen, wenn ein Patient erst spät in die Behandlung kommt, etwa schon im kollabierten Zustande; stirbt ein solcher Fall trotz Serum, so ist es ohne Frage nicht objektiv, ihn als Mißerfolg der antitoxischen Therapie zu registrieren.

Fig. 3. Fig. 4.

Endlich leiden manche Angaben dadurch, daß wir nicht wissen, ob es sich wirklich um Infektion mit Kruse-Shigaschen Bazillen gehandelt hat.

Viel wertvoller als Ziffern ist sicher das übereinstimmende Urteil so vieler Autoren (Shiga[27]), Kruse[19]), Rosenthal[25]), Kraus u. Doerr[18]), Rudnik[26]), Irimescu[11]), Karlinski[13]), Rosculet[24, 25]), Kanel[12]), Lüdke[20]), Vaillard u. Dopter[33]), Barikin[1]), Wladimiroff, Korentschewsky[14])), welche von der Serumwirkung nicht nur im allgemeinen, sondern an der Hand zahlreicher, detailliert beschriebener Fälle nahezu wörtlich gleichlautende Berichte geliefert haben.

Die prophylaktische Anwendung des antitoxischen Ruhrserums haben zuerst Kraus u. Doerr auf Grund von Versuchen vorgeschlagen, in denen es gelang, Kaninchen gegen die nachherige Injektion von Toxin oder lebender Kultur zu schützen. Über ähnliche Experimente hat zurzeit Todd und später auch Vaillard u. Dopter berichtet. Über die Verwendbarkeit antitoxischer Sera zu präventiven Immunisierungen bestand ja übrigens schon nach den beim Diphtherieserum gemachten Erfahrungen kein Zweifel. Dieser Anregung hat nun Rosculet tat-

sächlich Folge geleistet und 1905 in Rumänien 18 gesunde Personen aus Häusern, in welchen Dysenteriekranke lagen, durch subkutane Injektion von 5 ccm Wiener Dysenterieserum vor der Ansteckung zu schützen gesucht. 18 andere Personen, welche sich unter den gleichen Verhältnissen befanden, wurden als Kontrollen bestimmt und beobachtet. Von den 18 mit Serum Injizierten erkrankte nicht einer; von den 18 anderen nicht Injizierten erlitten 14 einen Anfall von typischer Dysenterie. Dieser Versuch ist klein, aber beweisend, wenn man die Verhältnisse in rumänischen Dörfern kennt und berücksichtigt, welcher Infektionsgefahr dort Personen ausgesetzt sind, die mit einem Dysenteriekranken durch Wochen dasselbe Haus resp. dieselbe Hütte bewohnen. Beweist doch die Morbiditätsziffer der Kontrollgruppe geradezu die Unwahrscheinlichkeit, unter solchen Bedingungen der Ansteckung zu entgehen.

Alle anderen Bestrebungen, Menschen prophylaktisch gegen Dysenterie zu schützen, gehören strenge genommen nicht in den Rahmen unserer Erörterungen. Sie gingen ja sämtlich von dem Prinzip aus, das Serum bakterizid zu machen, entweder auf aktivem Wege oder auf passivem. Das erstere haben schon Kruse und Shiga, in letzter Zeit wieder Lüdke durchzuführen versucht, indem sie abgetötete Dysenteriekulturen in geringen Mengen subkutan einspritzten. Die Reaktion war aber so bedeutend, sowohl lokal als allgemein, daß das Verfahren für die Praxis unanwendbar schien. Shiga hat daher zunächst $^1/_2$ Öse durch Hitze getöteter Kultur gleichzeitig mit Immunserum injiziert, um die allzu stürmischen Impffolgen zu mildern und 3 bis 4 Tage später 2 Ösen Kultur ohne Serum. Das Verfahren bei 10000 Japanern angewendet ergab keine Herabsetzung der Morbidität; es erkrankten gleichviel wie unter den Nichtgeimpften, doch sank die Mortalität fast bis auf 0, während sie bei den anderen Dysenteriekranken 30—40% betrug.

Da auch die Shigasche Vakzination von erheblichen Gesundheitsstörungen gefolgt ist, verfiel Kruse auf die Idee, die bakteriziden Immunkörper mit dem Serum fertig einzuverleiben, die Menschen also gewissermaßen passiv zu immunisieren. Von 10 Injizierten (aus verseuchten Familien) bekam nur ein einziger Dysenterie, der drei Tage früher 2,0 ccm Serum erhalten hatte; Kruse schlägt daher vor, die Dose auf 5,0 ccm zu erhöhen. Seine Methode haben Vaillard und Dopter neuerdings wieder aufgegriffen, praktisch jedoch nicht angewendet. Ihrem Wesen nach fällt sie natürlich mit den prophylaktischen Seruminjektionen von Kraus und Doerr zusammen, da die Sera Kruses und der französischen Autoren eben auch hauptsächlich antitoxisch sind.

Nach den Berichten Rosculets steht zu hoffen, daß wir im antitoxischen Serum tatsächlich ein Mittel besitzen, um unter besonderen Verhältnissen (z. B. im Kriege, in Arbeiterdistrikten) nicht nur die Krankheit zu bekämpfen, sondern auch ihre epidemische Ausbreitung zu verhüten.

Literatur.

1) Barikin, Russky Wratsch 1905.
2) Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur, April 1906.
3) Calmette, Ann. Pasteur 1895.
4) Conradi, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 2.
5) Doerr, Centralblatt für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII, Orig.
6) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 41.
7) Ders., Das Dysenterietoxin, Jena 1907.

8) DRIGALSKI, v., Veröffentl. aus d. G. d. Militärsanitätswesens 1902, Heft 20.
9) FLEXNER und SWEET, Journal of exper. medic. 1906, Vol. III, Nr. 4.
10) GABRITSCHEWSKY, Centralblatt für Bakt. 1904, Bd. XXXIV. Ref.
11) JRIMESCU, Revista sitintelor medic. 1906, Nr. 1.
12) KANEL, Münchner med. Wochenschr. 1905, Nr. 15. Ref.
13) KARLINSKI, Wiener klin. Wochenschr. 1906.
14) KORENTSCHEWSKY, Münchner med. Wochenschr. 1904.
15) KRAUS und DOERR, Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 7.
16) Dies., Ebenda 1905, Nr. 42.
17) Dies., Ebenda 1906, Nr. 30.
18) Dies., Zeitschrift für Hyg. 1906, Bd. LV.
19) KRUSE, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 1 und Nr. 3.
20) LÜDKE, Centralblatt für Bakt., Bd. XXXVIII, Orig. Heft 3 ff.
21) NEISSER und SHIGA, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 4.
22) ROSCULET, Buletinul dir. gen. a serv. Sanitar. 1906, Nr. 23 und Nr. 24.
23) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 35.
24) ROSENTHAL, Deutsche med. Wochenschr. 1903.
25) Ders., Ebenda 1904, Nr. 7.
26) RUDNIK, Wiener klin. Wochenschr. 1906.
27) SHIGA, Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 43—45.
28) Ders., Ebenda 1903, Nr. 7.
29) Ders., Centralblatt für Bakt. 1898, Bd. XXIII.
30) TODD, Brit. med. Journ., 5. Dez. 1903.
31) Ders., Journ. of hyg. 1904, Vol. IV.
32) VAILLARD und DOPTER, Ann. de l'Inst. Past. 1903.
33) Dies., Ebenda, Mai 1906.
34) WASSERMANN, Zeitschrift für Hyg. 1896, Bd. XXII.

IX.

Das Rauschbrand-Antitoxin.

Von

R. Graßberger und A. Schattenfroh

in Wien.

A. Aktive Immunität gegen das Gift.

Wir haben in dem Artikel dieses Handbuches „Das Rauschbrandgift" auseinandergesetzt, wie es uns durch Einhaltung einer besonderen Methodik gelang, hochwirksame Lösungen des von den Rauschbrandbazillen produzierten Giftes zu gewinnen, und haben die Eigenschaften dieser Giftlösungen beschrieben. Der vorliegende Abschnitt soll nun Gewinnung und Eigenschaften des zu dem spezifischen Antigene gehörenden Antikörper-Serums schildern.

Unsere Versuche begannen damit, daß wir Meerschweinchen aktiv zu immunisieren trachteten. Hierbei stießen wir anfangs auf erhebliche Schwierigkeiten. Injizierten wir Meerschweinchen subkutan nichttödliche Dosen Rauschbrandgiftes, so erzielten wir niemals Giftfestigung. Es zeigten im Gegenteil die Tiere meist im Vergleich mit nicht vorbehandelten Tieren eine unverkennbare Überempfindlichkeit gegenüber dem Gifte.

Auch durch Behandlung mit gelagerten und mit durch Erwärmen ungiftig gemachten Lösungen konnte keinerlei aktiver Schutz hervorgerufen werden.

Verhältnismäßig leicht gestaltete sich die Immunisierung der Kaninchen gegen das Rauschbrandgift. In einem Falle gelang es uns, ein Kaninchen so weit zu immunisieren, daß wiederholte Injektionen der (für Kaninchen) mehr als 1000fachen D.L.M. fast reaktionslos vertragen wurden.

Besonders glatt verlief die Giftimmunisierung bei Rindern und Schafen. Diese Tiere erwarben bereits nach einer Injektion, vorausgesetzt, daß stärkere Reaktionserscheinungen eingetreten waren, einen merkbaren Schutz vor dem Gifte, der sich nach 2—3maliger Wiederholung der Behandlung in steigender Dosis nunmehr auffallend rasch und erheblich steigern ließ. Wie aus unserer Broschüre „Über das Rauschbrandgift etc." des näheren ersichtlich ist, bewirkten 3—4malige Injektionen von im Ganzen 60—70 ccm Normalgiftlösung bereits eine der-

artige Giftimmunität, daß Dosen von 300, selbst 1000 ccm Normalgiftlösung ertragen wurden, ohne daß — von leichten Schwellungen an der Injektionsstelle abgesehen — irgend welche Krankheitssymptome auftraten.

Die Festigung gegen das Gift trat ziemlich rasch ein. Bei dem Umstand, als zum Abfall der Reaktionserscheinungen eine Woche Pause genügt, konnten die Injektionen in Intervallen von je einer Woche folgen. Dabei konnte selbst nach dem Überstehen der schwersten Lokal- und Allgemeinerscheinungen niemals eine Überempfindlichkeit der Tiere gegenüber dem Gift beobachtet werden.

B. Gewinnung des antitoxischen Serums.

Die Giftfestigung im Körper der vorbehandelten Tiere geht mit der Bildung von Schutzstoffen einher, die im Blute gelöst sind und den Charakter der typischen Antitoxine besitzen. Diese antitoxischen Eigenschaften gewinnt das Blut der vorbehandelten Tiere häufig frühzeitig und gleichzeitig mit dem Entstehen der aktiven Immunität. Höhe des Giftschutzes und Wertigkeit des antitoxischen Serums gehen nicht immer parallel. Im allgemeinen ist z. B. bei Kaninchen trotz absoluter Giftimmunität das Blutserum nur sehr mäßig antitoxisch, während Rinder ziemlich übereinstimmend mit dem Auftreten der aktiven Immunität schon frühzeitig ein relativ hochwertiges Serum liefern.

Der antitoxische Wert des Serums erreicht bei fortgesetzter Behandlung bald einen stationären Wert. Im allgemeinen reicht bei Jungrindern eine 4—5monatliche Behandlung zur Gewinnung eines sehr wirksamen Blutserums aus. Gleich bei dem zweiten in Behandlung genommenen Rinde konnten wir ein Serum gewinnen, von welchem 0,0025 ccm genügten, um 1,0 ccm Normalgift = 100 tödliche Meerschweinchendosen zu neutralisieren. Das Serum besaß also, wenn wir die übliche Bezeichnung wählen, den Wert eines 400fachen Normalserums. Dieser hohe Titer stellt, wie wir uns überzeugen konnten, keinen Ausnahmsfall vor. Bei einem anderen Rinde erzielten wir ein 420faches Normalserum.

Auch bei Meerschweinchen gelang es uns schließlich, nach einer besonderen Methode (s. u.) ein 400faches Normalserum zu gewinnen.

Wir wollen die genaueren Verhältnisse der Titrierung von Toxin und Antitoxin des Zusammenhanges wegen später schildern und zunächst die Eigenschaften des Serums gegenüber der Einwirkung verschiedener Einflüsse auseinandersetzen.

Soweit unsere Erfahrungen reichen, ist das antitoxische Serum von unbegrenzter Haltbarkeit, wenn es bei niedriger oder selbst bei gewöhnlicher Zimmertemperatur vor Licht geschützt aufbewahrt wird. Wir besitzen gegenwärtig noch Proben eines vor mehr als 3 Jahren gewonnenen Serums, das innerhalb dieser Zeit nicht an Wirksamkeit abgenommen hat. Die große Beständigkeit des antitoxischen Serums ist für die Aichung der Giftlösungen (s. weiter unten) von großem Wert und ermöglicht erst einen genaueren Vergleich derselben untereinander. Da das Eintrocknen und Wiederauflösen von getrocknetem Serum umständlich ist, erscheint es zweckmäßiger, behufs Konservierung das steril gewonnene Serum des Aderlaßblutes mit Chloroform zu versetzen und in der Kälte in wohl verschlossenen oder zugeschmolzenen Glasgefäßen aufzubewahren.

Im Gegensatz zum Rauschbrandtoxin ist das antitoxische Serum in hohem Grade hitzebeständig, 3stündiges Erwärmen auf 60° verringert seine Wirksamkeit nicht im geringsten, selbst 19stündige Einwirkung der gleichen Temperatur schädigte es nicht merklich.

C. Die Beziehungen von Toxin und Antitoxin.

Aus den zahlreichen Versuchen, die wir mit verschiedenen Rauschbrandseren und 1—20fachen N.-Giftlösungen, im frischen und gelagerten Zustand, angestellt haben — Versuche, die in unserer Arbeit „Über die Beziehungen von Toxin und Antitoxin“ ausführlich mitgeteilt wurden — gehen vor allem zwei bemerkenswerte Tatsachen hervor.

Giftwert und Bindungsvermögen gegenüber antitoxischem Serum gehen einmal einander stets parallel, gleichgültig ob es sich um starke oder schwache Giftlösungen handelt. Tritt unter irgend einem Einfluß, z. B. beim Lagern der Giftlösungen, eine Abnahme des Giftwertes ein, so schwindet auch im gleichen Maße der Bindungswert.

Giftlösungen, die durch Lagern oder Erhitzen unwirksam geworden sind, binden kein Antitoxin, sie zeigen sich auch insofern unwirksam, als auch die wiederholte Injektion dieser Lösungen keine Giftfestigkeit, keine Produktion von Antitoxin hervorruft.

Diese Tatsache schien uns insofern sehr wichtig zu sein, als sie auf das Fehlen von sog. Toxoiden im Sinne Ehrlichs hinwies, die ja in der Tat bei anderen Bakterientoxinen vorkommen.

Bekanntlich hat ja gerade bei den von Ehrlich und seiner Schule so eingehend studierten Diphtheriegiftlösungen das Vorhandensein solcher ungiftigen, aber antitoxinbindenden Stoffe seinerzeit die Veranlassung gegeben, daß eine Anzahl von beachtenswerten Erscheinungen, die beim Studium der Beziehungen von Gift und Antitoxin zutage treten, auf die Wirkung solcher Stoffe zurückgeführt wurde.

Wir brauchen nur auf die Ehrlichsche Toxoid- und Toxon-Nomenklatur hinzuweisen, um daran zu erinnern, daß noch vor wenigen Jahren eine von Ehrlich aufgestellte, komplizierte Hypothese die Vorstellungen der meisten Forscher mehr gefangen nahm, als dies im Sinne einer streng kritischen Beurteilung zulässig war. Seither ist allerdings ein Umschwung in der Stimmung eingetreten, indem sich immer mehr die Anschauung gefestigt hat, daß sich Ehrlich bei Aufstellung seines Hypothesengebäudes durch die Nichtbeachtung einer Reihe von Tatsachen zum Teil zu Irrtümern verleiten ließ.

Wir glauben, daß zur Umwertung des „Toxonbegriffes“ neben der Kritik Grubers und den Arbeiten von Madsen und Arrhenius auch unsere vor zwei Jahren publizierte, oben zitierte Broschüre wesentlich beigetragen hat.

Hiermit kommen wir auf die zweite wichtige Tatsache zu sprechen, die sich bei unseren Versuchen herausstellte. Trotz des Fehlens von Toxoiden zeigt sich auch bei Rauschbrandgift-Gegengiftgemischen jene auffallende Erscheinung der breiten L + — L 0 Distanz, die von Ehrlich bei Diphtheriegift-Gegengiftgemischen seinerzeit festgestellt wurde und auf die Gegenwart besonderer Stoffe — Toxone — zurückgeführt wurde. Man beobachtet nämlich, daß bei Aichungsreihen solcher Gemische, die aus je einer und derselben Menge Antitoxin (z. B. einer Immunitätseinheit) und steigenden Mengen von Gift hergestellt werden, die Differenz zwischen der im L + und der im L0 Gemisch implizierten Giftmenge nicht der einfach tödlichen Dosis, sondern einem Multiplum derselben entspricht.

Gemische, die zwischen L+ und L0 liegen, rufen lokale Erscheinungen, Schwellungen bzw. Nekrosen hervor. Die gleiche Erscheinung der breiten L+ — L0 Distanz tritt natürlich auch bei solchen Reihen zutage, deren einzelne Gemische eine und dieselbe Menge Gift und steigende Dosen Antitoxin enthalten.

Dieser Gang der Titrierung findet sich bei den meisten unserer Versuche eingehalten.

Der Vorteil aber, den die von uns angewendete Herstellung der Gemische, wobei wir als Grundlage stets 1,0 ccm Giftlösung benutzten, bietet, liegt darin, daß man bei Verwendung von verschieden wirksamen Giftlösungen sofort erkennt, daß die Breite der sog. Toxonzone eine Funktion der Verdünnung ist, und im allgemeinen um so größer ist, je weniger tödliche Dosen in 1,0 ccm Giftlösung enthalten sind.

Dies kommt wohl am besten bei Versuchen zum Ausdruck, die einerseits mit Verwendung von je 1,0 ccm unverdünnter hochwirksamer Giftlösung, anderseits von je 1,0 ccm einer aus dieser Giftlösung hergestellten 100fachen Verdünnung angestellt sind.

Hierfür gibt folgender Versuch ein Beispiel (Versuch I).

Ein guter Maßstab zur Beurteilung der Breite der Zone wird gewonnen, wenn man die Serummenge, die dem Abstand des L0 und L+ Gemisches entspricht, ins Verhältnis zu der im L+ Gemisch implizierten Serummenge setzt. Man erkennt dann, daß dieses Verhältnis bei der unverdünnten Giftlösung $\frac{1}{6,4}$, bei der verdünnten $\frac{1}{0,83}$ beträgt.

Ungefähr ebenso breit wie die Toxonzone sich bei verdünnten Lösungen zeigt, ist sie auch, wenn die Lösungen nicht durch Verdünnung, sondern durch Lagern entsprechend schwächer geworden sind.

Nachfolgende Tabelle (Versuch II) gibt Aufschluß über die bei Gemischen von Serum und frischen sowie gelagerten Giftlösungen beobachtete Breite der L+ — L0 Distanz und die hieraus berechneten Coëfficienten.

Versuch I. Vergleich der Aichung einer konzentrierten 6 fachen N-Giftlösung mit der Aichung der gleichen 100 fach verdünnten Giftlösung.

a) Aichung der konzentrierten Giftlösung. (27. Okt. 1903.)

Nr.	Giftlösung	Serum (400 f. Normal)	
1	1,0	0,013	Nach 1 Tage tot
2	1,0	0,014	Nach 2 Tagen tot
3	1,0	0,015	Nach 2 Tagen tot
4	1,0	0,016	Nach 7 Tagen tot
5	1,0	0,0165	Noch nach 3 Tagen starke Schwellung
6	1,0	0,0170	Starkes Infiltrat
7	1,0	0,0175	Infiltrat (nach 3 Tagen noch fühlbar)
8	1,0	0,018	Noch nach 48 Stunden Infiltrat, nach 3 Tagen glatt
9	1,0	0,0185	Nach 24 Stunden glatt
10	1,0	0,019	Glatt
11	1,0	0,020	do.
12	1,0	0,021	do.
13	1,0	0,022	do.
14	1,0	0,024	do.

b) Aichung der verdünnten Giftlösung.

Nr.	100 fach verdünnte Giftlösung	100 fach verdünntes Serum (400)	
1	1,0	0,007	Nach 3 Tagen tot
2	1,0	0,010	do. do.
3	1,0	0,013	Starke Schwellung, Spuren von Hämorrhagien
4	1,0	0,014	Mäßig starke Schwellung, keine Hämorrhagien
5	1,0	0,015	Mäßig starke Schwellung
6	1,0	0,015 Gemisch 1 Std. gestanden	Geringgradige Schwellung
7	1,0	0,016	Etwas stärkere Schwellung, nach 3 Tagen Infiltrat
8	1,0	0,0165	Nach 24 Stunden Schwellung, nach 3 Tagen Infiltrat
9	1,0	0,017	Nach 48 Stunden Infiltrat, nach 3 Tagen Haut verdickt
10	1,0	0,0175	Nach 48 Stunden Spuren von Infiltrat
11	1,0	0,018	do. do.
12	1,0	0,018 Gemisch 1 Std. gestanden	do. do.
13	1,0	0,0185	Nach 3 Tagen Haut fixiert
14	1,0	0,019	do. do.
15	1,0	0,020	do. do.
16	1,0	0,021	do. do.
17	1,0	0,022	Glatt
18	1,0	0,022 Gemisch 1 Std. gestanden	do.
19	1,0	0,024	do.
20	1,0	0,027	do.
21	1,0	0,030	do.

Versuch II. Breite der Toxonzone.

Versuch	Giftlösung	Im L+ Gemisch implizierte Serummenge	Serummenge der Distanz	$\frac{\text{Serum der Toxondistanz}}{\text{Serum in L+}}$
IX *a*)	D frisch	0,016	0,0025	$\frac{0,0025}{0,016} = \frac{1}{6,4}$
XIII *b*)	E frisch	0,0075	0,0015	$\frac{0,0015}{0,0075} = \frac{1}{5}$
VI *c*)	B frisch	0,0036	0,0008	$\frac{0,0008}{0,0036} = \frac{1}{4,5}$ *)
II *b*)	A 5 Tage gelagert	0,0015	0,0010	$\frac{0,0010}{0,0015} = \frac{1}{1,5}$
IV *b*)	A 12 Tage gelagert	0,00040	> 0,0002	$\frac{> 0,0002}{0,0004} = > \frac{1}{2}$
XI *b*)	D 20 Tage gelagert	0,00025	0,0004	$\frac{0,0004}{0,00025} = 1,6$
V *b*)	A 20 Tage gelagert	0,000075	0,00018	$\frac{0,00018}{0,000075} = 2,4$
VII *b*)	B 19 Tage gelagert	0,00005	0,00020	$\frac{0,00020}{0,00005} = 4,0$ *)

*) Große Meerschweinchen.

Es ist demnach zweifellos, daß in jenen Gemischen, in welchen die Konzentration von Gift und Gegengift eine geringe ist, die Bindung von Toxin und Antitoxin in der gleichen Zeit unverhältnismäßig weniger vollständig erfolgt, als in konzentrierten Gemischen; daß demnach in solchen Gemischen Gift und Gegengift sich entweder im Sinne von ARRHENIUS und MADSEN als Körper mit geringer Affinität verhalten, derart, daß neben Toxin-Antitoxinmolekülen freie Toxin- und freie Antitoxinmoloküle vorhanden sind, oder aber, daß im Sinne BORDETS Toxin und Antitoxin sich in verschiedenen Proportionen zu Verbindungen vereinigen, von denen die einen, bei welchen an eine bestimmte Anzahl von Giftmolekülen die maximale Antitoxinmenge gekettet ist, völlig unwirksam sind, während die anderen, bei welchen an die gleiche Anzahl von Toxinmoleküle weniger Antitoxinmoleküle gebunden sind, zwar weniger wirksam als Giftmoleküle sind, aber immerhin noch bis zu einem gewissen Grade Giftwirkung entfalten. Auch in diesem Falle müßte der Reichtum an solchen noch giftigen Toxin-Antitoxinmolekülen eine Funktion der Konzentration sein.

Untenstehender Versuch zeigt, daß auch bei nachträglich vorgenommener 100facher Verdünnung eines „schwellungmachenden" Gemisches eine Dissoziation von Toxin oder eine Vermehrung der Zahl von unvollständig gebundenen Toxinmolekülen eintritt, welche das verdünnte Gemisch relativ wirksamer als das konzentrierte erscheinen läßt.

Es wurde weiterhin in einer größeren Versuchsreihe getrachtet, über die Verhältnisse der Bindung von Gift und Gegengift durch das Studium von kürzer und länger gelagerten Toxin-Antitoxingemischen Aufschluß zu gewinnen.

Indem wir bei diesen Versuchen zum erstenmale den Einfluß des Erhitzens auf verschiedene Gemische quantitativ feststellten, erhielten wir Resultate, wie sie bis heute mangels entsprechender Versuchsanordnung bei anderen Bakteriengiften von anderer Seite nicht gewonnen wurden*).

Wir wollen vorausschicken, daß die Versuche in mannigfacher Weise variiert wurden, indem die Gemische so hergestellt waren, daß sie zum Teil Überschüsse von Gift, zum Teil Überschüsse von Antitoxin enthielten.

Versuch III. 3 fach. Normal-Gift. 400 fach. Normal-Serum.

Nr.	Giftlösung konzentriert	Serum konzentriert (400)	Meerschweinchen von 250 g
1	1,0	0,004	Nach 16 Stunden tot
2	1,0	0,005	Nach 2 Tagen tot
3	1,0	0,006	do.
4	1,0	0,007	Nach 3 Tagen tot
5	1,0	0,0075	Nach 5 Tagen tot
6	1,0	0,008	Nach 24 Stunden starke Schwellung, Spuren von Hämorrhagien
7	1,0	0,0085	Nach 24 Stunden begrenzte Schwellung, keine Hämmorhagien
8	1,0	0,009	Nach 24 Stunden glatt
9	1,0	0,0095	do. do.
10	1,0	0,01	do. do.
11	1,0	0,0105	Glatt
12	1,0	0,011	do.
13	1,0	0,013	do.

*) Es soll deshalb über diesen Gegenstand auch an dieser Stelle ausführlicher berichtet werden.

1	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,004 \text{ Serum}}{100}$	Starke Schwellung, Hämorrhagien
2	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,005 \text{ Serum}}{100}$	do. do.
3	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,006 \text{ Serum}}{100}$	Starke Schwellung
4	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,007 \text{ Serum}}{100}$	do. do.
5	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,0075 \text{ Serum}}{100}$	Sehr geringe Schwellung
6	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,008 \text{ Serum}}{100}$	Geringe Schwellung
7	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,0085 \text{ Serum}}{100}$	Nach 24 Stunden fast glatt
8	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,009 \text{ Serum}}{100}$	Nach 24 Stunden kleines Infiltrat
9	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,0095 \text{ Serum}}{100}$	Nach 24 Stunden glatt
10	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,01 \text{ Serum}}{100}$	do. do.
11	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,0105 \text{ Serum}}{100}$	Glatt
12	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,011 \text{ Serum}}{100}$	do.
13	$\frac{1,0 \text{ Giftl.} + 0,013 \text{ Serum}}{100}$	do.

Wir unterscheiden demnach:

1. Übertoxingemische = solche, welche beträchtliche Überschüsse von Gift enthielten.
2. Toxingemische = solche, die nur geringe Überschüsse von Gift enthielten.
3. „Toxon"gemische = solche, deren Injektion nur Schwellungen hervorrief.
4. Glattgemische = solche, die der Lo Dosis entsprechen.
5. Überserumgemische = solche, die beträchtliche Überschüsse von Antitoxin enthielten.

Diese verschiedenen Gemische wurden nun zum Teil frisch, zum Teil nach kürzerem oder längerem Lagern, zum Teil nach mehrstündigem Erhitzen auf 60° mit Serum bzw. Toxinlösung austitriert.

Als Beispiel einer solchen Versuchsreihe bringen wir nachfolgende Tabellen aus unserer Arbeit (l. c.).

Versuch IV. Giftlösung J*).

(8 Tage gegoren, 6 Tage vor der Filtration in der Kälte aufbewahrt.)

1. Vorversuch am 1. Dezember 1903 (zur approximativen Bestimmung des Giftwertes).

Nr.	Giftlösg.	Serum (400)	
1	1,0	0,005	Nach 24 Stunden tot
2	1,0	0,0075	Nach 48 Stunden tot
3	1,0	0,01	Glatt
4	1,0	0,0125	do.

*) In allen folgenden Versuchen wurden Meerschweinchen im Gewichte von 250 g verwendet.

2. Vorversuch am 2. Dezember 1903 (zur genauen Bestimmung des Giftwertes).

Nr.	Giftlösg.	Serum (400)		
1	1,0	0,0048	Nach 24 Stunden tot	
2	1,0	0,0054	do. do.	
3	1,0	0,0058	do. do.	
4	1,0	0,0063	do. do.	
5	1,0	0,0067	Nach 28 Stunden tot	
6	1,0	0,007	Nach 24 Stunden tot	
7	1,0	0,0073	Nach 5 Tagen tot	
8	1,0	0,0076	Nach 3 Tagen tot	
9	1,0	0,0079	Nach 24 Stunden ziemlich starke Schwellung	Toxonzone
10	1,0	0,0082	Nach 24 Stunden mäßige Schwellung	$\frac{0,9}{7,6}$ = ca. $\frac{1}{8\cdot5}$
11	1,0	0,0085	Nach 24 Stund. Spuren von Infiltrat	
12	1,0	0,0088	Glatt	
13	1,0	0,0091	do.	
14	1,0	0,0094	do.	
15	1,0	0,0097	do.	
16	1,0	0,010	do.	

Am 2. Dezember 1903 werden von der Giftlösung J 4 Gemische hergestellt („Isch") und in der Kälte aufbewahrt.

I (Toxingemisch) = zu 100 ccm J — 0,73 ccm Serum (400fach).

II (Glattgemisch) = zu 100 ccm J — 0,90 ccm Serum.

III (Überserumgemisch) = zu 100 ccm J — 2,72 ccm Serum.

IV (Übertoxingemisch) = zu 100 ccm J — 0,20 ccm Serum.

24 Stunden nach der Herstellung wird von jedem Gemisch eine Portion mit Giftlösung J bzw. mit Serum titriert. Ebenso wird der Wirkungswert derselben (für J) nach dreistündigem Erwärmen auf 60° C geprüft.

Versuch V. Toxingemisch „Isch".

Nr.	Nicht erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	—	Nach 3 Tagen tot
2	1,0	0,02	Nach 24 Stunden tot
3	1,0	0,05	do. do.
4	1,0	0,1	do. do.

Nr.	Erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	—	Glatt
2	1,0	0,1	do.
3	1,0	0,2	Mäßige Schwellung
4	1,0	0,25	Nach 6 Tagen tot
5	1,0	0,3	Nach 2 Tagen tot
6	1,0	0,4	Nach 24 Stunden tot

Kontroll-Eichung von J.

Nr.	Giftlösung J	Serum (400)	
1	1,0	0,005	Nach 24 Stunden tot
2	1,0	0,0055	do. do.
3	1,0	0,0060	do. do.
4	1,0	0,0065	Nach 48 Stunden tot
5	1,0	0,0070	Nach 4 Tagen tot

Aus dem Versuche ergibt sich, daß die tödliche Wirkung des Gemisches beim Lagern innerhalb 24 Stunden erhalten blieb, und daß durch Erhitzen des Gemisches ca. $^1/_4$ der implizierten Antitoxinmenge frei wurde. (0,25 : 1,0 = 1 : 4.)

Versuch VI. Glattgemisch „Isch".

Nr.	Nicht erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,1	Nach 24 Stunden tot
2	1,0	0,15	do. do.
3	1,0	0,2	do. do.
4	1,0	0,25	do. do.

Nr.	Erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	—	Glatt
2	1,0	0,1	do.
3	1,0	0,2	do.
4	1,0	0,3	Nach 4 Tagen tot
5	1,0	0,35	Nach 48 Stunden tot
6	1,0	0,4	Nach 24 Stunden tot
7	1,0	0,5	do. do.

Nach dem Erwärmen des Gemisches war demnach $\frac{1}{4,1}$ der implizierten Antitoxinmenge frei (0,3 : x = 1,0 : 0,0073; x = 0,00219; 9 : 2,19 = 4,1).

Bemerkenswert ist weiter, daß das nicht erwärmte Glattgemisch (nach 24stündigem Lagern) durch 0,1 ccm J bereits tödlich wurde, obwohl es seinem Antitoxingehalte entsprechend (0,009—0,0076 = 0,0014 Serum) im frischen Zustande 0,19 ccm J hätten binden können.

Versuch VII. Überserumgemisch „Isch".

Nr.	Nicht erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,5	Nach 48 Stunden tot
2	1,0	1,0	Nach 24 Stunden tot
3	1,0	1,5	do. do.
4	1,0	2,0	do. do.
5	1,0	2,5	do. do.
6	1,0	3,0	do. do.
7	1,0	3,5	do. do.

Nr.	Erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,5	Nach 24 Stunden minimale Schwellung
2	1,0	1,0	Nach 24 Stunden tot
3	1,0	1,5	do. do.
4	1,0	2,0	do. do.
5	1,0	2,5	do. do.
6	1,0	3,0	do. do.
7	1,0	3,5	do. do.

Aus der Titrierung des nicht erwärmten Gemisches ist zu ersehen, daß 1 ccm des vierfachen Überserumgemisches nach 24stündigem Lagern 0,5 ccm einer Giftlösung nicht zu binden vermochte, für die pro ccm 0,0076 ccm Serum ausreichten. Vom überschüssigen Antitoxin des Gemisches (0,0272—0,0076 = 0,0196 ccm Serum) ist offenbar der größte Teil, mindestens 0,0158 ccm Serum (also einer Menge, die an sich fast 2 ccm J glatt zu binden imstande wäre, entsprechend), beim Lagern in Bindung getreten.

Diese Bindung ist jedenfalls zum Teil eine feste (thermostabile), da auch das erhitzte gelagerte Überserumgemisch pro ccm (statt 0,0196 ccm) nur eine Antitoxinmenge, die etwa 0,0070 ccm Serum entspricht, durch Titration nachweisbar enthält.

Versuch VIII. Übertoxingemisch „Isch".

Nr.	Nicht erwärmtes Gemisch	Serum (400)	
1	1,0	0,003	Nach 16 Stunden geringe Schwellung, 6 Stunden später starke Schwellung, Spuren von Hämorrhagien, nach 48 Stunden tot
2	1,0	0,0036	Nach 16 Stunden fast glatt, 6 Stunden später Schwellung, nach 4 Tagen tot
3	1,0	0,0043	Fast glatt
4	1,0	0,0048	Glatt
5	1,0	0,0053	do.
6	1,0	0,0058	do.

Nr.	Erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	—	Glatt
2	1,0	0,027	do.
3	1.0	0,054	do.
4	1,0	0,067	do.
5	1,0	0,081	do.
6	1,0	0,108	Nach 24 Stunden geringe Schwellung, Hämorrhagien, nach 48 Stunden Schwellung größer, nach 3 Tagen glatt

Die Titrierung des nicht erhitzten, gelagerten Übertoxingemisches ergibt, daß nach 24stündigem Lagern ein wesentlicher Anteil des frei titrierbaren Toxins verschwunden ist, indem 1 ccm des Gemisches bereits mit 0,0043 ccm Serum versetzt, „fast glatt" wurde,

während erwartungsgemäß hierfür 0,008 — 0,002 = 0,006 ccm Serum nötig gewesen wären. Der auffällige Umstand, daß Tier 1 und 2 erst spät erkrankten und in 2—4 Tagen eingingen, weist darauf hin daß im injizierten Gemisch nachträglich (im Tierkörper) eine Alteration der Bindungsverhältnisse stattgefunden hat. Das erhitzte Übertoxingemisch, das nicht bis L+ titriert wurde, bindet jedenfalls mehr als 0,108 ccm J, das ist eine Menge, zu deren Bindung ungefähr 0,00078 ccm Serum nötig wären; ergo ist durch das Erhitzen mehr als $\frac{0{,}00078}{0{,}002}$ = mehr als $^1/_3$ des implizierten Antitoxins (wahrscheinlich wesentlich mehr) frei geworden.

Versuch IX. Übertoxingemisch „Isch“.

Eine andere Portion des Übertoxingemisches wird 24 Stunden später (4. Dezember) neuerdings 3 Stunden auf 60° C erwärmt und mit J titriert.

Nr.	Erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,1	Nach 30 Stunden tot
2	1,0	0,13	Nach 24 Stunden tot
3	1,0	0,16	do.
4	1,0	0,20	do.
5	1,0	0.24	do.
6	1,0	0,27	do.

Kontrolleichung von J (4. Dezember 1903).

Nr.	Giftlösung J	Serum (400)	
1	1,0	0,0055	Nach 24 Stunden tot
2	1,0	0,0065	do.

Beim Erhitzen des zwei Tage gelagerten Gemisches wurde demnach weniger Antitoxin frei als in Versuch VIII.

Versuch X. Übertoxingemisch „Isch“. 5 Tage gelagert.

Eine Portion auf 60° C 3 Stunden erwärmt.

Nr.	Nicht erwärmtes Gemisch	Serum (400)	
1	1,0	0,0025	Glatt
2	1,0	0,0034	do.
3	1,0	0,0043	do.
4*)	1,0	0,0043	do.
5	1,0	0,0048	do.

*) Gemisch plus Serum 18 Stunden gelagert.

Nr.	Erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,03	Glatt
2	1,0	0,05	do.
3	1,0	0,065	do.
4	1,0	0,08	Sehr kleine Schwellung, nach 48 Stunden Schwellung größer
5	1,0	0,10	Nach 48 Stunden tot
6	1,0	0,10	Nach 4 Tagen tot
7	1,0	0,15	Nach 24 Stunden tot
8	1,0	0,2	Nach 40 Stunden tot

Eichung von J.

Nr.	Giftlösung J	Serum (400)	
1	1,0	0,0055	Nach 16 Stunden tot
2	1,0	0,0060	Nach 24 Stunden tot
3	1,0	0,0065	do.
4	1,0	0,007	Nach 48 Stunden tot

Das fünf Tage gelagerte Übertoxingemisch hat demnach weiter von seinem Toxinüberschuß eingebüßt, indem jetzt bereits 0,0025 ccm Serum zur glatten Neutralisation von 1 ccm Gemisch hinreichten.

Die Titrierung des erhitzten Gemisches zeigt, daß beim Erhitzen jetzt weniger Antitoxin frei wird als vor vier Tagen.

Versuch XI. Überserumgemisch „Isch". (5 Tage gelagert.)

Nr.	Nicht erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,05	Nach 24 Stunden glatt
2	1,0	0,15	do.
3	1,0	0,3	do.
4	1,0	1,0	Nach 24 Stunden tot
5*)	1,0	1,0	do.

Die Bindungsverhältnisse zeigen gegenüber dem Befunde vor vier Tagen kaum eine Änderung, indem vom Gemisch 0,3 ccm J gebunden wurden.

*) Gemisch plus Giftlösung 19 Stunden gelagert.

Versuch XII. Überserumgemisch „Isch". (9 Tage gelagert.)
Eine Probe wird $2^3/_4$ Stunden auf 60° C erwärmt und die Titrierung des erwärmten und nicht erwärmten Gemisches mit der Giftlösung J vorgenommen.

Nr.	Nicht erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,25	Glatt
2	1,0	0,35	Nach 24 Stunden glatt, nach 3 Tagen tot
3	1,0	0,4	Nach 24 Stunden nur Infiltrat (!), nach 3 Tagen tot (hämorrhagischer Infarkt des Duodenums)
4	1,0	0,46	Nach 24 Stunden leichte Schwellung (!), nach 5 Tagen tot
5	1,0	0,5	Nach 24 Stunden diffusse mäßige Schwellung, nach 48 Stunden tot
6	1,0	0,55	Nach 24 Stunden ziemlich starke Schwellung, nach 48 Stunden tot

Nr.	Erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,45	Glatt
2	1,0	0,55	Fast glatt
3	1,0	0,65	Glatt
4	1,0	0,75	Schwellung
5	1,0	0,85	Nach 24 Stunden Schwellung, nach 4 Tagen tot (enormer Ascites)
6	1,0	0,95	Nach 48 Stunden tot

Kontrolleichung von J.

Nr.	Giftlösung J	Serum (400)	
1	1,0	0,004	Nach 24 Stunden tot
2	1,0	0,005	do.
3	1,0	0,0055	do.
4	1,0	0,006	do.
5	1,0	0,006	do.
6	1,0	0,0065	Nach 3 Tagen tot
7	1,0	0,007	Nach 48 Stunden tot

Die Titrierung des nicht erwärmten Gemisches bietet die bemerkenswerte Erscheinung, daß die Tiere 2 und 3, die keine besonderen Lokalerscheinungen aufwiesen, nach drei Tagen an der Giftwirkung (Lungenödem, Darmblutungen) zugrunde gingen. Auch hier mußte demnach ein Teil des an das Antitoxin gebundenen Giftes nachträglich im Tiere dissoziiert sein. Hält man sich an die lokalen Veränderungen (bzw. das Verhalten der Tiere nach 24—48 Stunden), so imponieren die Bindungsverhältnisse von Toxin und Antitoxin im Gemisch als gleich mit den in den früheren Versuchen beobachteten.

Dies gilt ebenso vom erwärmten Gemisch.

Versuch XIII. Am 11. Dezember 1903 wird das Toxingemisch „Isch", nunmehr 9 Tage gelagert, 2 Stunden auf 60° C erwärmt und zum Teil sofort, zum Teil 20 Stunden später mit der Giftlösung J titriert [1 ccm J + 0,0065 ccm Serum = L+].

Sofort titriert.

Nr.	Erwärmtes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,15	Glatt
2	1,0	0,20	Kein Infiltrat
3	1,0	0,25	Leichte Schwellung
4	1,0	0,30	Starke Schwellung, ausgedehnte Hämorrhagien
5	1,0	0,35	Nach 30 Stunden tot

Nach 24 Stunden titriert.

Nr.	Erhitztes Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,15	Glatt
2	1,0	0,20	Infiltrat
3	1,0	0,25	Beträchtliche Schwellung
4	1,0	0,30	Starke Schwellung, reichliche Hämmorrhagien
5	1,0	0,35	Nach 24 Stundon tot

Das neun Tage gelagerte Toxingemisch, erwärmt und einerseits sofort, andererseits 19 Stunden später titriert, zeigt gleiches Verhalten.

Auffallend ist bis zu einem gewissen Grade, daß beim Erhitzen des Gemisches jetzt mehr Antitoxin frei wird $\left(\frac{3,25}{1}\right)$ als bei der gleichen Behandlung des Gemisches vor acht Tagen (Toxingemisch! s. w. u.).

Versuch XIV. Frisch hergestelltes Überserumgemisch „Ischl". Durch Versetzen von 10 ccm der Giftlösung J mit 0,27 ccm 400fachen Normalserums bereitet, wird sofort nach der Herstellung und eine Stunde nachher mit J titriert [2 Port.] 8. Dezember 1903.

Sofort titriert.

Nr.	Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,5	Nach 24 Stunden glatt
2	1,0	1,0	do.
3	1,0	2,0	Nach 24 Stunden tot
4	1,0	3,0	Nach 7 Stunden tot

Nach 1 Stunde titriert.

Nr.	Gemisch	Giftlösung J	
1	1,0	0,5	Nach 24 Stunden glatt
2	1,0	1,0	Nach 24 Stunden tot
3	1,0	2,0	Nach 8 Stunden tot
4	1,0	3,0	do.

Kontrolleichung von J.

Nr.	Giftlösung	Serum (400)	
1	1,0	0,007	Nach 3 Tagen tot
2	1,0	0,0073	Nach 5 Tagen tot

Der Versuch zeigt, daß ein frisch hergestelltes Überserumgemisch, welches pro 1,0 ccm Giftlösung statt etwa 0,0073 ccm 400faches Serum, 0,027 ccm enthält (Überschuß von 0,0197 ccm Serum), bei sofortigem Rücktitrieren bereits durch 2 ccm der Giftlösung tödlich wirksam wird, obwohl es entsprechend seiner Antitoxinmenge fast 3 ccm derselben neutralisieren sollte.

Nach einer Stunde Lagerns genügt bereits ein Zusatz von 1 ccm J zu 1 ccm Gemisch, um die tödliche Wirkung desselben hervorzurufen. Der Versuch zeigt, wie rasch sich in solchen Überserumgemischen überschüssiges Antitoxin an das bereits gebundene Toxin kettet.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser auch auf andere Rauschbrand-Giftlösungen*) ausgedehnten Versuche lassen sich in Kürze folgendermaßen zusammenfassen:

1. Konzentrierte Gemische der L+ — L0 Distanz (Gemische mit „Toxon"-Erscheinungen) rufen, unmittelbar nach ihrer Herstellung injiziert, die gleichen Veränderungen hervor, wie nach mehrtägigem Lagern.

2. Frisch hergestellte Glattgemische werden durch kleinste Giftmengen giftig, brauchen jedoch zur Herbeiführung von tödlicher Wirkung einen Zusatz von Multiplis des D.L.M. Gift.

3. Überserumgemische enthalten sofort nach der Herstellung nur einen verhältnismäßig kleinen Teil des überschüssig zugesetzten Serums titrierbar; die Bindung dieses überschüssigen Antitoxins schreitet beim Lagern rasch vor**).

4. Übertoxingemische enthalten noch nach mehreren Stunden den gesamten Toxinüberschuß titrierbar.

5. Glattgemische und Gemische mit geringem Toxinüberschuß (Gemische der L+ — L0 Distanz) werden durch Erwärmen regelmäßig so verändert, daß $^1/_5$—$^1/_4$ der Gesamtantitoxinmenge sich als neuerlich titrierbar erweist. Überserumgemische gewinnen beim Erhitzen je nach der Menge des überschüssigen Antitoxins wenig oder gar keine Antitoxinwirkung. In frischen Übertoxingemischen wird im Gegensatz hierzu beim Erhitzen fast das ganze Antitoxin frei.

Aus den letzterwähnten Tatsachen geht hervor, daß in Übertoxin- und Überserumgemischen Toxin und Antitoxin sich in ganz verschiedener Bindung befinden müssen, derart, daß in einem Falle das implizierte Toxin zum größten Teil gerade so wie freies Toxin durch Erwärmen

*) Bei anderen Giftlösungen waren die Eigentümlichkeiten namentlich der Übertoxin- und Überserumgemische noch prägnanter hervorgetreten.

**) Diese Beobachtung, die wir nach DANYSZ gleichzeitig und unabhängig von v. DUNGERN, der dieselbe Erscheinung bei Diphtheriegift-Gegengiftgemischen feststellte, machten, wird seitdem von der EHRLICHschen Schule schlechtweg als DANYSZ-DUNGERNsches Phänomen beschrieben.

rasch zerstört wird, während im anderen Falle das implizierte Toxin offenbar durch festere Bindung an Antitoxin hitzebeständig geworden ist.

Auf Grund dieses auffallenden Befundes kamen wir zum Schluß, daß die Grundlage der MADSENschen Berechnungen für das Diphtheriegift, wonach die Toxin-Antitoxinmoleküle stets aus einem Molekül Toxin und einem Molekül Antitoxin bestehen sollen, anfechtbar sei, indem die von uns erhobenen Tatsachen im Sinne BORDETS dafür sprechen, daß es toxinreiche Antitoxin-Toxinmoleküle und toxinarme Antitoxin-Toxinmoleküle gebe, von denen die erstgenannten hitzebeständig seien, während die an zweiter Stelle genannten durch Hitze verändert würden.

Es muß nun freilich fraglich bleiben, ob die BORDETsche Anschauung im einzelnen zu Recht besteht oder ob es sich bei der Verbindung von Toxin und Antitoxin um Aggregate von Körpern kolloidaler Natur handelt.

Im Wesen ändert aber diese Auffassung nichts an der aufklärenden Rolle, welche den vorgenannten Experimenten über die Beziehungen von Toxin und Antitoxin zukommt. Sie zeigten uns, daß es bei der Natur dieser Körper ebenso verfehlt ist, jede Erscheinung durch die Annahme eines besonderen Stoffes zu erklären (EHRLICH), wie es auch nicht angeht, ohne zureichende Kenntnis des molekularen Aufbaues und der Natur dieser Körper, unter Einführung von Konstanten, die aus den mehrdeutigen Ergebnissen von Versuchen abgeleitet werden, Dissoziationsgleichungen aufzustellen (MADSEN).

Hiervon abgesehen haben freilich MADSEN und ARRHENIUS mit der Behauptung, daß es sich bei Toxin und Antitoxin um Körper mit schwacher gegenseitiger Affinität handelt, vollkommen recht.

Eine weitere Stütze unserer Anschauungen über die Beziehungen von Gift und Gegengift brachten dann die zahlreichen Versuche, Tiere durch Injektion von Gemischen gegen das Toxin zu immunisieren.

Während es uns anfangs leicht gelang, Rinder und Schafe durch Injektion von Gemischen, die Serum im Überschuß enthielten, giftfest zu machen, stieß die Immunisierung der Meerschweinchen auf große Hindernisse. Wiederholte Injektion von kleinen Mengen Toxinlösung führt, wie früher erwähnt, bei diesen Tieren nicht zur Giftfestigung, sondern im Gegenteil zu Giftüberempfindlichkeit. Erheblich überkompensierte Gemische erzeugen zwar keine Giftüberempfindlichkeit, ebensowenig aber Immunität. Um so auffallender war es uns, als wir feststellen konnten, daß Meerschweinchen, die mit Gemischen der $L+ - L0$ Distanz behandelt waren, mit einem Schlag einen hohen Grad von aktiver Immunität erwarben, derart, daß sie etwa 14 Tage später die Injektion der vielfachen (bis 300fachen) Dosis letalis min. Toxin überstanden.

Im allgemeinen zeigte sich, daß die Gemische umso besser immunisieren, je näher sie der $L+$ stehen.

Dies kam besonders in solchen Fällen zum Ausdruck, wo wir die von einer Aichungsreihe überlebenden Tiere nach mehreren Wochen mit Multiplis der D.L. Min. behandelten. Nachstehende Tabelle gibt hiervon ein gutes Bild.

Versuch XV. Zehn vorbehandelten Meerschweinchen aus einer Aichungsreihe*) wird je 0,1 ccm einer 3,3fachen Normalgiftlösung injiziert. (10. November 1903.)

Nr.	Datum der Vorbehandlung	Nr.	Art der Vorbehandlung	Befund nach Injektion von 0,1 ccm der 3,3fachen Normal-Giftlösung.
	1903			
1	16. Okt.	7	Toxon-gemische	Nach 48 Stunden glatt
2	16. „	8		do.
3	16. „	9		do.
4	16. „	10		do. glatt, (nach 8 Tagen tot)
5	16. „	11		Nach 48 Stunden sehr starke Schwellung
6	16. „	12		Nach 48 Stunden starke Schwellung
7	16. „	13	Glatt- bzw. Überserum-gemische	Nach 48 Stunden mäßige Schwellung
8	16. „	14		Nach 48 Stunden glatt (nach 8 Tagen tot)
9	16. „	15		Starke Schwellung, nach 3 Tagen tot
10	16. „	16		Nach 48 Stunden starke Schwellung

Eine einfache Methode der Immunisierung gegen das Gift besteht in folgendem.

Übertoxingemische verlieren beim längeren Lagern ihre Giftigkeit völlig, sie können aber ebenso wie gelagerte Glattgemische durch ganz geringe Mengen Gift so weit „aktiviert" werden, daß sie Schwellungen hervorrufen. Die Injektion dieser aktivierten gelagerten Übertoxingemische führt nun gefahrlos und mit Sicherheit zum Entstehen einer Grundimmunität.

Gewöhnlich zeigt sich, daß das Blut der in der einen oder anderen Weise vorbehandelten Meerschweinchen trotz eventuell vorhandener hoher Giftfestigkeit der Tiere arm an Antitoxin ist.

Injiziert man aber den Meerschweinchen noch 1—2mal größere Mengen Gift, das sie nach der einmaligen Behandlung mit aktivierten Gemischen gut vertragen, so gelingt es regelmäßig, hochwirksames antitoxisches Meerschweinchenserum zu gewinnen (bis 400fach Normal).

Die theoretische Bedeutung der vorerwähnten Immunisierung mit Gemischen liegt wohl darin, daß sie ebenso wie die oben erwähnten Versuche, bei welchen gelagerte und erhitzte Gemische auf ihren Bindungswert untersucht wurden, zeigen, daß in den Gemischen Toxin und Antitoxin in sehr verschieden fester Weise, je nach dem Mengenverhältnis von Toxin und Antitoxin, gebunden sind.

Die physiologische Wirkung des locker gebundenen Giftes ist aber offenbar eine wesentlich andere als die des freien. Diese Vermutung gewinnt weiterhin durch folgendes an Wahrscheinlichkeit.

Kaninchen, deren Empfindlichkeit gegen freies Gift eine sehr gleichmäßige ist, verhalten sich individuell außerordentlich verschieden gegen Übertoxingemische. Wir konnten gelegentlich beobachten, daß Kanin-

*) Die Tiere waren damals mit Gemischen behandelt worden, die aus 1,0 ccm eines 1,2fachen Normal-Giftes (= 120 tödl. Dosen) und steigenden Mengen 400fach antitoxischen Serums hergestellt worden waren.

chen die Injektion eines Übertoxingemisches, das einen Überschuß von 50 tödlichen (Kaninchen-) Dosen enthielt, anstandslos vertrugen, während andere auf Injektion von Übertoxingemischen, die nur sehr wenig überschüssiges Gift enthielten, prompt eingingen. Was aber die oben erwähnte Möglichkeit einer Aktivierung von durch Lagern glatt gewordenen Gemischen durch Zugabe von kleinen Toxinmengen betrifft, so zeigt diese Tatsache, daß unter solchen Verhältnissen eine Verschiebung des Bindungsverhältnisses von Gift-Gegengift eintritt.

Unsere Stellungnahme gegenüber der Auffassung Madsens, der bekanntlich bereits vor Jahren beim Diphtheriegift eine Immunisierung mit Gemischen von Gift-Gegengift erzielte, möge in unserer Arbeit „Über die Beziehungen von Toxin und Antitoxin“ nachgelesen werden.

So glauben wir, das Wesentlichste aus unseren Versuchsresultaten, wenigstens soweit die prägnante Eigenart des Rauschbrandgiftes zum Ausdrucke kommt, wiedergegeben zu haben.

Einzelne Versuchsreihen, wie jene über die Wirkung präventiver Seruminjektionen führen wir nicht eigens an, da sie gar keine Besonderheiten aufweisen.

Die ungewöhnlich einfachen Verhältnisse, die die Aichung des Rauschbrandgiftes darbietet, scheinen uns den vorliegenden speziellen Fall ganz besonders geeignet zu machen, als Ausgangspunkt weiterer Studien zu dienen. Die eben erst erwähnte Beobachtung, daß die Hinzugabe einer oder weniger tödlichen Dosen Giftlösung in einem gelagerten Gift-Gegengiftgemisch die bereits stabilisierte Bindung in eine lockere umwandelt, verdiente vielleicht in erster Linie weiter verfolgt zu werden. Neue Argumente gegen die Lehre von der einheitlichen Toxin-Antitoxinverbindung werden da unschwer gewonnen werden können, vielleicht aber auch wichtige Aufschlüsse über die Natur der reagierenden Stoffe.

Literatur siehe Band I, pag 174.

X.

Antitoxine gegen Toxine des Choleravibrio und anderer Vibrionen.

Von

R. Kraus

Wien.

Wie in dem Kapitel über Toxine des Choleravibrio und Vibrionen gezeigt wurde, bildet der Choleravibrio und ihm nahe stehende Vibrionen sowie auch biologisch differente Vibrionen Gifte.

Die Arbeiten von Ransom, Metschnikoff, Roux und Salimbeni, Brau und Denier, Hahn, Macfadyen, Kraus und Pribram, bringen den unzweifelhaften Beweis, daß diesen Giften antigene Eigenschaften zukommen, daß sie im Organismus spezifische Antikörper hervorrufen. Durch diese Ermittelung sind diese Gifte als Toxine charakterisiert und es besteht demnach kein Zweifel mehr, daß auch Choleravibrionen, Toxine im Sinne der bekannten bakteriellen Toxine zu produzieren im Stande sind.

Eine weitere wichtige Tatsache konnte durch das systematische Studium der Vibrionengifte ermittelt werden, die einleitend hervorgehoben zu werden verdient. Das Antitoxin gewonnen mit El Tor-Toxin neutralisiert das Toxin der Saigoncholeravibrionen. Auch das Antitoxin des Vibrio Nasik, also eines Vibrio der biologisch different von den 6 El Tor-Stämmen ist, vermag das Toxin der 6 El Tor-Stämme zu neutralisieren. Es spricht dieser Befund in dem Sinne, daß wir es hier mit einer Erscheinung zu tun haben, die aus der Lehre von der Agglutination geläufig ist und die in dem sogenannten Mitagglutinin, Partialagglutinin ihren Ausdruck findet. Auch hier dürfen wir daran denken, daß den verschiedenen toxigenen Vibrionen neben dem artspezifischen Toxin noch Partialtoxine zukommen, die identisch mit solchen der verschiedenartigen Vibrionen sein dürften. Daraus läßt sich dann ohne weiteres auch die Neutralisationsfähigkeit eines Antitoxins einer bestimmten Vibrioart Toxinen anderer Vibrionen gegenüber erklären.

Antitoxin des Vibrio Cholerae.

I.

METSCHNIKOFF, ROUX und SALIMBENI sowie vorher RANSOM beschreiben zum erstenmal Antitoxin.

METSCHNIKOFF, ROUX und SALIMBENI haben mit dem Toxin Ziegen und Pferde behandelt. (Von Meerschweinchen, Kaninchen konnten sie kein Antitoxin gewinnen. Auf die Injektion von Toxin kommt es zur Temperatursteigerung bis 40°. Bei Pferden kommt es auch trotz längerer Immunisierung zur Temperatursteigerung, die 1 Stunde nach der Injektion auftritt und nach 8—12 Stunden das Maximum erreicht. Lokal tritt ein Ödem auf, welches 5—6 Tage andauert. Nach 6 Monaten konnten 200 ccm Toxin dem Pferd subkutan auf einmal injiziert werden.)

Nach 3monatlicher Immunisierung war das Serum in Mengen von 3 ccm gegen die $1^1/_2$fach letale Dosis wirksam. Nach 6 Monaten hat 1 ccm die 4fach letale Dosis neutralisiert. $^1/_{150}$ ccm dieses antitoxischen Serums vermag auch gegen die 1fach letale Dosis virulenter Kultur zu schützen.

Interessant ist, daß RANSOMS Serum sich auch gegen das Toxin von METSCHNIKOFF, ROUX und SALIMBENI als wirksam erwiesen hatte, dagegen war das Serum von PFEIFFER, welches einen hohen bakteriolytischen Titer hatte, ganz unwirksam.

Die Immunisierung mit lebenden oder abgetödteten Choleravibrionen ist nach METSCHNIKOFF, ROUX und SALIMBENI nicht identisch mit der mit Toxinen. METSCHNIKOFF, ROUX und SALIMBENI nahmen zwar an, daß der Choleravibrio im Leib Toxine enthält, diese sollen aber bei der Immunisierung mit Bakterien durch die Aufnahme der Bakterien in Phagocyten unwirksam gemacht werden. Das Serum, gewonnen mit Bakterien, wirke demnach bloß antiinfektiös Phagocytose befördernd und nicht antitoxisch.

Wie aus den Versuchen von BRAU und DENIER und unseren mit Serum, gewonnen mit Agarkulturen, hervorgehen wird dürfte diese Auffassung nicht das richtige treffen. Es wird bei der Immunisierung hauptsächlich darauf ankommen, ob man einen toxigenen Stamm verwendet oder Stämme, die wenig oder gar kein Toxin produzieren. Mit Agarkulturen toxinproduzierender Vibrionen wird antitoxisches Serum sowie auch bakteriolytisches agglutinierendes gewonnen, sowie mit den Filtraten der Bouillonkulturen. Mit Agarkulturen nicht toxigener oder schwach toxigener Choleravibrionen gewinnt man hauptsächlich Immunkörper, die antiinfektiös wirken (bakteriolytisch, bakteriotrop) und wenig antitoxisch. Vielleicht kommt es aber auf die Art der Einverleibung an, ob subkutan oder intravenös das Antigen injiziert wird. Es dürften möglicherweise für die Choleravibrionen ähnliches gelten wie für die Gifte der Typhus-Pestbazillen. (Siehe v. STENITZER: Über Typhusantitoxin.)

Durch die Versuche VAN ERMENGEMS ist sicher dargetan, daß PFEIFFERS bakteriolytisches Serum auch gegen die intestinale Infektion nicht schützt.

METSCHNIKOFF, ROUX und SALIMBENI zeigen, daß das Serum von PFEIFFER nicht imstande sei, gegen die intestinale Infektion zu schützen. Dagegen haben weitere Versuche mit ihrem antitoxischen Serum es wahrscheinlich gemacht, daß intestinal infizierte neu-

geborene Kaninchen durch präventive und gleichzeitige Injektion von Antitoxin geschützt werden können. Die folgende Tabelle gibt die Resultate der intestinalen Versuche von Metschnikoff, Roux und Salimbeni wieder.

	Behandelte Kaninchen		Kontrollen	
	Tod	Leben	Tod	Leben
Präventive Seruminjektion . .	12	15	31	6
Gleichzeitige Seruminjektion .	10	8	16	5
	22 49%	23 51%	47 81%	11 19%

Die von Brau und Denier gewonnenen Antitoxine müssen als Choleraantitoxine ohne weiteres anerkannt werden, da die Vibrionen, welche zur Giftdarstellung benutzt wurden, als Choleravibrionen biologisch charakterisiert sind. (Auch Brau und Denier finden, so wie Metschnikoff, Roux und Salimbeni, die Meerschweinchen zur aktiven Immunisierung ungeeignet. Es scheint, als ob Meerschweinchen gar kein Antitoxin zu produzieren imstande wären. Kaninchen sind offenbar nach den Versuchen von Brau und Denier ebenso ungeeignet zur Immunisierung. Leichter zu immunisieren sind Ziegen, die schon nach kurzer Zeit 100 ccm Toxin subkutan vertragen. Weniger empfiehlt sich die intravenöse Injektion, da nach einer Injektion von geringen Mengen Ziegen zugrunde gehen. Pferde sind für das Toxin noch empfindlicher als Ziegen.)

Das Serum vom immunisierten Pferd vermag in Mengen von $^1/_{50}$ ccm in vitro 2 letale Dosen nach einer halbstündigen Einwirkung zu neutralisieren, $^1/_{20}$ ccm neutralisiert 3, 1 ccm Serum vermag 4 letale Dosen unschädlich zu machen. Bei getrennter Injektion (Toxin subkutan, Serum peritoneal) kann man noch 2 Stunden nach der Giftinjektion Heilwirkungen nachweisen. Dieses Serum hat auch bakterizide, agglutinierende, präzipitierende Eigenschaften.

II.

Im folgenden sind eigene Erfahrungen wiedergegeben, die wir über die Neutralisation des Toxins der Choleravibrionen mittels Antitoxin gemacht haben.

Zunächst haben wir versucht, die Wirkung derjenigen Sera von Tieren zu prüfen, welche längere Zeit hindurch mit einem Choleravibrio Pfeiffer (Agar- und Bouillonkulturen) subkutan vorbehandelt wurden. Dieses Serum besitzt bakteriolytische, agglutinierende und präzipitierende Eigenschaften und vermag bis zu einem gewissen Grade auch das Toxin der Choleravibrionen (Saigon) zu neutralisieren.

Wenn auch der antitoxische Wert dieses Serums gering ist, geht aus den Versuchen und den Kontrollen mit heterologem Serum (Dysenterieserum) doch hervor, daß es neutralisierend auf das Toxin der Saigonvibrionen zu wirken vermag. Die gleichzeitige Prüfung dieses Serums auf das Toxin eines El Torvibrio ergab sowohl bei peritonealer als auch bei intravenöser Injektion des in vitro mit Toxin gemischten Serums ein negatives Resultat. Diese Sera

vermögen also das Toxin der spezifischen El Torvibrionen nicht zu neutralisieren.

Ein weiterer Versuch wurde mit Serum von einem Pferd (Kamee) durchgeführt, welches mit Toxin der Choleravibrionen Saigon vorbehandelt wurde. Im Ganzen erhielt das Pferd bis Mai 1907 subkutan 1451 ccm Saigontoxin. Das Serum dieses Pferdes vermag in Mengen von 0,5 bis 0,2 ccm die 1—2fach tödliche Dosis Saigontoxin zu neutralisieren. Im Gegensatz hierzu vermochten normale Sera oder heterologe Imunsera in Mengen von 1 ccm selbst nach einstündiger Einwirkung in vitro das Toxin nicht zu paralysieren.

Serum Pferd	Toxin und Serum gemischt peritoneal Meerschwein. 180 g	Heilversuch		Meerschweinch. 180 g	Resultat
		Toxin	Serum		
Diana	2 Tox.+0,5 S.	—	—	M. 24	lebt.
immunisiert mit Choleravibrio Pfeiffer	0,3 S.	—	—	„ 2	lebt.
Bouillonkultur	0,1 S.	—	—	„ 23	† in 5 Stunden.
Normales Pferdeserum	2 Tox.+1,0 S.	—	—	„ 40	† in 5 Stunden.
	0,5 S.				† in 5 Stunden.
	2 Toxin	—	—	„ 20	† in 5 Stunden.
		2 Toxin	n. 1 Stde. 2,0 Diana	„ 12	† in 24 Stunden.

Das mit Saigontoxin gewonnene Serum wurde außerdem auch auf Gifte von Choleravibrionen Rußland und Hamburg geprüft und als wirksam befunden. Das Serum vermag die Gifte dieser Vibrionen ebenso zu neutralisieren wie die der Saigontoxine. Die Neutralisationsversuche mit dem hier besprochenen Antitoxin gegenüber anderen Vibrionen lehren, daß die Gifte entfernt stehender Vibrionen (Nasik, nicht spez. El Torvibrionen) und sogar die Gifte der biologisch identischen 6 El Torvibrionen nicht neutralisiert werden. Umgekehrt vermögen aber Antitoxine der 6 El Torvibrionen die Choleratoxine zu paralysieren. Die Heilwirkung der Antitoxine hängt, wie unsere Heilversuche an Mäusen lehren, hauptsächlich von der Neutralisationsfähigkeit dieser dem Toxin gegenüber ab. Das mit Toxinen der Choleravibrionen gewonnene Antitoxin zeigt nur Heilwirkung, wenn Mäuse mit dem Toxin dieser Vibrionen vergiftet sind oder mit Choleravibrionen infiziert sind. In Heilversuchen, in welchen andere Vibrionen oder deren Toxine verwendet werden, versagen diese Sera. Im Gegensatz hiezu wirkt das, Antitoxin der spez. El Torvibrionen auch gegen die Choleraintoxikation und -Infektion.

Diese Sera, die mit Toxin der 6 El Torvibrionen vom Pferd gewonnen sind, neutralisieren demnach auch Toxine des Vibrio cholerae Saigon.

Auf diese Erscheinung der Neutralisation artverwandter Toxine durch ein andersartiges Antitoxin haben zuerst Kraus und Pribram aufmerksam gemacht. Wir werden noch Gelegenheit nehmen, diese Erscheinung des Näheren zu besprechen.

Diese Sera haben neben der toxinneutralisierenden Eigenschaft noch die Fähigkeit, lebende Choleravibrionen zu zerstören. Daß die

Heilversuche nach vorheriger Intoxikation ungünstige Resultate ergeben, dürfte hauptsächlich der Toxizität der Toxine und in der bisher verwendeten Tierart (Meerschweinchen) gelegen sein. Es wollte nicht gelingen, die $^1/_2$ Stunde vorher mit der 5fachen letalen Dosis infizierten oder mit der 1—2fach tödlichen Giftdosis vergifteten Meerscheinchen mit Multiplis der neutralisierenden Serumdosis am Leben zu erhalten. Erst durch die entsprechende Wahl eines weniger giftempfindlichen Versuchstieres gelang es, auch die heilende Eigenschaft des antitoxischen Choleraserums zu erweisen. Wie die Versuche ergaben, vermag das Serum noch nach einer Stunde die subkutan infizierten Mäuse in Mengen von 0,05 zu schützen und am Leben zu erhalten.

Pferd	Toxin + Serum gleichzeitig peritoneal Meerschweinchen	Heilversuche nach 1 Stunde		Meerschweinchen	Resultat
		Toxin	Serum		
Fine immunisiert mit El Tor	3 Toxin + 0,1 Ser. F.			76	lebt
Kontroll	3 „ + 0.3 Norm.-Ser.			80	† nach 8 Std.
	3 „			73	† „ 6 „
Kalif immunisiert mit El Tor	1,0 Toxin + 0,1 Ser.			143	lebt
	1 „ + 0,25 „			118	†
Kontroll	1 „ + 0,3 Norm.-Ser.			162	†
	1 „			138	†

Daß die von Macfadyen mittels der Gefriermethode gewonnenen endozellulären Gifte auch als Toxin anzusehen sind wurde, bereits erwähnt. Allerdings müssen wir bemerken, daß nach der Mitteilung Macfadyens nicht sicher gestellt ist, ob er mit einem sicheren Choleravibrio gearbeitet hat. Mit diesem Vorbehalt seien hier die Versuche über die Antiendotoxine Macfadyens angeführt.

Macfadyen hat Kaninchen und Ziegen immunisiert. Das Serum der vorbehandelten Kaninchen vermochte in Mengen von 0,5 ccm in vitro gemischt ($^1/_2$ Stunde bei 37°) die 10fach letale Dosis für Meerschweinchen seines Endotoxins zu neutralisieren. Die Ziegen wurden intravenös behandelt. Trotzdem, wie im Kapitel Toxin angeführt wurde, die Ziegen für das Toxin sehr empfindlich sind, konnte durch vorsichtige Dosierung doch eine aktive Immunisierung durchgeführt werden. Eine Ziege bekam jeden 7. Tag $^1/_{100}$, $^1/_{50}$, $^1/_{20}$, $^1/_{10}$ und $^1/_5$ ccm Toxin und hat die steigenden Dosen trotz deutlicher Reaktionen vertragen. 0,5 ccm dieses Serums neutralisiert in vitro die 8fach letale Dosis. (Normales Ziegenserum schützt nicht gegen die 2fach letale Dosis.) Eine zweite Ziege bekam in wöchentlichen Intervallen $^1/_{100}$, $^1/_{100}$, $^1/_{50}$, $^1/_{50}$, $^1/_{50}$, $^1/_{30}$, $^1/_{30}$, $^1/_{20}$, $^1/_{20}$, $^1/_{20}$, $^1/_{15}$, $^1/_{15}$, $^1/_{12}$, $^1/_{12}$, $^1/_3$ ccm Toxin. Nach 4monatlicher Behandlung hat das Serum in Mengen $^1/_{500}$ ccm (0,002) in vitro die 3fach letale Giftdosis neutralisiert. Auch Hahn hat von einer Ziege, die mit Endotoxin durch 2 Monate vorbehandelt war, ein Serum gewonnen, welches in Mengen von 0,05 die 1fach letale Dosis in vitro neutralisiert. Mit dem Pleuraexudat der nach 7 Monaten zugrunde gegangenen Ziege konnte Hahn in Mengen von 0,025 ccm die tödliche Dosis in vitro un-

schädlich machen. Auch diese Versuche von HAHN, MACFADYEN und eigene lehren, daß man auch mit den endogenen Giften der Choleravibrionen giftneutralisierendes Serum (Antitoxin) gewinnen kann.

Antitoxin der El Torvibrionen.

(Choleravibrio GOTTSCHLICH.)

Den 6 El Torvibrionen, die E. GOTTSCHLICH in El Tor aus dem Darme von an Dysentrie verstorbenen Menschen gezüchtet und als Choleravibrio charakterisiert hatte, mußten wir auf Grund der von uns ermittelten neuen Eigenschaften (Haemotoxin, akut wirkendes Toxin) eine selbstständige Stellung einräumen und vom Choleravibrio abtrennen; deswegen werden auch die Antitoxine sowie die Toxine (I. Band) selbständig und nicht mit dem Choleraantitoxin abgehandelt. Die bei den El Torvibrionen nachgewiesenen Gifte (Blut und tödliche Gifte) müssen als Toxine anerkannt werden, denn, wie aus dem folgenden hervorgeht, gelingt es mit diesen Giften Tiere aktiv zu immunisieren und Antitoxine zu erzeugen.

Zur Immunisierung haben wir Ziegen, Pferde verwendet, denen entweder Bouillonkulturfiltrate (Toxin) sukutan oder Agarkulturen, oder Extrakte aus Agarkulturen injiziert werden. Die Ziegen lassen sich von der Subkutis aus, ebenso die Pferde ganz gut immunisieren. Man beginnt mit 0,5 bis 1 ccm Toxin und steigt in Intervallen von 6—8 Tagen. Dem Pferd Fine wurden im Ganzen 907 ccm Toxin subkutan innerhalb 10 Monaten injiziert. 5, 7, 10, 25, 30, 30, 40, 40, 30, 30, 20, 30, 40, 40, 40, 50, 50, 60, 60, 20, 20, 30, 40, 30 ccm bekam das Pferd in 6 bis 8tägigen Intervallen. Die Temperatur stieg gewöhnlich auf 38,8, 39 sogar 40,1 nach einigen Stunden nach der Injektion und ging nach 2 Tagen gewöhnlich zurück. Das Pferd Kalif wurde mit wässrigen Extrakten aus Agarkulturen des El Torvibrio V subkutan injiziert.

Die intravenöse Prüfung der Sera erfolgt in der Weise, daß das Serum sowohl auf das Toxin El Tor **in vitro** ausgewertet wird, als auch auf den **getrennten (kurativen)** Wert.

Bevor wir daran gingen, die spezifische Neutralisationsfähigkeit dieser Sera auf das El Tortoxin festzustellen, haben wir in einigen Versuchen normale Sera auf diese Eigenschaft geprüft. Tatsächlich enthält normales Ziegen- und Pferdeserum Substanzen, welche das akute Gift neutralisieren. Diese neutralisierende Wirkung tritt aber erst zutage, **wenn Serum und Gift gemischt ca. $^1/_2$ Stunde***) **bei 37°** gestanden sind. Injiziert man aber das Gemisch sofort, so gehen die Tiere ebenso akut zugrunde, wie auf das Gift allein.

Daß höhere Temperaturen und auch die Zeit bei der Einwirkung der Toxine, auf Antitoxin eine Rolle spielen, ist durch v. BEHRING, EHRLICH, MORGENROTH, MADSEN, MARTIN u. a. bekannt. Es ist ja möglich, daß das normale Antitoxin sich locker mit dem Toxin verbindet, wenn es kurze Zeit in vitro auf das Toxin eingewirkt hat und daß nach intravenöser Injektion im Organismus eine Sprengung erfolgt, die nicht zustande kommen kann, wenn das Serum ca. $^1/_2$ Stunde lang mit dem Toxin in Kontakt war. Daß ein derartiges Serum bei getrennter Injektion nicht imstande sein wird, das Toxin zu neutralisieren, ist a

*) Man braucht auch manchmal längere Zeit (4—18 Stunden).

priori anzunehmen und außerdem noch durch direkte Versuche bewiesen worden.

Mittels dieser Versuchsanordnung ließ sich feststellen, daß im Serum der mit Cholera Pfeiffer immunisierter Pferde (Bouillonkultur, Agarkultur) auch Antitoxin enthalten ist, welches sich aber ebenso verhält wie dasjenige normaler Pferde. Es bedarf einer $^1/_2$ stündigen Einwirkung des Serums (Diana, Edith), um El Tortoxin zu neutralisieren, bei kurzem Kontakt vermag 0,5—5 ccm das Serum das Toxin nicht unwirksam zu machen, dagegen wirken 0,1 bei $^1/_2$ stündigem Kontakt.

Ähnliches wie für normales Pferdeserum läßt sich auch für normales Ziegenserum feststellen. Demgegenüber besitzt das durch Immunisierung mit Filtraten von El Torbouillonkultur oder Extrakten aus Agarkultur gewonnene Serum die Eigenschaft, die Toxine der El Torvibrionen **nach kurzem Kontakt** und auch **bei getrennter Injektion im Organismus unwirksam zu machen.** Prüft man in systematischer Weise im Verlaufe der Immunisierung die Wirksamkeit des Serums, so kann man durch die verschiedene Prüfungsart (ob gemischt oder getrennt geprüft) Änderungen der Wirksamkeit des Serums konstatieren. Mittels dieser Art der Prüfung konnten Tatsachen erhoben werden, welche von prinzipieller Bedeutung für die therapeutische Anwendbarkeit der Antitoxine sein dürften. Es ließ sich folgendes feststellen:

1. Das Immunserum ist imstande, zum Unterschiede von normalem Serum, nach bereits kurzem Kontakt das Toxin zu neutralisieren, es vermag aber nicht bei getrennter gleichzeitiger Injektion selbst in viel größeren Mengen zu wirken.

2. Nach weiterer Immunisierung ist auch bei gleichzeitiger getrennter Wirkung das Serum ebenso wirksam, wie bei kurzer Kontaktwirkung in vitro.

3. Die Wirksamkeit eines Serums kann sich mit der Zeit derart ändern, daß ein bei getrennter Injektion sich als wirksam erwiesenes Serum diese Eigenschaft verliert und nur noch nach kurzer Kontaktwirkung wirkt. Diese Veränderung, die wir als einen sukzessiven Abbau, Rückkehr zum Normalserum ansehen dürfen, geht entweder im Organismus vor sich bei Tieren, die lange Zeit nicht mehr immunisiert werden oder schon geschädigt sind (Blutungen), und erfolgt auch außerhalb des Organismus in vitro.

Zur Illustration des eben gesagten seien hier Protokolle von immunisierten Ziegen und Pferden angeführt. Diese Ermittelungen gelten nur für die Prüfung der akuten Giftwirkung bei intravenöser Injektion an Kaninchen (600—800 g).

Bisher hat man allgemein bei der Prüfung der Antitoxine den kurativen Effekt eines Antitoxins nicht berücksichtigt, da man im Sinne Ehrlichs annahm, daß der kurative Effekt nur von der Menge der im Mischungswert nachgewiesenen Antitoxine abhängig sei. Nun hat bereits Roux, Martin und Momont, Cruveilhier darauf aufmerksam und durch Versuche wahrscheinlich gemacht, daß der nach Ehrlich in vitro gefundene Wert (präventive Wert) des Diphtherieantitoxins für die kurative Wirksamkeit des Serums nicht maßgebend sein dürfte. Niederwertige Diphtheriesera, wie Cruveilhier gezeigt hat, geben bei Heilversuchen eventuell bessere Resultate als hochwertige. Gleiche Verhältnisse konnten von mir und Doerr für das Dysenterieantitoxin nachgewiesen werden. Das Dysenterieantitoxin kann in vitro als neutralisierend sich erweisen, ohne

Serum	Toxin + Serum gemischt	Resultat	Toxin intravenös — getrennt injiz. — Serum intravenös	Resultat
Ziege immunisiert mit Toxin El Tor				
1. Aderlaß 17. IX.	1,0 Tox. + 0,5 Ser.	Kan. † in 10'	—	—
2. „ 2. XI.	1,0 „ + 0,5 „	Kan. lebt	1,0 Tox. getr. 0,5 Ser.	lebt
	1,0 „ + 0,1 „	† in 1 Std.	1 „ „ 0,1 „	† in 10'
	1,0 „ + 0,05 „	† in 10'		
3. „ 5. XII.	0,5 „ + 0,5 „	lebt	0,5 „ „ 0,5 „	lebt
	0,5 Tox. + 0,1 Ser.	lebt	0,5 Tox. getr. 0,1 Ser.	† in 30'
	0,5 Tox. + 0,05 Ser.	† in 1 Std.		
Pferd Fine immunisiert mit Toxin El Tor	0,5 Tox. + 0,5 Ser.	lebt	0,5 Tox. getr. 1,0 Ser.	† nach 24 Std.
I. Aderlaß 13. I.	0,5 „ + 0,1 „	lebt	0,5 „ „ 0,5 „	† nach 1 Std.
nach ca. 3 monatl. Injektion 127 ccm Toxin	0,5 „ + 0,05 „	lebt		
2. Aderlaß 17. II. 257 ccm Toxin	0,5 „ + 0,1 „	lebt	0,5 „ „ 0,5 „	lebt
	0,5 „ + 0,05 „	lebt	0,5 „ „ 0,2 „	† in 5'
6. Aderlaß 7. VIII. 767 ccm Toxin	1,0 „ + 0,2 „	† in einig. Std.		
	1 „ + 0,05 „	† in 5'		
Pferd Kalif immunisiert mit Agarkultur El Tor				
Aderlaß 18. IX.	1 Tox. + 0,05 Ser.	lebt	2,0 Tox. getr. 2,0 Ser.	† nach 24 Std.
„ 30. X.	1 „ + 0,1 „	lebt		
	1 „ + 0,05 „	† in 20'	1 „ „ 0,5 „	† in 5'
			1 „ „ 1,0 „	lebt

daß das Mehrfache dieser Dosis imstande wäre, bei gleichzeitiger getrennter intravenöser Injektion zu wirken. Andererseits können sich die Vitro-Werte mit den kurativen vollkommen decken. Jedenfalls sprechen diese am Dysenterieantitoxin und jetzt am El Torantitoxin erhobenen Befunde mit aller Sicherheit dafür, daß der Vitro-Wert nicht identisch sein muß mit dem getrennten oder kurativen Wert. Daraus ergibt sich natürlicherweise, daß diesen Tatsachen bei der Einführung der Antitoxine in die Praxis Rechnung getragen werden muß. Dysenteriesera, welche zu Heilzwecken dienen sollen, müssen im Tierversuch bei getrennter Injektion wirksam sein und nur solche Sera werden in den Handel gebracht*). Aus den hier mitgeteilten Versuchen dürfte sich Gleiches auch für die Choleraantitoxine resp. El Torantitoxin ergeben.

Wir haben ja bereits früher gezeigt, daß das El Torantitoxin auch das Toxin Saigon zu neutralisieren imstande ist, so daß möglicherweise bei der Einführung in die Praxis zu Heilzwecken bei menschlicher Cholera, diese im Experiment ermittelten Tatsachen nicht ohne Bedeutung werden dürften. Ja wie aus den vorausgegangenen

*) Auch für das Diphtherieantitoxin dürfte nach neueren Versuchen von mir und Schwoner (Centralbl. für Bakt. 1908) die von Roux aufgestellte Behauptung Geltung haben.

hervorgeht, ist das mit El Tortoxin gewonnene Antitoxin gegen Cholera-saigontoxin sowohl in vitro als auch in Heilversuchen wirksamer als die mit Saigontoxin erzeugten Antitoxine.

Die Prüfung der El Torantitoxine kann peritoneal auch an Meerschweinchen durchgeführt werden.

Serum „Kalif“ + Toxin peritoneal injiziert.

Serum	Toxin + Serum	Meerschweinchen	Resultat
Kalif vom 18. XII.	2 Toxin + 0,5 Serum	M. 131	lebt.
	2 „ + 0,1 „	„ 162	† in 24 Stunden.
	1 „ + 0,1 „	„ 143	lebt.
	1 „ + 0,05 „	„ 164	† in 24 Stunden.

Daß bei der intravenösen Applikation des Toxins, welche den akuten Tod der Tiere zur Folge hat, eine Heilwirkung nicht ermittelt werden kann, ist a priori verständlich. Man kann zeigen, daß das intravenös injizierte Antitoxin imstande ist, die letale Dosis des Toxins bei getrennter aber sofortiger intravenöser Injektion zu neutralisieren, nicht aber wenn Gift nur wenige Minuten vorher injiziert wurde. Wir hatten einmal ein abgeschwächtes Toxin in Händen, welches bei intravenöser Applikation in vier Stunden erst Kaninchen tötete. Mit diesem Gift wurden auch Heilversuche angestellt. 0,1 Serum vermochte 2,0 Toxin in vitro zu neutralisieren. Im Heilversuch, wobei die letale Giftmenge 10′ vorher intravenös injiziert wurde, gelang es aber nicht, mit 2,0 ccm Serum das Tier zu retten. Daß der kurativen Wirksamkeit des Antitoxins im Experiment auch bei Meerschweinchen, welchen Toxin peritoneal injiziert wird, sehr enge Grenzen gesetzt sind, geht aus folgendem hervor:

Serum	Toxin	Serum	Gift peritonal vorh.	Meerschweinch.	Resultat
Kalif von 30. X. .	3	1,0	15′	93	† in 24 Stunden.
0,3 vitro Wert . .		2,0		96	† in 48 Stunden.
	3	3	30′	57	† in 24 Stunden.
Kalif von 18. XII.	1	1	30′	167	† in 24 Stunden.
0,1 vitro Wert . .	1	3	30′	185	† nach 24 Stunden.
	1	4	30′	110	† in 24 Stunden.

Es zeigt sich, daß bereits nach kurzer Zeit 15′ und 30′ die 6 fach, 9 fach und sogar 40 fach neutralisierende Serumdosis nicht imstande war, die 1 fach bis 2 fach letale Dosis des peritoneal injizierten Toxins nachträglich zu neutralisieren vermag. (Nebenbei bemerkt sahen wir häufig, daß der Tod der Tiere in den Heilversuchen um 18—30 Stunden verzögert war. Die Kontrolltiere gingen in 8—10 Stunden zugrunde, wogegen die mit Serum behandelten erst nach 24 und 48 Stunden. Häufig sieht man bei diesen mit Serum behandelten Tieren Prolapse bis zu 5 cm entstehen. Bei vielen von diesen Tieren, die nach 48 Stunden zugrunde gehen, findet man dann bei der Obduktion blutige Koagula im Peritoneum, deren Ursache das Abbeißen oder Abreißen der Prolapse

ist. Der Enddarm fehlt bei diesen Tieren und das abgerissene Ende ragt frei in die Bauchhöhle. Daß dabei Gefäße abgerissen werden ist klar und die Tiere gehen infolgedessen an Verblutung zugrunde.)

Auch die Heilversuche an mit El Torvibrionen infizierten Meerschweinchen sind negativ ausgefallen. Es ist uns nicht gelungen mit dem wirksamen antitoxischen Serum Meerschweinchen[10]), welche mit der 2—4fach tödlich infektiösen Dosis $^1/_2$ Stunde vorher infiziert waren, selbst mit großen Serumdosen am Leben zu erhalten.

Erst bei Heranziehung von Mäusen, einer weniger giftempfindlichen Tierart als es offenbar das Meerschweinchen ist, haben wir in Heilversuchen die vorausgesetzten Resultate zu verzeichnen. Die Versuche an weißen Mäusen ausgeführt, haben gelehrt, daß das antitoxische Serum (Kalif) sowohl die mit Toxin vergifteten als auch die mit Kultur infizierten Mäuse noch nach 1 Stunde vor dem Tode zu schützen vermag. Die mit der 5fachen tödlichen Menge Gift peritoneal vergifteten Mäuse konnten noch mit 0,05 ccm Serum Kalif gerettet werden. Dagegen ist normales Serum und heterologes Serum (Dysenterie) und selbst antitoxisches Choleraserum (gewonnen mit Saigontoxin), nicht imstande gewesen, die Mengen von 0,5 ccm Mäuse vor dem Tode zu schützen. Gleichlautende Resultate konnten wir auch in Versuchen, in welchen lebende Kultur verwendet wurde, verzeichnen. Interessant ist, und mit den vorausgehenden Versuchen ganz im Einklang, die Tatsache, daß Serum (Kamee), antitoxisches Choleraserum (gewonnen mit Saigontoxin), welches im peritonealen Versuch gegenüber dem El Torvibrio noch in Mengen 0,05 gewirkt hatte, im Heilversuch vollständig versagte. 1 ccm dieses Serum war nicht imstande, infizierte Mäuse am Leben zu erhalten, was 0,05 ccm des Kalifserum vermag. Das Serum Kamee vermag das Toxin der El Torvibrionen nicht zu neutralisieren und wirkt blos antitoxisch auf Saigontoxin, dagegen bakteriolytisch auf Cholera- und auch auf El Torvibrionen. Trotz der bakteriolytischen Eigenschaft des Choleraserums dem El Torbibrio gegenüber gehen die infizierten Mäuse zugrunde, da eben das Serum die El Tortoxine nicht zu neutralisieren vermag. Wohl vermag aber, wie früher gezeigt wurde, dieses Serum gewonnen mit Saigontoxin im Heilversuch auch nach einer Stunde zu schützen, da es ja das entsprechende Saigontoxin neutralisieren kann.

Die Wirkung des El Torantitoxins ist insofern eine spezifische, als Toxine anderer Bakterien, wie des Diphtherie- und Dysenteriebazillus, gar nicht beeinflußt werden oder nicht anders als es dem normalen Serum zukommt. Dagegen läßt sich erweisen, daß das El Torantitoxin nicht nur die Toxine der 6 El Torstämme neutralisiert, sondern auch Toxine der Cholerastämme und artverwandter Vibrionen (Vibrio Nasik, nicht spezifische El Torvibrionen usw.).

Serum	Toxin	Serum	Kaninchen	Resultat
Ziege immunisiert	1,0 Elvers	0,5 Ser. V	189	lebt
mit Toxin El Tor V	1 „	—	104	† in 5'
IV	1,0 Massauah	0,5 Ser. V	61	lebt
		IV	189	lebt
	1 „	—	155	† in 1 Std.
	0,5 El Tor u. op. I	0,1 Ser. V	59	lebt
	0,5 „ „	—	161	† in 1 Std.
	1,0 „ „ VIII	0,1 Ser. V	12	lebt
	1,0 „ „	—	41	† in 10'

Daß bisher ähnliche Tatsachen bei anderen Mikroorganismen resp. deren Toxinen nicht ermittelt wurden, liegt daran, daß die Toxine anderer artverwandter nicht gekannt sind und derartige Artverwandtschaften, wie bei den Vibrionen und auch bei den Typhusverwandten, noch zu wenig studiert sind. In letzter Zeit konnte ich in Gemeinschaft mit v. Stenitzer analoge Verhältnisse mit Typhusantitoxin den Paratyphustoxinen gegenüber aufdecken.*)

Über die Abschwächung der Antitoxine sind unsere Erfahrungen noch zu gering. Es dürfte aber wahrscheinlich ähnlich sich verhalten wie bei den Antitoxinen der Vibrio Nasik und beim Dysenterieantitoxin. Die Abschwächung erfolgt wahrscheinlich in der Weise, daß die Sera zunächst ihren Getrenntwert durch Abnahme der Avidität verlieren, und wirken bei Gleichbleibender Neutralisationsfähigkeit nur noch in vitro.

Antitoxin des Vibrio Nasik.

Das Gift des Vibrio Nasik, welches im I. Bande dieses Handbuches ausführlich behandelt ist, läßt sich sowohl durch ein normales als auch durch Immunisierung gewonnenes Serum neutralisieren. Das normale Serum vermag das Gift in vitro nach Zusatz sofort nicht zu neutralisieren, sondern erst nach längerem Kontakte. Mischt man beispielsweise 1 ccm normales Ziegenserum mit der tödlichen Giftdosis und injiziert das Gemisch sofort intravenös Kaninchen, so gehen die Tiere ebenso zugrunde wie die Kontrolltiere. Läßt man jedoch Serum und Toxin längere Zeit in vitro aufeinander einwirken, so kann man die neutralisierende Eigenschaft normaler Sera nachweisen. So konnte nachgewiesen werden, daß sogar Mengen von 0,05 normalen Ziegenserums die einfach tödliche Dosis paralysieren. Manchmal bedarf es länger als eine Stunde, um die Wirksamkeit des Serums nachzuweisen.

0,1 ccm normales Pferdeserum + 1 ccm Toxin gemischt nach 5′ bei 37° intravenös. Kaninchen † in 50′.
0,05 ccm normales Pferdeserum + 1 ccm Toxin gemischt nach 15′ bei 37° intravenös. Kaninchen † in 1 Stunde.
0,01 ccm normales Pferdeserum + 1 ccm Toxin gemischt nach 60′ bei 37° intravenös. Kaninchen † in 1 Stunde.
0,05 ccm normales Pferdeserum + 1 ccm Toxin gemischt nach 4 Stunden intravenös. Kaninchen lebt.

Zum Unterschied vom normalen Ziegen-, Pferdeserum ließ sich selbst nach dieser Methode im Serum normaler Kaninchen, Schweine, Antitoxin nicht ermitteln. Mittels dieser Versuche konnte auch festgestellt werden, daß beispielsweise normale Ziegen-, Pferdeserum bloß Antitoxin enthält, kein Antihämotoxin gegen das Hämotoxin des Vibrio Nasik, andererseits wieder wirkt Schweineserum neutralisierend auf das Hämotoxin und nicht auf das Toxin. Auch dem El Tortoxin gegenüber verhält sich normales Ziegenserum und Pferdeserum ähnlich, indem es dieses neutralisiert, nicht das Hämotoxin. Diese Tatsachen sind insofern von Belang, als daraus neben anderem auch noch hervorgeht, daß Toxin nicht identisch sein kann mit Hämotoxin.

Daß das normale Serum bei getrennter Injektion nicht wirken kann, ist selbstverständlich und selbst große Dosen (5 ccm) des normalen Pferdeserums vermochten bei getrennter Injektion nicht zu wirken. Demgegen-

*) Siehe v. Stenitzer: Antitoxine des Typhusbazillus, ds. Handbuches.

über läßt sich bei der Prüfung eines Immunserums, welches von Ziegen mit Toxinen des Vitro Nasik gewonnen ist, folgendes feststellen:

1. Das Immunantitoxin wirkt in vitro sofort nach Zusatz zum Toxin.

2. Das Immunantitoxin wirkt auch bei getrennter intravenöser Injektion.

3. Das Immunantitoxin wirkt noch, wenn das Gift 5 ccm vorher intravenös injiziert wurde.

1 ccm Gift + 0,05 ccm Serum gemischt sofort intravenös. Kaninchen lebt.
1 ccm Gift getrennt, gleichzeitig Serum 1 ccm intravenös. Kaninchen lebt.
1 ccm Gift 5′ nachher intravenös Serum 2 ccm intravenös. Kaninchen lebt.
1 ccm Gift 10′ nachher intravenös Serum 1 ccm intravenös. Kaninchen † nach 10′.

Auch ein durch Immunisierung von Kaninchen gewonnenes Serum wirkte neutralisierend in Mengen von 0,1 ccm.

Ob bei den Tieren, welche normalerweise Antitoxin im Blute haben, das avidere Immunantitoxin aus dem weniger aviden normalen Antitoxin entstanden sein dürfte, konnten wir trotz der daraufhin gerichteten Versuche nicht entscheiden. Jedenfalls aber lassen sich einzelne Momente zugunsten dieser Auffassung anführen.

Zunächst ist es auffallend, daß das Immunantitoxin trotz längerer Immunisierung nicht höhere Werte erreicht als dem normalen Serum an Antitoxin zukommt.

0,1 ccm Ziegenserum vor der Immunisierung + 0,5 Gift nach 1 Stunde bei 37 ° intravenös. Kaninchen lebt.

0.05 ccm Ziegenserum vor der Immunisierung + 0,5 Gift nach 1 Stunde bei 37 ° intravenös. Kaninchen †.

Die Ziege wird vom 16. April bis 9. Juni mit Toxin immunisiert und bekam 62 ccm Gift. Das 7 Tage nach der letzten Injektion entnommene Serum neutralisiert die letale Dosis sofort in vitro in Mengen von 0,1 und nicht in Mengen von 0,05 ccm.

Eine weitere auffallende Erscheinung, die im selben Sinne zu deuten wäre, ist die Art der Abschwächung des Immunantitoxins.

Es hat sich gezeigt, daß ein Immunserum, welches imstande war, noch in vitro bei Kontakt sofort die Giftwirkung zu paralysieren, nach längerem Stehen nur nach längerem Kontakt sich wirksam erwies. 0,05 ccm des frischen Serums waren sofort nach Zusatz des Giftes in vitro wirksam. Das abgeschwächte Serum neutralisiert das Toxin auch in Mengen von 0,05 ccm, aber erst nach einstündigem Kontakt. Auch folgender Versuch zeigte diese merkwürdige Art der Abschwächung. Das Serum eines immunisierten Bockes neutralisiert noch in Mengen von 0,2 ccm bei getrennter Injektion das Gift. Das Tier wird 1 $^1/_2$ Monate lang nicht immunisiert. Das Serum in dieser Periode entnommen, ist nicht imstande in Mengen von 1 ccm bei getrennter Injektion das Gift zu neutralisieren, wohl aber vermag es in Mengen von 0,05 ccm nach $^3/_4$stündiger Einwirkung in vitro zu wirken. Aus diesen Versuchen, die ein Analogon in der Abschwächung der Dysenterieantitoxine haben, würde sich als wahrscheinlich ergeben, daß der Aufbau und Abbau der verschiedenen Antitoxine in gleicher Weise vor sich geht. Wenn wir die Versuche über Aufbau der Dysenterie und El Torantitoxine zusammenfassend betrachten, so kann man folgende Vorstellung entwickeln:

Die Antitoxine, die immunisatorisch erzeugt werden oder möglicherweise durch Aviditätszunahme aus normalen entstehen, haben in einer gewissen Periode der Immunisierung nicht die volle Avidität erlangt; sie wirken bloß in vitro, allerdings sehr rasch, sofort bei Kontakt mit Toxin. Erst später, nach weiterer Immunisierung, sind sie mit der höchsten Avidität ausgestattet und sind auch imstande, kurativ zu wirken. Das prinzipielle der antitoxischen Wirkung liegt demnach in der Reaktionsgeschwindigkeit resp. der Avidität der Antitoxine. Umgekehrt dürfte der Abbau erfolgen. Zunächst geht dem Antitoxin die kurative Eigenschaft verloren, es wirkt nur mehr noch in vitro sofort nach Zusatz. In einem weiteren Stadium der Abschwächung hat das Immunantitoxin die Eigenschaft eingebüßt, sofort nach Kontakt Gift zu neutralisieren und wirkt nunmehr wie ein normales, nur nach längerem Stehen. Die bereits beim El Torantitoxin nachgewiesene Neutralisationsfähigkeit für Antitoxine für Toxine artverwandter Vibrionen läßt sich auch am Antitoxin des Vibrio Nasik demonstrieren.

Das Serum der mit Toxin des Vibrio Nasik immunisierten Ziege zeigt nach verschiedenen Aderlässen folgendes Verhalten dem El Tortoxin gegenüber:

1. Aderlaß am 17. IX. 0,5 Serum + 1,0 Toxin V sofort intravenös, Kaninchen †
2. „ „ 2. XI. 0,5 Serum + 1,0 Toxin V sofort intravenös, Kaninchen lebt
   0,1 Serum + 1,0 Toxin V sofort intravenös, Kaninchen † in 30′
   1,0 getrennt, intravenös und 1,0 Toxin, Kaninchen † in 60′
3. „ „ 5. XII. 0,05 Serum + 0,5 Toxin V gemischt, sofort intravenös, Kaninchen lebt
   1,0 Serum getrennt, intravenös, 1,0 Toxin intravenös, Kaninchen lebt
   0,5 Serum getrennt, intravenös, 1,0 Toxin intravenös, Kaninchen †

Das Nasik-Antitoxin ist nicht imstande, das Cholerasaigontoxin zu neutralisieren. Trotzdem also El Torantitoxin das Nasik-Toxin, Nasik-Antitoxin das El Tortoxin, El Torantitoxin Cholerasaigontoxin zu neutralisieren vermögen, wirkt das Nasik-Antitoxin auf das Cholerasaigontoxin nicht. Dieser Versuch wurde auch mit den Antitoxinen der nicht spezifischen El Torvibrionen im gleichen Sinne ausgeführt.

Ganz gleiches Verhalten, wie es eben für das Antitoxin des Vibrio Nasik beschrieben ist, konnte auch für die Antitoxine der nicht spezifischen El Torvibrionen, des Vibrio Massauah und Elvers nach gewiesen werden.

(Literatur siehe in Band I, pag. 192.)

XI.

Typhusantitoxin.

Von

R. v. Stenitzer

in Wien.

Im Band 1, pag. 193 wurde ausgeführt, daß es einer Reihe von Autoren gelungen ist unter Anwendung mannigfacher Methoden aus Agar- oder Bouillonkulturen Typhusbazillengifte zu gewinnen.

Von verschiedener Seite wurde nun in den letzten Jahren gezeigt, daß es gelingt mit diesen Giften Tiere aktiv zu immunisieren und wurde weiter nachgewiesen, daß das Serum vorbehandelter Tiere spezifisch neutralisierende Eigenschaften besitzt. Im folgenden sollen nun die Erfahrungen bei der Immunisierung, sowie die giftneutralisierenden Eigenschaften der gewonnenen Immunsera besprochen werden.

Methodik der Immunisierung.

Die Versuchstiere, von denen praktisch nur große Tiere (Pferde, Ziegen, auch Schafe) in Betracht kommen, erweisen sich gegen die wiederholte Einverleibung der Giftstoffe, wie von allen Experimentatoren übereinstimmend angegeben wird, als sehr sensibel. Die Tiere reagieren auf die wiederholte Injektion mit hohem Fieber (40—41°), Schüttelfrost (Chantemesse, Besredka usw.), Kolikschmerzen, Gelenksschwellungen, Haarausfall (Meyer-Bergell), lokalem Ödem (Chantemesse, Meyer-Bergell). Diese Sensibilität tritt aber ganz besonders bei der **intravenösen Giftapplikation** zu Tage. Doch auch bei der subkutanen Immunisierung reagieren die Tiere (Pferde, Ziegen) nach eigenen Erfahrungen (R. Kraus und ich), wenn auch nicht so stürmisch wie nach intravenöser Injektion, mit Fieber, Prostration, Freßunlust, durch mehrere Tage hindurch.

Infolge dieser heftigen Reaktion der Tiere gestaltet sich die Immunisierung besonders schwierig.

Chantemesse immunisiert abwechselnd subkutan und intravenös, andere (Besredka, Rodet-Lagriffoul, Aronson) ausschließlich intravenös, Macfadyen subkutan.

Obwohl die subkutane Applikation die weitaus bequemere und für das Tier schonendere ist, können wir sie, wie unsere Erfahrungen in

Übereinstimmung mit Aronson lehrten, nicht empfehlen; es hat sich nämlich herausgestellt, daß der Immunisierungseffekt, das heißt der neutralisierende Wert des Serums der so vorbehandelten Tiere ein nur geringer war und auch nach Erreichung einer geringen Höhe nicht weiter gesteigert werden konnte, trotzdem ganz bedeutende Giftmengen injiziert worden waren.

Wir haben daher diesen Weg verlassen und zunächst versucht, subkutan vorbehandelte Tiere intravenös weiter zu immunisieren. Diese Kombination bietet, wie wir uns überzeugen konnten, keinen wesentlichen Vorteil, da der Zweck, die Sensibilität der Tiere für die folgenden intravenösen Injektionen herabzusetzen, nur sehr unvollkommen erreicht wurde.

Es bleibt also nur die intravenöse Applikation.

Die starke Reaktion der intravenös injizierten Tiere gestattet hier aber nur eine langsame Steigerung der Dosis bei Einhaltung einer minimalen Anfangsdosis (Chantemsse, Besredka usw.) und weiters längere Intervalle (8—14—21 Tage), wodurch natürlich die Dauer der Immunisierung sehr in die Länge gezogen wird (eventuell Jahre). Noch eines Übelstandes muß hier Erwähnung getan werden, der bisher nicht Berücksichtigung fand, aber nach unseren Experimenten bei dem Gang der Immunisierung sehr in die Waagschale fällt.

Wir konnten (Wiener klin. Wochenschr. 1908) konstatieren, daß Ziegen bei der dritten oder wiederholten intravenösen Injektion selbst der gleichen oder doch nur doppelten Giftmenge (Agarextrakte) in 8 – 14-tägigen Intervallen schwere, manchmal akut binnen 10 Stunden zum Tode führende Vergiftungserscheinungen darboten. Dieselben bestanden in einem schon wenige Minuten nach der Injektion auftretendem Kollaps und schwerster Dyspnoe. Wir haben auf diese Weise eine große Zahl von Tieren verloren. Andere erholten sich jedoch wieder, nachdem sie tagelang schwer krank dahingelegen waren.

Wir glauben diese sofort nach der Injektion auftretenden stürmischen häufig akut zum Tode führenden Erscheinungen durch eine einfache Überempfindlichkeit der Autoren nicht erklären zu können, sondern möchten annehmen, daß wir es hier mit dem seit Richet, Arthus bekannten Phänomen der Anaphylaxie zu tun haben. Die Verhinderung oder Umgehung dieser Erscheinung bedarf noch einer eingehenden experimentellen Prüfung. Vorderhand empfiehlt es sich nach den Angaben der Autoren und nach unseren Erfahrungen mit minimalen Dosen unter äußerst vorsichtiger Steigerung derselben in Intervallen von 8—14—21 Tagen durch lange Zeit hindurch zu immunisieren. Chantemesse schlägt vor, die erste Injektion, die erfahrungsgemäß am besten vertragen wird, größer als die folgenden zu wählen.

Auch über das **Präparat**, welches sich am besten für die Immunisierung eignet, herrscht keine Einigkeit. Chantemesse verwendet zur Immunisierung 7tägige Milzbouillonkultur, welche auf 55° erhitzt und zentrifugiert wurde. Besredka immunisiert mit kleinen Dosen zuerst bei 60° abgetöteten, später lebenden Agarkulturen. Macfadyen injiziert seinen Typhuszellsaft, der aus den bei der Temperatur der flüssigen Luft zerriebenen Bazillen mit Kalilauge (1 $^0/_{00}$) aufgenommen wird. Rodet und Lagriffoul verwendeten lebende Agarkulturen. Wir verwendeten Bouillonfiltrate und Agarextrakte. Letztere bereiten wir folgendermaßen: Eine 24stündige Agarflaschenkultur wird mit 15 ccm physiolog. Kochsalzlösung abgeschwemmt, 0,25 ccm normal K_2CO_3lösung zugefügt, die Suspension karbolisiert 24 Stunden stehen gelassen und dann scharf

zentrifugiert eventuell durch Papier filtriert. Davon verwenden wir als Anfangsdose intravenös 0,1—0,2 ccm in 2 ccm phys. Kochsalzlösung gelöst. MEYER und BERGELL verwendeten zur Immunisierung zunächst native, später durch Vorbehandlung der Bakterien mit flüssiger Salzsäure bei tiefer Temperatur gewonnene Endotoxine, schließlich Bouillonfiltrate. ARONSON empfiehlt zur intravenösen Vorbehandlung filtrate, welche mit Jodtrichlorid versetzt wurden. Er konnte so unter allmäliger Steigerung der Dosis einem Pferde das hundertfache der akut tödlichen Dosis injizieren.

Noch verschiedene Präparate aus Typhuskulturen, die eine geringe oder gar keine Giftwirkung auf die Versuchstiere aufwiesen, wurden als zu Immunisierungszwecken geeignet angegeben (HAHN, LEVY-BLUMENTHAL, BASSENGE-M. MAYER, BASSENGE). Doch betreffen die Versuche nur kleine Tiere (Meerschweinchen, Kaninchen). Über praktisch maßgebende Experimente an großen Tieren wird leider nicht berichtet.

Eigenschaften des Immunserums.

CHANTEMESSE zeigte zuerst, daß ein Pferd, welches er lange Zeit (2 Jahre) mit Typhusfiltraten immunisiert hatte, ein Serum lieferte, welches zweifellos Antitoxine enthielt. $^1/_{50}$ ccm Serum schützte Meerschweinchen präventiv gegen die letale Dosis Typhusfiltrate. $^1/_{20}$—$^1/_{30}$ ccm schützte präventiv Kaninchen von 1000—1200 g, $^1/_4$ ccm — 4 ccm schützte Meerschweinchen kurativ vor der tödlichen Dosis.

Fortschritte brachten erst die Arbeiten von BESREDKA und MACFADYEN.

BESREDKA antiendotoxisches Serum (Pferd) war in folgenden Werten imstande, sein Endotoxin zu neutralisieren. 0,05—1,0—2,0 Immunserum können 5—10—12 für Meerschweinchen letale Dosen Endotoxin neutralisieren. Er konnte auch präventiv schützen und mittels größerer Serummengen (2 ccm) eine deutliche kurative Wirkung gegen 2 Stunden vorher intraperitonal einverleibte tödliche Endotoxindosis erzielen. 0,2 g Trockenserum war auch imstande 32 tödliche Dosen (Meerschweinchen von 300 g) von Endotoxin zu neutralisieren.

MACFADYEN schützte mittels $^1/_{50}$ ccm Ziegenserum Kaninchen gegen die 30fache letale Endotoxindosis. 1 ccm Serum war imstande Kaninchen gegen die fünffache letale Dosis bei getrennter Einverleibung (Endotoxin in die eine und Serum in die andere Ohrvene) zu schützen. Weiters schützten 2 ccm Serum $^3/_4$ Stunde nach der Injektion von fünf tödlichen Dosen, also kurativ. Choleraendotoxin konnte nicht neutralisiert werden.

Unsere Immunisierungsversuche, die an Pferden und Ziegen angestellt wurden, bringen eine Bestätigung der bisherigen Befunde.

In der folgenden Tabelle 1 wird gezeigt, daß das Serum (Pferd „Karl“) unter allmäliger Steigerung seines antitoxischen Wertes die $1^1/_2$ fach letale Dosis Filtratgift zu neutralisieren vermochte.

In Tabelle 2 ist ein Versuch mit Immunziegenserum angeführt. Die anfängliche Steigerung des Antitoxingehaltes bei der Toxinziege 25 zeigte jedoch bei fortgesetzter subkutaner Immunisierung einen Rückgang seines Wertes. Die Schutzkraft der Agarkulturziege 36 war überhaupt gering.

Eine weitere Bestätigung dieser tatsächlichen Verhältnisse bringen die Befunde von Meyer und Bergell sowie Aronson.

Aronson macht besonders darauf aufmerksam, daß seine Sera nur dann schützten, wenn das Serum-Toxingemisch mehrere Stunden im Brutschrank verblieb oder wenn das Serum präventiv 24 Stunden vor dem Toxin injiziert wurde. Letztere Erscheinung war auch uns bei den Serumprüfungen wiederholt aufgefallen.

Tabelle 1.

Serum	Serummenge	Gift	Tier	Injektion	Resultat
Pferdeserum „Karl" vor der Immunisierung	1,0 ccm	3,0 ccm	Kaninch.	intraven.	†
	0,5 ccm	3,0 ccm	„	„	†
I. Aderlaß	1,0 ccm	3,0 ccm	„	„	ø
	0,5 ccm	3,0 ccm	„	„	†
II. Aderlaß	1,0 ccm	3,0 ccm	„	„	ø
	0,5 ccm	3,0 ccm	„	„	ø
	0,1 ccm	3,0 ccm	„	„	ø
Kontrollen: „Gigant' (Typhus)	0,5 ccm	2,0 ccm	„	„	†
„Edgar" (Typhus)	0,5 ccm	2,0 ccm	„	„	†
„Jobst" (Dysenterie)	0,5 ccm	2,0 ccm	„	„	†
„Infant" (Dysenterie)	0,5 ccm	2,0 ccm	„	„	†
„Klipp" (Dysenterie)	0,5 ccm	2,0 ccm	„	„	†
„Comtesse" (Dysenterie)	1,0 ccm	3,0 ccm	„	„	†
„Ramè" (Cholera)	1,0 ccm	3,0 ccm	„	„	†
	—	3,0 ccm	„	„	†
	—	1,0 ccm	„	„	†
Besredka Trockenserum (Lösung in phys. Kochslg.)	0,01 g	2	„	„	†
	0,02 g	2	„	„	ø
	0,1 g	4	„	„	ø
	0,3 g	6	„	„	ø
	—	2	„	„	†

Tabelle 2.

Serum	Serummenge	Gift	Tier	Injektion	Resultat
Ziegenserum 36 (Agarkultur) I. Aderlaß	0,5 ccm	3,0 ccm	Kaninch.	intraven.	ø
	0,1 ccm	3,0 ccm	„	„	†
III. Aderlaß	0,5 ccm	3,0 ccm	„	„	ø
	0,1 ccm	3,0 ccm	„	„	†
Ziegenserum 25 (Toxin)	0,1 ccm	3,0 ccm	„	„	ø
I. Aderlaß	0,5 ccm	3,0 ccm	„	„	ø
	0,1 ccm	3,0 ccm	„	„	ø
	0,05 ccm	3,0 ccm	„	„	†
II. Aderlaß	0,5 ccm	4,0 ccm	„	„	ø
	0,1 ccm	4,0 ccm	„	„	†
IV. Aderlaß	0,5 ccm	3,0 ccm	„	„	ø
	0,1 ccm	3,0 ccm	„	„	†
Kontr.: Norm. Ziegenserum	1,0	3,0	„	„	†
—	—	2,0	„	„	†

Im vorhergehenden wurden nur jene Experimente berücksichtigt, welche zweifellos dartun, daß die von den Bazillen stammenden Giftstoffe (seien sie nun durch Zerstörung der Leiber freigewordene Endotoxine, seien sie Sekretionsprodukte) durch ein im Serum von mit derartigen Giftstoffen vorbehandelten Tieren auftretendes Antitoxin, neutralisierbar sind, welches, wie unsere ausgedehnten Versuche erweisen nur gegen Giftstoffe der Typhusgruppe gerichtet, also spezifisch ist. Einer Einschränkung bedarf diese Tatsache insofern, als auch Paratyphus- Mäusetyphusgifte durch Typhusantitoxin neutralisierbar sind (Partialtoxine). Wir verfolgen diese Verhältnisse seit geraumer Zeit, sind aber derzeit in unseren Versuchen noch nicht soweit vorgeschritten um darüber mehr aussagen zu können.

Die vorliegenden Befunde gestatten jedenfalls den Schluß, daß den Giften der Typhusbazillen antigene Eigenschaften zukommen, mithin zu den Toxinen zu zählen sind.

Diese Erkenntnis erscheint insofern von ganz besonderer Wichtigkeit, als durch sie die Handhabe gegeben ist, über das Laboratorium hinaus eine antitoxische Therapie beim Menschen anzubahnen.

Derartige therapeutische Versuche am Menschen sind unter diesem neuen Gesichtspunkt bereits, wenn auch vereinzelt, unternommen worden.

In größerem Maßstabe hat bisher nur Chantemesse in Paris sein Antityphusserum erprobt und darüber neuerdigs am XIV. intern. Hyg. Kongreß Berlin 1907 berichtet. Hier soll nur im kurzen darauf hingewiesen werden, daß Chantemesse minimale Dosen injiziert (einige Tropfen subkutan, in die Rückseite des Vorderarms) und dabei ganz eklatante Erfolge zu verzeichnen hat. Er bekräftigt dies einerseits durch die Mortalitätsstatistik, nach welcher er die mit 17 % berechneten Todesfälle an Typhus in den Pariser Spitälern auf 4,3 % durch die Serumbehandlung herabzudrücken vermochte. Andererseits schreibt er dem Einfluß des Serums eine Reihe von klinisch hervortretende günstige Symptome im Verlauf der ersten 10 Tage nach der ersten Injektion zu. Er beobachtet Rückgang des Stupor, der vasomotorischen Störungen, Hebung des Blutdruckes, Eintreten von Wohlbfinden, Wiederkehr des Appetits, reichliche Urinsekretion, brüsker Abfall des Fiebers im Verlauf der ersten 6 Tage etc. Eine zweite Injektion macht er selten, jedenfalls aber erst nach Ablauf von 10 Tagen. Dabei beobachtete er manchmal ein lokales Ödem an der Injektionsstelle, weshalb er die zweite Injektion um die Hälfte kleiner als die erste wählt. Die physiologische Wirkung seines Antityphusserums erblickt er im Wesentlichen in einer Anregung der Opsoninproduktion des kranken Organismus.

Meyer und Bergell berichten über zwei völlig desperate Typhusfälle, die durch 30 resp. 60 ccm antiinfektiösen wie antitoxischen Typhusserums zur Heilung geführt wurden.

R. Kraus hatte während einer Typhusepidemie in Laibach Gelegenheit, Typhusimmunserum (Pferd) bei 30 Fällen zu erproben. Es wurden 20—40 ccm unter die Bauchhaut injiziert und dabei keinerlei lokale Reaktionserscheinungen auch nicht nach einer zweiten Injektion beobachtet. Soweit man aus diesen wenigen Fällen schließen kann, scheint nach einigen Tagen ein Einfluß auf die Temperatur und das Allgemeinbefinden ad meliorem sich geltend zu machen. Jedenfalls haben die größeren Mengen Serum, wie dies auch bei Meyer und Bergell der Fall war, keinerlei nachteilige Folgen gebracht.

Von der nun eingeschlagenen Forschungsrichtung, die eine weitere Ausgestaltung der Immunisierung, eine präzisere Bestimmung des antitoxischen Heilwertes im Tierexperiment erstrebt, müssen wir jedenfalls weitere Fortschritte als Vorbedingung einer zielbewußten und aussichtsvollen Serotherapie abwarten.

Literatur.

Aronson, H., Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 18.
Bassenge, Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 4.
Chantemesse, Presse medicale 1902.
Ders., Hygienischer Kongreß Berlin 1907.
Macfadyen, Naturforscherversammlung Kassel 1903.
Meyer und Bergell, Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 18.
Kraus und v. Stenitzer, Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 12.
Dies., Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 25.
Dies., Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 18.
(Siehe auch Literatur Bd. I ds. Handb., pag. 201.)

XII.

Die Bakterienantihämotoxine.

Von

Dr. E. Pribram und Dr. V. K. Russ

in Wien.

Einleitung.

Die Untersuchungsmethoden und die Technik der Darstellung der Antihämotoxine fallen in ihrer geschichtlichen Entwicklung zusammen mit denen der Hämotoxine. Wir können also auf den dort gegebenen geschichtlichen Überblick verweisen, der im ganzen und großen auch für die Bearbeitung der Antihämotoxine gilt. Den bereits dort erwähnten Arbeiten von Ehrlich und Madsen, Kraus und Clairmont, Neisser und Wechsberg, schlossen sich eine Reihe von Spezialuntersuchungen an (Kayser, E. und P. Levy, Todd, Castellani u. a.), Arbeiten, welche die Fragen über die Neutralisationsbedingungen von Toxin durch Antitoxin an blutkörperchenlösenden Bakterienfiltraten zu lösen versuchten: Volk, Kraus und Lipschütz, Arrhenius und Madsen. Die Tatsache, daß auch normale Sera eine Hemmung der Hämolyse bewirken, (Kraus und Clairmont) lenkte die Aufmerksamkeit späterer Untersucher auf die Bestandteile des normalen Blutserums, von welchen außer dem Eiweiß namentlich dem Cholesterin eine derartige Wirkung zukommt. Auf diese Arbeiten (Pohl, Ransom, Noguchi, P. Th. Müller, Landsteiner) kommen wir später ausführlich zurück.

Auswertung der Antihämotoxine.

Das Prinzip ist das bei der Auswertung der Antitoxine übliche. Man sucht die kleinste Menge Antitoxin (Serum), welche eben noch imstande ist, die einfach lösende Dosis des Hämotoxins*) unwirksam zu machen. Da der Neutralisierungsvorgang, wie später gezeigt werden soll, wesentlich von der Einwirkungsdauer des Antihämotoxins auf das Hämotoxin abhängig ist, muß man das Hämotoxin längere Zeit (ca. $1/2$ Stunde) bei 37 °C der Wirkung des antihämotoxischen Serums

*) Die Technik der Gewinnung und Auswertung des Hämotoxins, siehe Bd. I pag. 205—213.

aussetzen, ehe man die zur Beurteilung der Giftwirkung nötige Blutkörperchenaufschwemmung zusetzt. Die Versuchsanordnung ist zweckmäßig folgende:

Eine Reihe von Reagenzgläschen wird mit absteigenden Mengen von hämotoxischen Dosen (0,5, 0,2, 0,1 bis 0,001 ccm) in je einem ccm NaCl-Lösung beschickt, und je 2 ccm einer 5 % igen Aufschwemmung, in isotonischer*) Kochsalzlösung gewaschener roter Blutkörperchen hinzugefügt, und durch Schütteln sofort gut durchgemischt Die Mischungen läßt man zwei Stunden bei 37° und findet so, wie bereits im Abschnitt über Hämotoxine beschrieben, die kleinste noch lösende Hämotoxinmenge**). Man achte dabei auf die angegebene Reihenfolge. Bringt man nämlich die Blutkörperchenaufschwemmung zuerst in die Röhrchen, und setzt dann die (spezifisch leichtere!) Hämotoxinlösung hinzu, so schichtet sie sich oben auf, wodurch die oberste Schicht der Blutkörperchenaufschwemmung unmittelbar mit einer viel größeren Konzentration des Hämotoxins in Berührung kommt, als man beabsichtigt. (Koeppe). Dieser Versuchsfehler kann auch dadurch umgangen werden, daß man mit dem Toxinzusatz so lange wartet, bis sich die Blutkörperchen zu Boden gesenkt haben; die Toxinlösung ist in diesem Falle nur auf die Kochsalzlösung geschichtet und mischt sich erst beim Umschütteln mit den Blutkörperchen (Madsen und Walbum). Nun füllt man eine Reihe von Röhrchen mit absteigenden Mengen (1,0 0,5, 0,1 bis 0,001 ccm) Serum (Antitoxin), das vorher inaktiviert sein muß (s. u.), und bringt in jedes Röhrchen die auf oben angegebene Weise gefundene kleinste noch lösende Hämotoxinmenge. Ein Kontrollröhrchen wird mit dem Serum allein, ein anderes mit Hämotoxin (kleinste lösende Dosis) versehen. Alle diese Mischungen, die Kontrollröhrchen inbegriffen, werden dann durch Zusatz von Kochsalzlösung auf gleiches Volumen gebracht und bleiben eine halbe Stunde bei 37° (Wasserbad oder Brutschrank) stehen. Diese Zeit pflegt zur Bindung des vorhandenen Toxins an das Antitoxin zu genügen. Dann setzt man zu sämtlichen Röhrchen je 2 ccm Blutkörperchenaufschwemmung und läßt 2 Stunden bei 37° und weitere 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Das Blut im Kontrollröhrchen mit Serum allein muß nach dieser Zeit ungelöst bleiben, das mit Hämotoxin allein muß vollständig gelöst sein. Die Ablesung des Versuchsergebnisses geschieht nach den im Abschnitte über Hämotoxine erwähnten Methoden. Jenes Röhrchen, in welchem eben noch komplette Hämolyse stattgefunden hat, zeigt die hemmende Wirksamkeit des antihämotoxischen Serums an.

Die Inaktivierung des zu untersuchenden Serums muß der Prüfung deshalb vorangehen, weil bekanntlich das Blutserum der einen Tierart die Blutkörperchen anderer Tierarten aufzulösen imstande ist Nimmt man Serum und Blut von einem und demselben Tiere, so fällt die Inaktivierung weg. Man inaktiviert durch ½ stündiges Erhitzen auf

*) Das Waschen (d. h. die Befreiung von anhaftenden Blutserum) geschieht durch wiederholtes Aufschwemmen der Blutkörperchen in isotonischer Kochsalzlösung uud Abzentrifugieren. Die Gegenwart des Serums kann die Hämolyse beeinträchtigen; Kaninchenserum ist meist wenig wirksam, was bei Verwendung von Kaninchenblut unter Umständen das „Waschen" unnötig macht.

**) Es empfiehlt sich, die ungelösten Proben weitere 24 Stunden bei Zimmertemperatur zu beobachten, doch wird es bei vergleichenden Untersuchungen meist genügen, die nach 2 Stunden komplett lösende Dosis zur Auswertung des Antihämotoxins zu verwenden.

56—60° C und muß sich stets vor Anstellung des Versuches davon überzeugen, daß die Inaktivierung gelungen ist, d. h., daß das Serum allein der Blutkörperchenaufschwemmung zugesetzt, sie nicht auflöst.

Die Zeit der Einwirkung des Antihämotoxins auf das Hämotoxin ist, wie erwähnt, von großer Wichtigkeit für den Ausfall des Versuches. Dies zeigt folgendes Beispiel, in welchem ein Staphylokokkenhämolysin, dessen einfach lösende Dosis 0,01 ccm betrug, mit einem antihämotoxischen Serum in absteigenden Mengen versetzt und vor Zusatz der Blutkörperchenaufschwemmung verschieden lange Zeit bei Bruttemperatur stehen gelassen wurde:

Zusatz von antihämotoxischem Serum zu 0.01 ccm Staphylokokkenhämotoxin und Auswertung nach verschiedenen Zeitintervallen:

Zugesetzte Antihämotoxin-Menge	Auswertung mit einer 5%igen Aufschwemmg. roter Blutkörperchen				
	sofort	nach 5 Min. bei 37°	nach 10 Min. bei 37°	nach 15 Min. bei 37°	nach 30 Min. bei 37°
1,0 ccm	ø	ø	ø	ø	ø
0,5 „	ø	ø	ø	ø	ø
0,1 „	Spur	Spur	ø	ø	ø
0,05 „	Kuppe	Spur	Spur	ø	ø
0,01 „	inkomplett	inkomplett	Kuppe	Spur	ø
0,005 „	komplett	komplett	komplett	inkomplett	Kuppe
0,001 „	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett

Die Menge des neutralisierenden Antihämotoxins ist direkt proportional der Menge des eben noch lösenden Hämotoxins (Kraus und Lipschütz). Folgende Tabelle zeigt das Resultat eines derartigen Versuches, in welchem Multipla der kleinsten lösenden Dosis (0,004) eines Staphylokokkenhämotoxins zur Hämolyse verwendet wurden, und jene Menge eines Serums (normales Pferdeserum) gesucht wurde, welche das Hämotoxin eben noch zu neutralisieren imstande ist.

Menge des zur Lösung einer 5%igen Blutkörperchenaufschwemmung verwendeten Staphylokokkenhämotoxins	Menge des noch neutralisierenden Pferdeserums	Resultat nach 18 Std.
0,004 (1fach)	0,08 (1fach)	Keine Hämolyse
0,008 (2fach)	0,16 (2fach)	Keine Hämolyse
0,016 (4fach)	0,32 (4fach)	Keine Hämolyse
0,024 (6fach)	0,48 (6fach)	Keine Hämolyse
0,032 (8fach)	0,64 (8fach)	Keine Hämolyse
0,04 (10fach)	0,8 (10fach)	Keine Hämolyse
0,004 (Kontrolle)	—	Hämolyse

I. Die Antihämotoxine normaler Sera.

Das Blutserum nicht immunisierter Tiere ist zuweilen imstande ganz beträchtliche Mengen von Hämotoxin zu neutralisieren. Einzelne prägnante Beispiele seien hier angeführt, so die ersten Untersuchungen Ehrlichs über die hemmende Wirkung des Pferdeserums gegenüber Tetanushämotoxin, ferner die intensive Wirkung des Schweineserums gegenüber dem Vibrionenhämotoxin Nasik, (Kraus und Clairmont), und die Wirkung des Menschenserums dem Staphylokokkenhämotoxin gegenüber (Neisser und Wechsberg). Wertet man ein und dasselbe Serum gegen verschiedene Hämotoxine nach der erwähnten Methode aus, so findet man oft ganz erhebliche Differenzen. Ein Beispiel dieser Art sei hier mitgeteilt (Neisser).

Pferdeserum	Zahl der ccm Serum, welche die komplettlösende Dosis*) vollständig neutralisieren	
	von Staphylolysin	von Tetanolysin
1	0,025	0,25
2	0,075	0,05
3	0,025	mehr als 1,0
4	0,25	0,25

Die verschiedene Wirksamkeit ein und desselben Blutserums gegenüber den Hämotoxinen verschiedener Mikroorganismen deckt sich mit der Tatsache, daß ein Serum nach Absättigung mit dem Hämotoxin einer Bakterienart (z. B. Staphylokokkenhämotoxin) gegen ein anderes Hämotoxin (z. B. Tetanushämotoxin) seine Wirksamkeit vollständig bewahrt. (Spezifizität der Antihämotoxine normaler Sera. Neisser, Neisser und Wechsberg.) Die Autoren schließen daraus, daß in ein und demselben Serum Antihämotoxine gegenüber verschiedenen Hämotoxinen enthalten sind. In jedem Serum lassen sich Antihämotoxine gegen die meisten Hämotoxine nachweisen.

II. Antitoxische Wirkung normaler Organe.

Nicht nur das Blutserum, auch die Organe nicht vorbehandelter Tiere heben noch in hohen Verdünnungen die Wirkung hämotoxischer Kulturfiltrate auf (Kraus und Lipschütz). Man kann sich davon überzeugen, indem man gesunde Tiere entblutet, die Organe mit sterilem Quarzsand in Reibschalen verreibt und mit isotonischer Kochsalzlösung (1 g + 3—5 ccm Flüssigkeit) aufschwemmt. Der Organbrei wird in verschiedenen Mengen mit der blutlösenden Giftdosis gemischt, eine Stunde bei 37° stehen gelassen und nach Zusatz von 3 ccm einer 5%igen Blutaufschwemmung in 0,85%iger Kochsalzlösung zwei Stunden bei 37° und dann bei Zimmertemperatur gehalten. Derartige Versuche ergaben, daß der Organbrei von Milz, Leber, Lunge, Knochenmark usw. antihämotoxische Fähigkeiten besitzt. Auch zellfreie Organextrakte verhalten sich ähnlich: Der Organbrei wird zu diesem Zwecke zunächst zentrifugiert

*) Die einfachlösende Dosis des verwendeten Staphylokokkenhämotoxins betrug hier 0,05 ccm, die des Tetanushämotoxins 0,25 ccm für einen Tropfen Kaninchenblut.

und die zellfreie Flüssigkeit auf den neutralisierenden Wert geprüft. (Beobachtungsdauer wie oben.)

<table>
<tr><th>Menge des Organextraktes (1 : 3)</th><th>Knochenmark</th><th>Gehirn</th><th>Niere</th><th>Leber</th><th>Lunge</th><th>Milz</th><th>Serum</th></tr>
<tr><td>0,5</td><td rowspan="5">Keine Hämolyse</td><td rowspan="6">Keine Hämolyse</td><td rowspan="4">Keine Hämolyse</td><td rowspan="4">Keine Hämolyse</td><td rowspan="6">Keine Hämolyse</td><td rowspan="6">Keine Hämolyse</td><td rowspan="6">Keine Hämolyse</td></tr>
<tr><td>0,2</td></tr>
<tr><td>0,1</td></tr>
<tr><td>0,05</td></tr>
<tr><td>0,025</td><td>Part. Hämol.</td><td>Part. Hämol.</td></tr>
<tr><td>0,01</td><td>Hämolyse</td><td></td><td></td></tr>
</table>

Wenn man die Organextrakte durch keimdichte Filter schickt, so nimmt ihre antitoxische Kraft bedeutend ab.

Nicht nur die einfach lösende Dosis, sondern auch Multipla des Giftes werden von Multiplen der einfach hemmenden Dosis normaler Organextrakte neutralisiert. Unvollständig neutralisierenden Dosen von Organextrakten werden durch unvollständig neutralisierende Dosen von Normal- oder Immunserum ergänzt, ohne daß eine der beiden etwas von ihrer Wirksamkeit einbüßt, z. B.:

ist 0,025 die lösende Dosis des Vibrionenhämotoxins,

0,05 die neutralisierende Dosis eines Kaninchenleberextraktes,

0,05 die neutralisierende Dosis eines Vibriohämotoxins (Ziegenserum),

so gibt:

0,025 Leberextrakt + 0,025 Serum + 0,025 Vibriohämotoxin + Blut — keine Hämolyse,

0,025 Leberextrakt + 0,01 Serum + 0,025 Vibriohämotoxin + Blut — hingegen bereits Hämolyse.

Kontrolle.

0, 025 Leberextrakt + 0,025 Vibriohämotoxin + Blut — Hämolyse,

0,025 Serum + 0,025 Vibriohämotoxin + Blut — Spur Hämolyse.

Eine weitere Reihe von Untersuchungen hat gezeigt, daß die neutralisierende Wirkung derselben normalen Organe für verschiedene Gifte nicht gleich groß ist. Die Differenzen werden am besten durch nachfolgende Übersichtstabelle, die nach Kraus und Lipschütz zusammengestellt ist, zur Ansicht gebracht.

Neutralisierende Wirkung normaler Organe für Staphylokokkenhämotoxin:

	Taubenorgane			Pferdeorgane				Meerschweinchenorgane				Menschenorgane			
Menge des Organextraktes	Leber	Niere	Gehirn	Serum	Leber	Niere	Gehirn	Leber	Niere	Gehirn	Milz	Leber	Niere	Milz	Serum
2,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	keine Hämolyse	keine Hämolyse	keine Hämolyse	keine Hämolyse
1,0	keine Hämolyse-	Spur Hämolyse	Hämolyse	keine Hämolyse	keine Hämolyse	keine Hämolyse	keine Hämolyse	keine Hämolyse	Spur Hämolyse	keine Hämolyse	Hämolyse				
0,5										Spur Hämolyse			Hämolyse	Spur Hämolyse	
0,2	Hämolyse				Partielle Hämolyse	Partielle Hämolyse						Spur Hämolyse			
0,1															
0,05															
0,01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				Hämolyse

Neutralisierende Wirkung normaler Organe für Vibrionenhämotoxin.

	Taubenorgane			Pferdeorgane				Meerschweinchenorgane				Menschenorgane			
Menge des Organextraktes	Leber	Niere	Gehirn	Serum	Leber	Niere	Gehirn	Leber	Niere	Gehirn	Milz	Leber	Niere	Milz	Serum
2,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Spur Hämolyse			keine Hämolyse
1,0				Hämolyse				keine Hämolyse	Spur Hämolyse	keine Hämolyse	Hämolyse		keine Hämolyse	keine Hämolyse	Hämolyse
0,5		keine Hämolyse	keine Hämolyse		keine Hämolyse	keine Hämolyse				Spur Hämolyse					
0,2	keine Hämolyse						keine Hämolyse	—					Hämolyse	Spur Hämolyse	
0,1								Spur Hämolyse							
0,05		Spur Hämolyse	Spur Hämolyse		Spur Hämolyse	Spur Hämolyse									
0,01															

III. Die Immunantihämotoxine.

1. Darstellungsmethoden:

Die genaueren Angaben der Immunisierungsmethoden, die Wahl der Tiere und dgl. brauchen hier nicht wiederholt zu werden, weil sie bereits in anderen Kapiteln dieses Handbuchs ausführlich besprochen wurden. Hier sei nur erwähnt, daß sich die Häufigkeit der einzelnen Injektionen und die Menge der zu injizierenden Flüssigkeit nicht nur nach dem Gehalte an Hämotoxin, sondern auch nach der Giftigkeit des Kulturfiltrates (Toxingehalt) zu richten hat.

Um den günstigsten Zeitpunkt für den Aderlaß nach Injektion von Hämotoxinen zu bestimmen, haben Kraus und Russ folgende Versuche angestellt:

Einem Kaninchen, welchem am 8. November 1906 10 ccm eines Hämotoxins (Kulturfiltrat von Vibrio ElTor) subkutan injiziert worden waren, wurden nach 6 Tagen und von da ab jeden zweiten Tag kleine Aderlässe gemacht (Blutentnahme aus der Ohrvene) und das Serum auf seinen Antihämotoxingehalt gegenüber der einfach lösenden Dosis Vibriohämotoxin geprüft. Wir geben die Protokolle wieder:

I. Probeaderlass am 14. XI. nach 6 Tagen:

Serum	Hämotoxin	Zeit	Blut	Ergebnis
1,0 ccm Ser.	+ 0,05 Hämotoxin ElTor	n. $^1/_2$ Std.	3 ccm 5 % Kaninchenblut	komplette Hämolyse nach 18 Std.
0,5 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,1 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
Kontrolle	0,05 „ „		3 „ 5 % „	

II. Probeaderlass am 16. XI. nach 8 Tagen:

Serum	Hämotoxin	Zeit	Blut	Ergebnis
1,0 ccm Ser.	+ 0,05 Hämotoxin ElTor	n. $^1/_2$ Std.	3 ccm 5 % Kaninchenblut	komplette Hämolyse nach 18 Std.
0,5 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,1 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
Kontrolle	0,05 „ „		3 „ 5 % „	

III. Probeaderlass am 18. XI. nach 10 Tagen:

Serum	Hämotoxin	Zeit	Blut	Ergebnis
1,0 ccm Ser.	+ 0,05 Hämotoxin ElTor	n. $^1/_2$ Std.	3 ccm 5 % Kaninchenblut	keine Hämolyse
0,5 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,1 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	part. Hämol.
0,05 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	Spur-Hämol.
0.01 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	komplette Hämolyse
Kontrolle	0,05 „ „		3 „ 5 % „	

IV. Probeaderlass am 20. XI. nach 12 Tagen:

Serum	Hämotoxin	Zeit	Blut	Ergebnis
1,0 ccm Ser.	+ 0,05 Hämotoxin ElTor	n. $^1/_2$ Std.	3 ccm 5 % Kaninchenblut	keine Hämolyse nach 18 Stunden
0,5 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,1 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,05 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,01 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	part. Hämol.
0,005 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	komplette Hämolyse
Kontrolle	0,05 „ „		3 „ 5 % „	

V. Probeaderlass am 22. XI. nach 14 Tagen:

Serum	Hämotoxin	Zeit	Blut	Ergebnis
1,0 ccm Ser.	+ 0,05 Hämotoxin ElTor	n. $^1/_2$ Std.	3 ccm 5 % Kaninchenblut	keine Hämolyse nach 18 Stunden
0,5 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,1 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,05 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,01 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	Spur-Hämol.
0,005 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,001 „ „	+ 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	komplette Hämolyse
Kontrolle	0,05 „ „		3 „ 5 % „	

VI. Probeaderlass am 24. XI. nach 16 Tagen:

1,0 ccm Ser. + 0,05 Hämotoxin ElTor	n. $^1/_2$ Std.	3 ccm 5 % Kaninchenblut	keine Hämolyse nach 18 Stunden
0,5 „ „ + 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,1 „ „ + 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,05 „ „ + 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	Spur-Hämol.
0,01 „ „ + 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	komplette Hämolyse
Kontrolle 0,05 „ „		3 „ 5 % „	

VII. Probeaderlass am 26. XI. nach 18 Tagen:

1,0 ccm Ser. + 0,05 Hämotoxin ElTor	n. $^1/_2$ Std.	3 ccm 5 % Kaninchenblut	keine Hämolyse nach 18 Stunden
0,5 „ „ + 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,3 „ „ + 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,2 „ „ + 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	
0,1 „ „ + 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	Spur-Hämol.
0,05 „ „ + 0,05 „ „	„ $^1/_2$ „	3 „ 5 % „	komplette Hämolyse
Kontrolle 0,05 „ „		3 „ 5 % „	

Es ergibt sich aus diesem Versuch, daß ungefähr am 10. Tage nach der Injektion die Antikörper im Blute zu kreisen beginnen, dann rasch ansteigen, am 12. bis 14. Tage den Höhepunkt erreichen, umschließlich langsam abzusinken. (Vgl. auch Bulloch.) Graphisch dargestellt ergibt sich nach voranstehendem Versuch beistehende Kurve.

Wiederholt man die Injektion des Antigens nach acht Tagen, so steigt der Antihämotoxingehalt unter Schwankungen bis zu einer gewissen Höhe und die Kurve wird in ihrem Aussehen entsprechend modifiziert.

2. Spezifität der Immuantihämotoxine:

Die Wirkung der Immunantihämotoxine ist streng spezifisch, d. h. das Serum eines mit einer Art Hämotoxin immunisierten Tieres vermag nur dieses eine Antigen zu neutralisieren und nicht das Hämotoxin einer anderen Bakterienspezies. Wählt man zur Immunisierung mit Staphylokokkenhämotoxin eine Tierart — das Kaninchen — dessen Serum normalerweise weder gegen dieses noch gegen Tetanushämotoxin Antihämotoxin in nennenswerten Mengen enthält, und wertet das so gewonnene Immunserum sowohl gegenüber dem Staphylokokken-, als auch dem Tetanushämotoxin auf seine antihämotoxische Kraft aus, so findet man, daß das Serum durch die erwähnte Vorbehandlung des Tieres lediglich die Eigenschaft bekommen hat, Staphylokokkenhämotoxin zu neutralisieren, Tetanushämotoxin hingegen unbeeinflußt läßt. (Neisser, Kraus und Clairmont.) (Vgl. umstehende Tabelle.)

Während diese „Spezifität" der Immunantihämotoxine für alle bisher bekannten Hämotoxine in gleicher Weise gilt, scheint eine Spezifität für die Antihämotoxine verschiedener Arten innerhalb einer Gattung nicht,

oder wenigstens bei einzelnen Mikroorganismen nicht zu bestehen. Es neutralisiert natürlich jedes mit irgend einem Staphylokokkenstamm erzeugte Antihämotoxin die Hämotoxine aller Staphylokokken (Stämme gleicher Art!) dagegen zeigte es sich, daß auch ein Antihämotoxin, gewonnen mit dem Toxin eines Vibrio (Nasik) das Hämotoxin von

Menge d. Antiserums ccm	Tetanolysin		Staphylolysin	
1,0	0,5 ccm = 2 Lc	komplett	0,1 ccm = 4 Lc	ø
0,75		„		ø
0,5		„		ø
0.25		„		ø
0,1		„		ø
0,075		„		ø
0,05		„		ø
0,025		„		ø
0,01		„		ø
0,0075		„		Spur
0,005		„		starke Kuppe
0,0025		„		inkomplett
Kontrolle		„		komplett

Stämmen anderer Art (El Tor-Vibrionen, durch die biologischen Reaktionen als zur Cholera und nicht zu den choleraähnlichen Vibrionen gehörig charakterisiert) zu neutralisieren vermag und zwar mit gleicher Intensität (in gleich hohen Verdünnungen) wie das zur Immunisierung verwendete. (Kraus und Pribram). Eine kleine Tabelle, entnommen der Arbeit von Kraus und Pribram möge diese Verhältnisse illustrieren.

Gleiche biol. Reaktionen: (Agglutination, Pfeifferscher Versuch)	Hämotoxin produzieren	Hämotoxin produzieren nicht	Identische Antihämotoxine
Choleravibrio Koch 6 ElTor-Vibrionen Cholera Berlin	6 ElTor-Vibrionen. Zahlreiche andere Vibrionen: Vibrio Nasik „ Massauah „ Metschnikoff „ Danubicus „ Finkler-Prior „ Deneke „ Elvers ElTor-Vibrionen (welche morphol., kultur. u. biolog. different sind vom Vibrio Koch)	Choleravibrio Koch Einzelne Vibrionen (Meinicke, Pribram)	Alle Vibrionen, welche Hämotoxin produzieren

3. Schutzwirkung*) („Heilwirkung") der Immunantihämotoxine.

Bei Beschreibung der Methodik der Auswertung eines Antihämotoxins wurde angegeben, daß es notwendig sei, Hämotoxin und Anti-

*) Behring faßt den Begriff der „Heilwirkung" viel enger als dies gewöhnlich geschieht, indem er damit nur die restitutio ad integrum der durch die Krankheit (Vergiftung) bereits geschädigten Zellen bezeichnet. Nach dieser Nomenklatur wäre die „Heil"wirkung der Autoren besser als „Schutzwirkung durch Antitoxin nach Zusatz von Toxin" zu bezeichnen.

hämotoxin eine Zeitlang ($^1/_2$ Stunde) bei 37 ^{0} auf einander einwirken zu lassen, wenn man den Neutralisationswert eines Antihämotoxins bestimmen will. Dies ist deshalb notwendig, weil die einzelnen Toxine verschieden rasch an die roten Blutkörperchen gebunden werden, und zwar in der Regel so schnell, daß eine Neutralisation durch das antitoxische Serum nicht mehr erfolgen kann, und die Hämolyse stattfindet. Noch auffallender wird diese Erscheinung, wenn man den Zusatz des antitoxischen Serums erst nachträglich macht, wobei das Intervall zwischen Hämotoxin- und Serumzusatz eine große Rolle spielt. Untersuchungen dieser Art erscheinen deshalb ganz besonders wichtig, weil die Serumtherapie in der Praxis sich fast stets in der Lage befindet, die „nachträgliche Schutzwirkung", anzuwenden; da bei allen Versuchen, in welchen der Tierkörper als reagierendes Objekt verwendet wird, eine Reihe von Fehlerquellen (Temperatur des Tieres, Geschwindigkeit der Blutzirkulation, Viskosität des Blutes, Wasserreichtum des Blutes und der Organe und vielleicht noch eine ganze Reihe anderer mehr oder weniger bekannter Faktoren) schwer ins Gewicht fallen, ist es einzig und allein der Reagenzglasversuch, der uns sichere Aufklärung über diese praktisch außerordentlich bedeutsame Frage geben kann. Durch die Leichtigkeit, mit welcher die Schädigung der roten Blutkörperchen beobachtet werden kann, sind wir in die Lage versetzt, die schützende Wirkung eines Serums auf die mit dem Toxin in Berührung gebrachte Organzelle in verschiedenen Phasen zu studieren. Die Versuchstechnik wie sie Madsen angegeben hat ist folgende: Filtrate von hämotoxischen Bouillonkulturen werden hinsichtlich ihrer Lösungskraft gegenüber 5 ccm einer 5 $^0/_0$igen Kaninchenblutaufschwemmung in 0,85 $^0/_0$iger Kochsalzlösung genau ausgewertet. Diejenige Menge Hämotoxin, welche innerhalb einer Stunde bei 37 ^{0} und 2 Stunden bei Zimmertemperatur alle zugefügten Erytrocyten auflöst, ist die einfach lösende Dosis (Lc). Als einfach neutralisierende Dosis wird jenes Quantum normalen Antihämotoxins (normales Pferdeserum, Schweineserum) bezeichnet, das nach einer einstündigen Einwirkung bei 37 ^{0} die Lc-Dosis des Giftes eben vollständig zu neutralisieren vermag. (Beobachtungsdauer 2 Stunden Brutschranktemperatur und weitere 22 Stunden Zimmertemperatur). Die Versuchsreihen werden derart angestellt, daß man eine Reihe von Röhrchen mit der Lc-Dosis des Hämotoxins beschickt, 5 ccm der 5 $^0/_0$ igen Blutaufschwemmung zufügt und nun sofort und nach verschiedenen Zeitabschnitten, z. B. von 5 zu 5 Minuten entweder die einfach neutralisierende Dosis oder ein Multiplum derselben zusetzt; die Gemenge Toxin-Blutkörperchen müssen während der ganzen Zeit bei 37 ^{0} gehalten werden. Derartig angestellte Versuche mit Hämotoxinen von Tetanus, Staphylokokken und Vibrionen gaben folgende Resultate (Kraus und Lipschütz): Die verschiedenen Hämotoxine verhalten sich sehr verschieden. Während die einfach lösende Dosis von Tetanushämotoxin erst durch das 200 000 fache der einfach neutralisierenden Antihämotoxindosis bei gleichzeitigem Zusatz zur Blutkörperchenaufschwemmung vollständig neutralisiert wird, genügt beim Staphylokokkenhämotoxin das zehnfache der neutralisierenden Dosis, dagegen bedarf man beim Vibriohämotoxin der hundertfachen Menge. Wartet man mit dem Zusatz von neutralisierendem Serum 10 Minuten, so steigt der zur vollständigen Neutralisation erforderliche Zusatz. Übrigens verhalten sich auch in dieser Hinsicht die einzelnen Hämotoxine verschieden und es gelingt z. B. bei Staphylokokkenhämotoxin auch noch Multipla der lösenden Dosis zu neutralisieren.

4. Die Wirkung der Antihämotoxine im Tierkörper.

Die neutralisierende Wirkung des Antihämotoxins läßt sich auch im Tierkörper gut beobachten. Injiziert man Tieren ein Hämotoxin, so treten die bekannten, durch die Auslösung der roten Blutkörperchen bedingten Erscheinungen auf: Hämoglobinurie, sekundäre Anämie, bei Verwendung entsprechend großer Dosen sogar Tod der Tiere innerhalb 10—20 Stunden. (Vgl. im Abschnitt über Hämotoxin.) Diese Wirkung läßt sich durch vorhergehende Injektion von antihämotoxischen Serum vollständig neutralisieren. So vermochte z. B. Todd Meerschweinchen am Leben zu erhalten, welchen er die sicher tötende Dosis von 10 ccm Megatheriumhämotoxin einspritzte, wenn er 24 Stunden vorher antihämotoxisches Serum injiziert hatte, — die Tiere zeigten in diesem Falle überhaupt keine Krankheitserscheinungen. Ähnliche Versuche mit Staphylokokkenhämotoxin stellten Kraus und Lipschütz an. Sie verfolgten dabei das hämatologische Bild und kamen zu dem Resultate, daß das Antihämotoxin bereits in Dosen von 0,5 und 0,1 ccm im Tierkörper eine schützende Wirkung gegen 1 ccm des verwendeten Staphylokokkenhämotoxins entfaltete. Ähnliche Untersuchungen wurden seither mit fast allen anderen hämotoxisch wirkenden Kulturfiltraten ausgeführt, und man fand stets eine spezifisch neutralisierende Wirkung des Antihämotoxins.

IV. Untersuchungen über die hämotoxinhemmenden Bestandteile des Normal- und Immunserums, nebst Angaben der wichtigsten Methoden.

Zuerst hat Pohl die Wahrnehmung gemacht, daß das Cholesterin bei der Hämolyse eine Rolle spielt, indem er zwischen der Aufnahmsfähigkeit der Erythrocyten für Chloroform und ihrem Gehalte an Cholesterin und Lecithin Beziehungen feststellen konnte. — Die hämolytische Wirkung des Saponins läßt sich nach Ransom durch Cholesterin hindern.

Noguchi untersuchte die Wirkung von Cholesterin auf Bakterienhämotoxine. Er ging dabei so vor, daß er die einfach lösende Dosis verschiedener (Meerschweinchen-, Kaninchen-, Menschen-, Pferde-) Normalsera suchte, und die gefundenen Resultate mit jenen verglich, die er bei Parallelversuchen mit Cholesterin und Tetanushämotoxin erhielt. Er kam zu folgenden Resultaten:

1,0 mg	Tetanushämotoxin	+ 1,0 mg	Cholest.	+ Menschenblut	=	deutliche	Hämolyse.
1,0 mg	„	+ 1,0 mg	„	+ Meerschwbl.	=	do.	do.
1,0 mg	„	+ 2,0 mg	„	+ Menschenblut	=	Spur von	Hämolyse.
1,0 mg	„	+ 2,0 mg	„	+ Meerschwbl.	=	do.	do.
1,0 mg	„	+ 2,5 mg	„	+ Menschenblut	=	keine	Hämolyse.
1,0 mg	„	+ 2,5 mg	„	+ Meerschwbl.	=	do.	do.

Aus diesen Versuchen und solchen mit Phytohämolysinen schließt Noguchi, daß die antihämotoxische Wirkung der Blutsera ihrem Gehalte an Cholesterin zuzuschreiben sei. Landsteiner zeigt in seinen Untersuchungen mit v. Jagic, Reich, v. Eisler, Botteri, daß die Hämolysine des Blutserums eine bis zu einem gewissen Grade spezifische Affinität zu kolloidalen Substanzen, besonders zu Lipoiden, besitzen, und führt den Nachweis, daß auch der Ätherextrakt aus roten Blutkörperchen Tetanushämotoxin bindet. Dasselbe gilt für Vibrionenhämotoxin (Pribram). Landsteiner faßt den Vorgang als eine Art Adsorptionserscheinung auf, bei welcher mehrere Teilfaktoren in Betracht kommen: Lösungsaffinitäten (physikalische

Beschaffenheit der Lipoide), und der chemische Charakter der Stoffe. Insbesondere für das Cholesterin hebt LANDSTEINER die Bedeutung des chemischen Charakters neben der physikalischen Beschaffenheit hervor: Vorhandensein der Hydroxylgruppe (HAUSMANN, ABDERHALDEN und LE COUNT) und Fähigkeit, basische Farbstoffe aufzunehmen (OVERTON). In Fortsetzung der Versuche von LANDSTEINER und v. EISLER extrahierte letzterer die lipoiden Bestandteile des Serums (normales Pferdeserum) mit Äther und untersuchte die hemmende Wirkung des Ätherextraktes für verschiedene Bakterienhämotoxine, wobei er zu recht bemerkenswerten Resultaten kam. Seine Versuchsmethode war folgende: Er schüttelte Pferdeserum mit dem dreifachen Volumen Äthyläthers 10 Minuten lang und prüfte die Hemmungswirkung des Extraktes für Staphylokokken-, Vibrionen- und Tetanushämatoxine derart, daß er abgemessene Mengen in Reagenzröhrchen füllte, den Äther auf dem Wasserbade bei 40° verjagte, zu dem Rückstand die abgemessene Giftmenge zusetzte und die Mischung 30 Minuten im Brutschrank digerierte. Dann setzte er 0,5 ccm einer 5%igen Aufschwemmung von Kaninchenblut zu und brachte alle Proben mit 1% Kochsalzlösung auf das Volumen von 2 ccm. Es zeigte sich, daß der Ätherextrakt (die Lipoide) des normalen Pferdeserums die Hämolyse durch Tetanus-, nicht aber die durch Vibrionen- oder Staphylokokkenhämotoxin hemmt. Der Grund hierfür liegt darin, daß das Tetanushämotoxin bereits durch sehr geringe Mengen von Cholesterin (0,000 000 4) gehemmt wird, während man für die beiden anderen genannten Hämotoxine etwa die 100fache Menge braucht. v. EISLER zeigte, daß die geringen Mengen freien Cholesterins, welche im normalen Serum vorkommen, bereits eine ziemlich beträchtliche Hemmung der Hämolyse durch Tetanushämotoxin hervorzurufen imstande sind, daß aber auch dem Serumeiweiß, und zwar fast ausschließlich dem Globulin ebenfalls eine stark hemmende Eigenschaft zukommt. Wir kommen darauf später zurück und wollen hier noch die Methoden anführen, deren sich v. EISLER bediente, um das Cholesterin aus dem Serum darzustellen:

2 Liter normalen von Blutkörperchen befreiten Serums (Pferdeser.) werden mit dem vierfachen Volumen 95%igen Alkohols gefällt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der Alkohol wird dann abgesaugt („Fraktion I"), das Eiweiß wieder mit 9 Litern 95%igen Alkohols versetzt und unter häufigem Umrühren 8 Tage lang im Brutschrank extrahiert. Auch diese alkoholische Lösung (II) wird abgesaugt und das restliche Eiweiß mit einer Mischung von Alkohol und Äther zu gleichen Teilen zuerst 14 Tage lang bei Zimmertemperatur, dann durch 70 Stunden im Soxhlet extrahiert. Auf diese Weise wird das Lezithin aus seiner festen Verbindung mit Eiweiß (Lezithalbumin) befreit (III) (LIEBERMANN). In der ersten stark gelb gefärbten Alkoholfraktion treten nach einiger Zeit nadelförmige Kristalle auf, die Hauptmasse dieser Kristalle fällt aber in der II. Alkoholfraktion in der Kälte aus (HÜRTHLE). Während sich diese Kristalle nach und nach zu Boden senken, zeigen sich auf der Oberfläche des Alkohols noch andere blättchenförmige Kristalle. In größerer Menge gewinnt man diese letzteren aus der (III.) Alkoholätherextraktion. Es sind Ölsäure- und Palmitinsäure-Cholesterinester (Schmelzpunktbestimmung!), welche, in Äther gelöst, die Tetanushämolyse gar nicht beeinflussen. Die Hemmung der Hämolyse durch Tetanushämotoxin verteilt sich auf die drei Fraktionen in der Weise, daß die I. stark hemmt, die II. gering, die III. gar nicht (alkohol. Lösungen der im Vakuum auf ca. 300 ccm zur Syrupdicke eingeengten Fraktionen).

Fällt man die derartig eingeengten Fraktionen I. und II. nach Zuelzer mit Azeton, so erhält man einen ätherlöslichen Niederschlag (Lezithin), welcher selbst in größeren Mengen keinen Einfluß auf die Hämolyse ausübt. Das Filtrat der Azetonfällung, aus dem sich bei 0° fettartige, die Hämolyse gar nicht hemmende Massen ausscheiden, liefert, zur Trockene eingedampft, einen aus Fett, zahlreichen Fettsäurekristallen und wenig rhombischen Tafeln bestehenden Rückstand. In Chloroform geht nur ein geringer Teil dieses Rückstandes in Lösung, der noch in sehr geringen Mengen die Hämolyse durch Tetanushämatoxin hemmt: das Cholesterin.

Die Frage, ob die Eiweißkörper des Serums an der Hämotoxin hemmenden Wirkung beteiligt seien, wurde zuerst von P. Th. Müller untersucht, nachdem vorher Arrhenius und Madsen als sehr wahrscheinlich angenommen hatten, daß die Wirkung höherer Serumkonzentrationen (0,01—0,5 ccm) auf den Eiweißgehalt zu beziehen sei. Müller kam zu der entgegengesetzten Anschauung. Die Methode, mit welcher er die Eiweißkörper von den Lipoiden des Serums trennte, war folgende: 10 ccm Normal-Pferdeserum werden mit etwa dem fünffachen Volumen Alcohol absolutus gefällt, so rasch als möglich abfiltriert, der Niederschlag zwischen Filterpapier gut abgepreßt und in 10 ccm 0,85 $^0/_0$ Kochsalzlösung aufgelöst. Die Lösung ist opaleszent und enthält alle Eiweißkörper. Die abfiltrierte Flüssigkeit wird auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft und der Trockenrückstand (Lipoide des Serums) im ursprünglichen Volumenverhältnisse (= 10 ccm) mit 0,85 $^0/_0$iger Kochsalzlösung aufgelöst. Jetzt sind drei Flüssigkeiten auf ihre antihämotoxische Kraft zu prüfen:

1. das normale Pferdeserum,
2. die gelösten Eiweißkörper,
3. die gelösten Lipoide.

Die Versuchsreihen werden derart angestellt, daß zu je 0,002 g Tetanustrockenhämotoxin (= ungefähr die doppelt lösende Dosis) und 1 ccm Ochsenblut steigende Mengen der drei verschiedenen Substanzen zugefügt und alle Proben auf das gleiche Volumen mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt werden. Nachstehende Tabelle gibt den Versuch wieder:

ccm	Normalserum	Alkoholfällung aus Pferdeserum gelöst	Alkoholextrakt gelöst
0,1	vollkommene Lösung		0,02 starke Lösung
0,2	mäßige Lösung		0,04 mäßige Lösung
0,3	Spur		0,06 do. do.
0,4	Spur		0,08 geringe Lösung
0,5	ø		0,1 Spur
0,6	ø		0,2 ø
0,7	ø	vollkommene Lösung	0,3 ø
0,8	ø		0,4 ø
0,9	ø		0,5 ø
1,0	ø		
1,1	ø		
1,2	ø		
1,3	ø		
1,4	ø		

Das hemmende Agens wird also durch Alkohol nicht gefällt, sondern findet sich im Extrakt wieder, kann demnach kein Proteid sein. Die größere hämotoxische Wirkung des Alkoholextraktes gegenüber der des Normalserums erklärt Müller damit, daß er annimmt, es enthalte letzteres einen Teil der Lipoide in gebundenem Zustande, wodurch ihre hemmende Kraft nicht in Erscheinung treten könne.

Im Gegensatze zu Müller findet v. Eisler bei Verwendung der gleichen Methode, daß das Serumeiweiß nach der Fällung mit Alkohol die Hämolyse durch Tetanushämotoxin fast ebenso stark beeinflußt wie zuvor.

v. Eisler fand, wie bereits erwähnt, daß das Globulin des Serums in dieser Beziehung ebenso wirksam ist, wie das Serum selbst, während das Albumin (gegen Tetanus- und Staphylokokkenhämotoxin) unwirksam ist. Bemerkenswert erscheint der Befund dieses Autors, daß das mit Äther vollständig extrahierte Serum oder Globulin ebenso wirksam ist, wie das nicht extrahierte, daß sich aber trotzdem mit dem Ätherextrakte eine nicht unbeträchtliche Hemmung der Hämolyse durch Tetanushämotoxin erzielen läßt. Auch aus dem an sich unwirksamen Albumin konnte ein wirksames Extrakt gewonnen werden, was wohl darauf schließen läßt, daß durch die Behandlung mit Äther ein durch Adsorption oder vielleicht andersartige Bindung von Eiweißkörpern festgehaltenes und seiner Wirksamkeit beraubtes Lipoid frei wird. Die Untersuchungen über die Aufhebung der hemmenden Wirkung des Globulins durch Fermente lassen sich dahin zusammenfassen, daß Trypsin und Steapsin wirkungslos sind, während die Pepsinverdauung entsprechend der Abnahme des koagulablen Eiweißes in der Globulinlösung je nach der Zeitdauer der Einwirkung eine Abschwächung oder vollständige Aufhebung der hemmenden Wirkung hervorruft.

Bei fraktionierter Fällung des Globulins fand v. Eisler einen bemerkenswerten Unterschied zwischen Normal- und Immunserum: Während im Normalserun das Euglobulin die ganze hemmende Wirkung des Ausgangsserums enthielt, und das Pseudoglobulin unwirksam war, beteiligten sich im Immunserum Euglobulin und Pseudoglobulin etwa in gleicher Weise an der Wirkung. Ein quantitativer Unterschied der analogen Fraktionen des Normal- und Immunserums ließ sich nicht feststellen.

Literatur.

Abderhalden und Le Count, Zeitschr. für experim. Path. und Therapie, Bd. II.
Arrhenius und Madsen, Zeitschr. für physik. Chemie 1903.
Bulloch und Hunter, Centralbl. für Bakt. 1900, Bd. XXVIII.
Castellani, Lancet 1902, 15. Februar.
Ehrlich, Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 12.
Eisler, v., Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 27 und 30, Zeitschr. für experim. Pathol. und Therapie 1906, Bd. III.
Hausmann, Beiträge zur physiol. Chemie 1905, Bd. VI.
Kayser, Zeitschr. für Hygiene 1903, Bd. XLII.
Kraus und Clairmont, Wiener klin. Wochenschr. 1900, Nr. 3 und 1901, Nr. 42.
Kraus und Lipschütz, Zeitschr für Hygiene 1904, Bd. XLVI.
Kraus und Pribram, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLI.
Landsteiner und v. Eisler, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXIX, Nr. 3.

Landsteiner und v. Jagic, Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 3.
Landsteiner und Reich, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXIX, pag. 6.
Levy, E. P., Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXX.
Madsen, Zeitschr. für Hygiene 1899, Bd. XXXII.
Madsen und Walbum, Acad. royal des sciences et des lettres de Danemark 1904, Nr. 6.
Müller, P. Th., Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV.
Neisser, Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 49.
Neisser und Wechsberg, Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVI.
Noguchi, Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII.
Nolf, Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, Bd. XIV.
Overton, Jahrbuch für wissensch. Botanik 1900, Bd. XXXIV.
Pohl, Archive internat. de Pharm. et de Thér., Vol. VII, Fasc. 1/2.
Pribram, Handbuch der pathogenen Mikroorg. 1906, Bd. I. Ergänzungsheft.
Ransom, Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 3.
Todd, Transactions of the Pathol. Society of London 1902, Vol. LIII, Part. II.
Volk, Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV.

XIII.

Antileukocidin.

Von

C. Levaditi

in Paris.

Antileukocidin.*)

Die nahen Beziehungen, die zwischen dem Leukocidin und anderen Bakterientoxinen, wie dem Diphtherie- und Tetanustoxin, bestehen, ließen die Möglichkeit voraussehen, ein dem Tetanus- und Diphtherieantitoxin analoges Antileukocidin zu gewinnen. Diese Voraussicht wurde durch die Untersuchungen von DENYS und VAN DE VELDE [5]) tatsächlich bestätigt. Sie zeigten, daß durch die Injektion von Leukocidin in ein Kaninchen im Serum des Tieres ein spezifisches Produkt entsteht, welches fähig ist, in vitro die toxische Wirkung des Staphylokokkengiftes auf die weißen Blutkörperchen aufzuheben.

Herstellung des Antileukocidins.

DENYS und VAN DE VELDE stellten das Antileukocidin her, indem sie Staphylokokkenkulturen, die vorher filtriert worden waren, oder auch lebende, aber wenig virulente Kulturen desselben Kokkus, Kaninchen unter die Haut injizierten. In anderer Weise haben sie diese Bildung mittels Injektion von Staphylokokkenbouillon, die auf 120° erhitzt worden waren, hervorgerufen. Sie empfehlen sehr vorsichtig zu verfahren und mit sehr kleinen Dosen zu beginnen, die man erst ganz allmählich steigert, wenn die Tiere ihr ursprüngliches Gewicht wieder erreicht haben. Die Immunisation durch Filtrate ist der durch sterilisierte Kulturen vorzuziehen, denn die Injektion letzterer ruft oft Abszesse und Nekrose hervor und führt den Tod der Tiere durch Kachexie herbei.

In einer späteren Arbeit kam VAN DE VELDE [13]) auf sein Immunisationsverfahren zum Zwecke der Leukocidinbildung zurück und verbesserte es in folgender Weise:

Man injiziert bei einer Anzahl Kaninchen mehrere tödliche Dosen einer virulenten Kultur von Staphylokokkus aureus in die Pleurahöhle,

---

*) Siehe Kapitel Leukocidin, Aggressin, Bd. I, pag. 223.

aspiriert nach dem Tode sofort das entstandene Exsudat mittels einer sterilen Pipette, mischt die verschiedenen Ergüsse gut miteinander durch und erhält so ein leukocidinreiches Mischpräparat. Dieses wird zentrifugiert und zu der klaren abgegossenen Flüssigkeit etwas Äther zugesetzt um etwa noch vorhandene Keime abzutöten*), was nach einigen Stunden der Fall ist. Dann wird der Äther durch Ausgießen der Flüssigkeit in sterile Petrischalen verdampft, wonach das Präparat injektionsfertig ist**).

Man muß die Immunisation mit sehr kleinen Dosen (0,04 ccm z. B.) beginnen, weil die subkutane Injektion des das Leukocidin enthaltenden Exsudates von einem empfindlichen Gewichtsverlust der Tiere gefolgt ist. Indem man vorsichtig diese Dosen steigert, gelangt man allmählich dazu, den Kaninchen ohne Gefahr bis 2 ccm Exsudat beibringen zu können, eine Dosis, die sicherlich Kontrolltiere töten würde.

Neisser und Wechsberg[10]) verfahren ungefähr in derselben Weise, wie ihre Vorgänger bei der Immunisation der Kaninchen und Ziegen mit filtrierten Staphylokokkenprodukten. Nach diesen Autoren rufen gleiche Dosen von 0,2 ccm des Filtrates Fieber und eine lokale Infiltration hervor, die von einem Gewichtsverlust der Tiere und lokaler Induration gefolgt ist. Man immunisiert, indem man sich nach den Veränderungen des Gewichtes der Tiere richtet***).

Wirkung des Antileukocidin; Wertbestimmung des antileukocidinhaltigen Serum.

Die Wirkung des Antileukocidins besteht in der Neutralisation in vitro der leukolytischen Eigenschaften des Staphylokokkengiftes.

Um diese Wirkung zu zeigen, mischten Denys und van de Velde:

a) Leukocidin, Normalkaninchenserum und lebende Kaninchenleukocyten.

b) Leukocidin, Kaninchenimmunserum (das auf die oben beschriebene Art gewonnen wurde) und lebende Kaninchenleukocyten.

Nach einigen Minuten konnten sie sich durch die mikroskopische Untersuchung überzeugen, daß in der Mischung *a* die Leukocyten ihre amöboiden Bewegungen verloren und Bläschenform annahmen, während in *b* die Leukocyten sehr lange am Leben blieben.

Um die antitoxische Kraft ihres Antileukocidinserums zu bestimmen, verdünnen Denys und van de Velde Leukocidin mit Normalkaninchenserum oder mit physiologischer Kochsalzlösung so lange, bis zur unteren Grenze der toxischen Wirkung, beispielsweise bis 1 : 150. Dann setzen sie zu einem bestimmten Volumen dieser Lösung verschiedene Mengen verdünnten und nicht verdünnten Antileukocidinserums und weiße Blutkörperchen hinzu; diejenige von den Mischungen, welche gegen Leukocyten unwirksam ist, enthält gerade die Serummenge, welche zur Neutralisierung der gewählten Menge Leukocidins genügt.

---

*) Van de Velde vermeidet die Sterilisation durch Hitze, um das Leukocidin nicht zu zerstören, das eine Erhitzung über 60° nicht erträgt.

**) Vergl. mit dieser Immunisation die Bails durch Aggressinexsudate (s. Kapitel Aggressine).

***) Neisser und Wechsberg konservieren leukocidinhaltige Exsudate durch Zusatz oder Karbolsäure in Spuren.

NEISSER und WECHSBERG bedienen sich zum gleichen Zwecke ihrer bioskopischen Methode*). Im folgenden eine Tabelle, welche die von diesen Autoren gewählte Versuchsanordnung veranschaulicht:

Lr (Limes reducens) = 0,25 ccm des Aleuronexsudates:

	Leukocyten-Exsudat	Toxin	Antileukocidin-Serum	Reduktion
	0,5	0,1	1,0	+
	0,5	0,1	0,75	+
	0,5	0,1	0,5	+
	0,5	0,1	0,25	+
	0,5	0,1	0,1	+
	0,5	0,1	0,075	+
	0,5	0,1	0,05	Spuren
	0,5	0,1	0,01	Spuren
	0,5	0,1	0,0075	Spuren
	0,5	0,1	0,005	ø
			—	
Kontrolle I	0,5	0,1	—	ø
Kontrolle II	—	—	0,5	ø

Zuerst mischt man das Toxin und Antitoxin in kleineren Röhrchen und läßt sie eine Stunde lang im Thermostaten in Kontakt. Dann fügt man die Leukocyten hinzu und läßt sie 1 ½ Stunde einwirken; hernach fügt man 2 Tropfen der Methylenblaulösung hinzu und gießt flüssiges Vaselin darüber. Nach weiteren 2 Stunden prüft man die Resultate.

*
* *

Die Anwendung dieser Verfahren hat es ermöglicht manche interessanten Fragen zu beleuchten, die den Mechanismus der Wirkung des Antileukocidins auf das Leukocidin, die Anwesenheit von Antileukocidin in manchen normalen Seris, wie auch den Einfluß der Hitze auf die Fähigkeit des Leukocidin, Antikörper zu bilden betreffen.

So stellte sich VAN DE VELDE[13]) die Frage, ob ein an Leukocidin reiches Pleuraexsudat, dessen toxisches Vermögen durch Erhitzen auf 60° während 10 Minuten vernichtet, noch imstande ist, die Bildung von Antileukocidin im Serum von Kaninchen hervorzurufen. Die in dieser Richtung angestellten Untersuchungen haben gezeigt, daß das Exsudat unter diesen Bedingungen vollständig die Fähigkeit verliert, eine Bildung von Antileukocidin hervorzurufen. Diese Tatsache ist sehr bemerkenswert, denn sie beweist, daß die Hitze nicht allein die toxophore Gruppe des Staphylokokkentoxins, sondern auch die haptophore Gruppe desselben zerstört, die nach ERRLICH zur Fixation (Bindung) dieses Toxins an das Gewebe dient und das auslösende Agens der Antitoxinbildung darstellt.

Nach Analogie mit anderen Bakterienantitoxinen hat man auch für das Leukocidin versucht, Antikörper im Serum normaler Tiere nachzuweisen. VAN DE VELDE machte die Beobachtung, daß Leukocyten in einem mit Normalkaninchenserum verdünnten Leukocidinexsudat viel länger lebensfähig bleiben, als in einem mit physiologischer Kochsalzlösung

*) Siehe Kapitel Leukocidin, Bd. I, pag. 223.

verdünnten; er ist deshalb geneigt, das Vorhandensein von Antileukocidin im normalen Kaninchenserum anzunehmen. Neisser und Wechsberg ist es nicht gelungen, eine erwähnenswerte antitoxische Fähigkeit im Normalkaninchenserum nachzuweisen; dagegen gestatteten ihnen ihre Untersuchungen die Existenz eines normalen Antileukocidins im Serum des Pferdes und Menschen zu beweisen. Diese natürliche antitoxische Fähigkeit ist jedoch bedeutend geringer als die auf dem Wege der Immunisation erworbene.

Verschiedene Forscher haben mittels chemischer und physikalischer Methoden versucht, ob es nicht möglich wäre, die Verbindung zwischen Toxin und Antitoxin zu sprengen und eine der beiden Componenten in Freiheit zu setzen. Calmette gelang es, eine neutrale Mischung von Schlangengift und Schlangengiftantitoxin toxisch zu machen, indem sie diese Mischung auf eine Temperatur erhitzten, welche das Antitoxin zerstörte, das Gift jedoch ganz unversehrt ließ. Denys und van de Velde haben dieselben Versuche mit Leukocidin und Antileukocidin wiederholt. Sie erhitzten eine neutrale Mischung dieser beiden Substanzen auf 60°, eine Temperatur, welche das Leukocidin seiner leukotoxischen Eigenschaften beraubt, ohne jedoch die antitoxischen Fähigkeiten des Antileukocidinserums zu zerstören. Es ergab sich, daß die Toxin- und Antitoxinmischung sich trotz der Erhitzung indifferent gegenüber weißen Blutkörperchen zeigte und daß sie keineswegs die Fähigkeit erworben hatte, neue Dosen von Leukocidin zu neutralisieren. Es ist also unmöglich, die chemische Verbindung, welche sich bildet, wenn man Leukocidin mit seinem Antitoxin zusammenbringt, durch Erhitzen zu trennen.

(Literatur siehe Band I, pag. 231).

Antikörper gegen tierische Toxine.

XIV.

Über Antitoxine der Schlangengifte.

Von

Prof. A. Calmette

Direktor des Institut Pasteur in Lille.

I. Natürliche Immunität gegen Schlangengift.

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, daß gewisse Warmblüter: Schwein, Igel und zwei Pelikanarten, der Culebrero und der Guacabo die in den Urwäldern Columbiens heimisch sind, eine natürliche Immunität gegen Schlangenbisse resp. deren Folgen besitzen.

Schweine z. B. fressen Vipern direkt gern und in den Gegenden Nordamerikas um den Mississippi und seine Nebenflüsse werden sie sogar speziell darauf abgerichtet, junge Vipern und andere Giftschlangen, die an jenen Wasserläufen eine Landplage bilden, unschädlich zu machen. Das Schwein verdankt seine Resistenz gegen Schlangenbiß der dicken subkutanen Fettschicht in der nur ganz wenige und ganz kleine Gefäße verlaufen, so daß die Resorption des Giftes nur sehr allmählich vonstatten geht. Eine echte eigentliche Immunität besteht nicht: eine Neutralisierung von Schlangengift durch Schweineblutserum ist nicht möglich.

Dagegen besitzen Ichneumon und Igel gegen besagte Toxine, eine sehr ausgesprochene Unempfindlichkeit, die sie der Anwesenheit kleiner Mengen von Antitoxin gegen Schlangengift in ihrem Kreislauf verdanken. (Calmette, Phisalix). Aber auch diese Tiere unterliegen ohne weiteres, wenn man mit etwas größeren Dosen impft: sie sind demnach durchaus nicht absolut immun. —

In allen Gegenden des Erdballs wo Giftschlangen vorhanden sind und dem Menschen gefährlich werden, gibt es immer wieder einzelne Individuen, die vorgeben, die Gefahren und Folgen eines Schlangenbisses nicht zu fürchten. Entweder weil sie nach ihren Angaben von vornherein unempfindlich für das Gift sind oder weil sie sich des Besitzes und der Kenntnisse gewisser Mittel erfreuen, die in derartigen Fällen

sichere Heilung bringen sollen. Natürlich wird mit solchen Mitteln ein schwunghafter und meist sehr einträglicher Handel getrieben und die Besitzer und Behüter des Geheimnisses genießen eine große Achtung im Volk, das ihnen gewöhnlich direkte Beziehungen zur Gottheit zuspricht.

Indien ist par excellence das Land und die Heimat der „Schlangenbändiger". Viele dieser Zauberer führen ihrem Publikum Schlangen vor, bei denen die Giftzähne vor der Dressur sorgfältig entfernt sind. Aber es ist nicht zu leugnen, daß eine große Anzahl von Gauklern mit Kobras arbeitet, deren Giftapparat völlig intakt ist. Durch eingehende Kenntnis der Gewohnheiten ihrer Tiere, bis auf die kleinste Bewegung, gelingt es ihnen fast immer dem gefährlichen Biß rechtzeitig auszuweichen. Freilich werden auch sie manchmal vom Schicksal ereilt, jedes Jahr sterben einige dieser Wagehälse an den Folgen eines kleinen „Betriebsunfalls".

Man kann wohl mit Sicherheit behaupten, daß die Majorität der „professionels" auf diesem Gebiete es versteht, sich gegen das Schlangengift regelrecht zu immunisieren; die Leute lassen sich einfach von Zeit zu Zeit von ganz jungen Kobras beißen, die ja bei weitem nicht so gefährlich sind wie ausgewachsene Tiere. Auch in Frankreich sind uns Schlangenjäger bekannt, die das gleiche Verfahren einschlagen, um sich unempfindlich gegen den Biß unserer einheimischen Vipern zu machen.

Fräser [1]) (Edinburg) glaubt, daß öfteres Verschlucken kleiner Giftmengen, zu echter Immunität führen könne und er zitiert eine ganze Reihe von Versuchen an weißen Ratten und jungen Katzen, aus denen hervorgehen soll, daß lange fortgesetzte perorale Administrierung von Schlangengift diese Tiere absolut immun gegen mehrfach tödliche Dosen des gleichen Giftes macht. Er schließt daraus, daß, vermutlich, diese Art der Immunisierung auch von den Schlangenbändigern ausgeübt wird.

Ich muß bekennen, daß ich zu wiederholten Malen vergeblich versucht habe, die Richtigkeit der Fräserschen Angaben zu bestätigen. Es gelang mir bei Kaninchen, Meerschweinchen und Tauben ganz enorme Giftmengen per os einzuführen und ich bin auf diese Weise bis zu tausendfach tödlichen Dosen gelangt: nie habe ich mich im Gegensatz zum Verhalten des Abrins (Jequirity) und des Ricins (aus dem Samen von Ricinus communis) (Ehrlich) davon überzeugen können, daß das Serum solcher Tiere, wenn auch in bescheidener Weise antitoxisch ist. Nur ganz junge säugende Tiere resorbieren das Gift aus dem Darmtraktus in den Körperkreislauf; aber sie sind so empfindlich und sterben so regelmäßig nach Einnahme einigermaßen wirksamer Dosen, daß eine Immunisierung auf diesem Wege nur äußerst schwierig durchzuführen ist.

II. Künstliche aktive Immunisierung. Herstellung des Immunserums.

Schon 1887 hat Sewall [2]) in einer sehr bedeutsamen Arbeit über das Gift von Crotalus gezeigt, daß man Tauben allmählich immer widerstandsfähiger gegen Schlangentoxin machen kann, wenn man ihnen anfänglich ganz kleine Giftmengen subkutan beibringt, die in keinem Falle zu stärkerer Reaktion führen, und die Dosis ganz allmählich steigert. Tiere, die er auf diese Weise behandelt hatte, vertrugen, trotz ihrer originären sehr hochgradigen Empfänglichkeit, bis zu 10fach tödliche Dosen.

KAUFMANN[3]) gelangte etwas später mit dem Gift der französischen Kreuzotter zu gleichen Resultaten. Bei seinen Tieren ging aber die Gewöhnung nicht über die doppelte bis dreifache D. L. hinaus.

Ich selbst war 1892 in Saigon[4]), im Laufe meiner ersten Untersuchungen über das Kobragift, zu der Ansicht gelangt, daß durch wiederholte Injektion von erhitztem Gift bei Tieren eine gewisse Resistenz gegen Dosen zu erzielen ist, die für Kontrolltiere unfehlbar tödlich waren.

Fig. 1. Aus Pondichery: Wie eine Kobra zur Gewinnung des Giftes chloroformiert wird (I).

Vom Jahre 1894 ab, haben dann die Versuche die gleichzeitig im Pariser naturhistorischen Museum von PHISALIX und BERTRAND und im Institut Pasteur von mir angestellt wurden, präzisere Resultate nach dieser Richtung hin ergeben: sie zeigen einmal, daß es durch vorsichtige Immunisierung gelingt, Meerschweinchen und Kaninchen in hohem Maße giftfest zu machen; daß ferner Tiere, die mit Kobragift vorbehandelt

Fig. 2. Betäubung einer Kobra (II).

Fig. 3. Betäubung einer Kobra (III).

werden, später Viperngift oder anderes Schlangengift in mehrfach tödlichen Mengen anstandslos vertragen; und daß schließlich das Blutserum solcher geimpften Tiere Antikörper enthält, durch deren Einverleibung die Immunität auf normale Tiere übertragen werden kann.

Nach PHISALIX und BERTRAND, die damals ausschließlich mit Gift von Vipera berus arbeiteten, ist die beste Methode der Schutzimpfung

Fig. 4. Gewinnung von Schlangengift (Lachesis) im Institut von San Paulo (Brasilien).

für Meerschweinchen die, daß man das erstemal 0,0004 g eines 5′ auf 75° erhitzten Giftes injiziert und nach 48 Stunden die gleiche Dosis, aber nichterhitztes Gift, appliziert. Letztere Menge tötet Kontrolltiere mit Sicherheit in 6—8 Stunden.

Die Schutzimpfung gegen das viel toxischere Kobragift, gelingt sicher mit der von uns angegebenen Methode; sie besteht darin, daß

man mit der Injektion ganz kleiner Mengen beginnt, denen gleiche Teile einer 1%igen Chlorgold- oder Calciumhypochloricum-Lösung zugesetzt werden. Allmählich wird die Dosis gesteigert. Die Injektionen werden jeden 3.—4. Tag gemacht und das Gewicht des Tieres genau kontrolliert. Sinkt es, zeigen sich sonstige Morbititätssymptome, so unterbricht man die Behandlung und wartet bis alles wieder zur Norm zurückgekehrt ist. Nach vier Einspritzungen mit der Giftchlorgoldmischung wird das Chlorid fortgelassen und $^1/_2$ D.L. pur injiziert. 3—4 Tage später gibt man $^3/_4$ davon und nach abermals 3—4 Tagen die volle letale Dosis. Haben die Tiere erst diese Menge gut vertragen, dann kann man schneller steigern; nur muß man dabei die Empfänglichkeit und die Reaktion des Organismus durch sorgfältiges Wiegen ständig kontrollieren.

Im allgemeinen wird man drei Monate brauchen, um ein Kaninchen gegen die 20fache D.L. zu immunisieren. Nach sechs Monaten kann man ihm dann gewöhnlich 100 Dosen ohne weiteres zumuten.

Das Serum in dieser Weise behandelter Kaninchen gewinnt schon nach 5—6maligen Injektion $^1/_1$ tötlicher Dosis antitoxische Eigenschaften in vitro. Dieses Vermögen steigert sich allmählich bis zu einer Höhe und Intensität, wie wir sie bei Tieren, die gegen Diphtherie oder Tetanus immunisiert, zu sehen gewöhnt sind.

Fraser hat 1895[6]) diese Befunde bestätigt und in den medizinisch-chirurgischen Gesellschaft in Edinburg (15. Mai 1895) ein Kaninchen vorgestellt, das gegen die 50fache D.L. immunisiert war.

Von dem Gedanken ausgehend, daß es möglich sein müsse, sehr stark antitoxisch wirkende Sera herzustellen und sie praktisch in der Therapie des Giftschlangenbisses zu verwerten, unternahm ich es im Jahre 1895 eine Anzahl großer Tiere, und zwar Pferde und Esel zu immunisieren, um somit eine große Menge eines aktiven Serums zur Verfügung zu haben. Es gelang mir dabei, Pferde so kräftig zu immunisieren, daß sie 2 g trockenes Kobragift als Einzelgabe gut vertrugen, also ungefähr die 200fache D.L., da nach meinen Erfahrungen ca. 0,01 g genügt, um ein frisches Tier in 36—48 Stunden zum Exitus zu bringen.

Immunisierungen bis zu diesem Titre lassen sich indes nur mit Überwindung mancher Schwierigkeit durchführen. Viele Tiere gehen während der Behandlung an Endocarditis oder akuter Nephritis ein; bei anderen entstehen im Anschluß an jede Injektion große septische Abszesse, die entleert und drainiert werden müssen. Im Mittel wird man mit einem Zeitraume von 16 Monaten bis zur Erreichung eines genügend aktiven Serums rechnen müssen.

Wenn ein Pferd regelrecht immunisiert worden ist und 2 g trockenes Kobragift in einmaliger subkutaner Applikation ohne wesentliche Reaktionserscheinungen verträgt, kann man zur Blutentnahme schreiten, die dreimal in Abständen von fünf Tagen nach folgendem Operationsplan vorgenommen wird:

12 Tage nach der letzten Injektion des Antigens erster Aderlaß bis zu 8 Liter Blut.

5 Tage darauf zweiter Aderlaß = 6 Liter;

5 weitere Tage später letzte Entnahme = 6 Liter.

Im Ganzen werden also 20 Liter Blut in 10 Tagen gewonnen.

Danach läßt man bei ausgiebiger roborierenden Kost das Tier sich ausruhen, und zwar für drei Monate. Während dieser Zeit bekommt es noch zwei Einspritzungen von je 2 g Trockengift; am Ende des ersten

und in der Mitte des dritten Monats. Der Antitoxingehalt des Blutes hält sich auf diese Weise fast unverändert auf demselben Niveau.

Jedesmal muß das entnommene Blut sorgfältig auf seinen Titer hin bestimmt werden. Dies geschieht durch den Bindungsversuch im Reagenzglas einerseits, andererseits durch die Prüfung des Schutzvermögens im Tierversuch.

III. Titrierung der Schlangengift-Immunsera. Polyvalenz.

Ein Antiserum gegen Schlangengift kann als therapeutisch brauchbar angesehen werden, wenn eine Mischung von 2,5 ccm Serum mit 0,001 Kobragift beim Kaninchen keine Intoxikationserscheinungen macht, und wenn 2 ccm desselben Serums subkutan injiziert ein Kaninchen von ca. 2000 g vor der Wirkung einer zwei Stunden später erfolgenden gleichfalls subkutanen Injektion von 0,001 g Toxin vollkommen schützt.

Sehr bequem läßt sich auch der Antitoxingehalt eines solchen Immunserums so bestimmen, daß man diejenige Serummenge feststellt, die 0,0001 g Gift (in 1‰ Lösung) im Reagenzglase soweit neutralisiert, daß das Gemisch eine weiße Maus nicht mehr tötet. Im Höchstfalle darf diese Serummenge 0,03 ccm betragen, wenn das Serum als vollwertig gelten soll. Zieht man Meerschweinchen als Reaktionstiere vor, so besteht das Gemisch aus 0,005 g Gift + x Serum; dieses x soll hier höchstens = 1,2 ccm sein.

Die Prüfung des Schutzwertes wird am einfachsten am Kaninchen ausgeführt, indem man dem Versuchstier erst 2 ccm Serum z. B. in die rechte Ohrvene injiziert und zwei Stunden später in die linke 1 mg Gift. Letztere Dosis tötet Kontrolltiere in weniger als 30′ bei intravenöser und nach 2—3 Stunden bei subkutaner Injektion.

Diese rasch zum Ziel führende Methodik ist ebenso demonstrativ wie effektvoll, sie kann einem größeren Auditorium in Kursen und Vorlesungen im Zeitraum einer Stunde vorgeführt werden und gestattet eine schnelle und zuverlässige Orientierung über den Wert eines gegebenen Immunserums.

Ich rate bei eventueller Wiederholung dieses Versuches stets frisch bereitete Giftlösungen zu benutzen, denn ältere, etwa 8—14 Tage alte, verlieren, auch wenn sie sorgfältig steril behandelt werden, immer einen Teil ihres Toxins, so daß die vorher daraufhin berechnete Giftmenge die Kontrollen nicht in 30′, sondern beispielsweise erst in 1—2 Stunden tötet.

Die zur Titerbestimmung dienenden Giftlösungen werden folgendermaßen hergestellt:

Auf einer Präzisionswage wiegt man sich 0,1 g trockenes Kobragift ab und löst es in 10 ccm einer 0,8%igen Kochsalzlösung. Wenn das Gift sich vollständig aufgelöst hat, was nur wenige Minuten in Anspruch nimmt, wird die Lösung in ein Reagenzglas gefüllt und für $^3/_4$ Stunden in ein Wasserbad von 72° C gestellt. Dadurch fallen die nichttoxischen Albumine aus, ohne daß das Neurotoxin verändert wird. Man filtriert über steriles Papier und füllt das klare Filtrat sofort in kleine Ampullen, die in der Stichflamme zugeschmolzen werden, oder in sterile Kölbchen ab. Darauf wird das Präparat erst auf seine Toxizität (im Tierversuch) geprüft und dann vor Licht geschützt aufbewahrt.

Bei Zimmertemperatur hält es sich so unverändert 5—6 Tage; im Eisschrank bei ca. 0° entsprechend länger.

0,1 ccm dieser Lösung entsprechen genau 1 mg Trockengift.

Was das Immunserum anlangt, so wird es gleich nach der Feststellung seines Titers in entsprechender Weise durch Stehenlassen oder Zentrifugieren von Gerinnseln und Blutelementen befreit und unter den üblichen aseptischen Kautelen in Flaschen von 10 oder 20 ccm abgefüllt, ohne jeden Zusatz von Antisepticis. Um ganz sicher zu gehen, daß es sich tadellos hält, erhitzt man die hermetisch verschlossenen Fläschchen nachträglich noch im Wasserbade auf 58° eine Stunde lang und wiederholt dieses Manöver in den nächsten zwei Tagen.

So behandeltes Serum bewahrt seinen Antitoxinwert ungefähr zwei Jahre lang und in jedem Klima so gut wie unverändert. Es wird nur ganz langsam und allmählich schwächer. Bemerkenswert ist, daß es in dieser Beziehung viel beständiger ist als Diphtherie- und Tetanusserum.

Bei Eintrocknung im Vakuum und Einschmelzen in dunkelfarbige Glasampullen, hält es sich sozusagen unbegrenzte Zeit. Gewöhnlich wird es als Trockenpräparat zu 1 g abgeteilt. Im Bedarfsfalle genügt es, eine Dosis in 10 ccm abgekochten und wieder abgekühlten Wassers zu lösen, was ein paar Minuten dauert und injiziert die ganze Lösung subkutan wie frisches Serum.

Seit 1896 stellt das Institut Pasteur in Lille solches Schlangengiftimmunserum in großen Quantitäten her und verschickt es in der ganzen Welt. In letzter Zeit sind verschiedene Speziallaboratorien für die Herstellung dieser Sera gegründet worden, so in Bombay und Kasauli durch die Regierung von Britisch Indien, in Philadelphia durch Prof. Mac Farland, in Santos (Brasilien) von Dr. Vital Brazil.

Die mit Giften amerikanischer Viperiden hergestellten Sera sind unwirksam gegen das Toxin der giftigen Colubridenarten der alten Welt, was uns nicht weiter wundernehmen kann; denn wir haben gesehen, daß das Viperngift fast gar kein Neurotoxin enthält. Es wirkt blutgerinnend nur in relativ großen Mengen, so daß Unfälle durch Schlangenbiß in Amerika im ganzen recht selten sind.

Dagegen erweisen sich Sera, die mittels des Giftes großer Colubriden wie der indischen Kobra, hergestellt sind, überaus wirksam gegenüber allen vorwiegend neurotoxischen Schlangengiften; namentlich gegen die von Najas, Bungarus und den Elapinae im allgemeinen. Sie sind es auch gegen gewisse, schwach neurotoxische Viperidengifte, wie Cerastes und Vipera berus oder aspis. Schließlich binden sie, wie Metschnikoff experimentell nachgewiesen hat, sogar das Gift gewisser Skorpione. Das ist eine sehr wichtige Tatsache, die uns darauf hinweist, daß in einer großen Anzahl der verschiedensten animalischen Gifte ein neurotoxisches Prinzip von vermutlich mehr oder minder gleichbleibender Konstitution enthalten ist.

Nach den Untersuchungen von C. J. Martin[7]) und denen von Lamb[8]) sollen die Gifte der australischen Giftschlangen und das von Duboia Russelii einer indischen Vipernart, eine besondere Gruppe bilden, gegen welche mit Elapinaegift gewonnenes Immunserum unwirksam ist.

Diese Ansicht wird, was die australischen Giftsorten anlangt, durch eine Beobachtung von G. Bill[9]) anscheinend widerlegt. Die Frage erfordert also weitere eingehende Untersuchungen. Vielleicht enthalten

die eben erwähnten Gifte neben dem Neurotoxin noch ein Blutgift, wie die amerikanischen Schlangengifte, die ja wiederum gar nicht neurotoxisch wirken. Wenn sich diese Hypothese bestätigen sollte, so wäre es sehr einfach, Pferde erst mit einem stark neurotoxischen Gift wie Kobra und dann mit verschiedenen australischen oder amerikanischen Giften zu behandeln. Man würde auf diese Weise polyvalente Sera herstellen können, die gleichzeitig gegen Neurotoxin und Hämorrhagin aktiv wären und in allen Gegenden benutzt werden könnten.

Die für die Immunisierung von Serumtieren anzuwendende Methode bleibt ganz die gleiche: es muß nur dafür gesorgt sein, daß immer genügend Impfmaterial vorhanden ist, um den einmal erreichten Antitoxinwert nicht sinken zu lassen. Es wäre sehr wünschenswert, daß sich die sanitätspolizeilichen Instanzen aller irgendwie interessierten Länder mit diesem Problem befaßten. Seine Lösung bedeutet für so und so viele Existenzen, die jährlich dem furchtbaren Gift erliegen, Rettung und Genesung.

IV. Die Antikörper des Schlangengiftimmunserums.

Zwischen dem hämolytischen Wert eines Schlangengiftes und seiner neurotoxischen Wirkung auf den Organismus besteht ein deutlicher Parallelismus. Wir haben im ersten Abschnitt gesehen, daß alle diese Gifte die roten Blutzellen bestimmter Warmblüter mehr oder minder energisch auflösen. Am empfindlichsten sind die Erythrozyten von Mensch, Ratte und Pferd; am widerstandsfähigsten dagegen die von Kaninchen, Ziege und Rind. Ich[10]) habe nachgewiesen, daß für das Zustandekommen der Hämolyse auch an den empfindlichen Erythrozytenarten, frisches oder erhitztes Normalserum unbedingt notwendig ist; gewaschenes, serumfreies Blut wird durch das Gift nicht verändert. Preston Kyes[11]) hat dann dieses Phänomen sehr befriedigend durch den Nachweis geklärt, daß der Giftstoff dabei die Rolle des Ambozeptors (im Sinne Ehrlichs) spielt, der sich mit dem Lecithin des Serums zu einem hämolytisierenden Lecithid verbindet.

Um praktisch den antihämolytischen und damit auch den antitoxischen (antineurotoxischen) Wert eines Immunserums zu prüfen, läßt man verschiedene Mengen davon in Mischung mit einer konstanten Giftmenge auf ein gleichbleibendes Quantum defibrinierten Pferde- oder Rattenbluts einwirken. Ich selbst benutze zu diesem Zweck eine 5 %ige Aufschwemmung von defibriniertem Pferdeblut, von der ich je 1 ccm in eine Reihe Reagenzgläser abfülle. Dazu kommt dann das zu prüfende Serum und zwar ins erste Röhrchen 0,1 ccm, ins zweite 0,2 usf. bis 1,0 ccm. Ein Kontrollröhrchen erhält kein Serum. Dann bringe ich in alle Gläschen je 1 mg Gift in Form einer 1 ‰ Lösung in physiologischer (0,8 %iger) Kochsalzlösung. Bei einer Temperatur von 16° beginnt die Hämolyse im Kontrollröhrchen nach 15—20 Minuten. In den anderen geht sie um so langsamer vor sich, je mehr Serum zugesetzt worden war. Man notiert sich, in welchen Gläschen dies nicht länger als zwei Stunden in Anspruch nimmt.

Die Erfahrung lehrt nun, daß ein Immunserum als therapeutisch brauchbar angesehen werden kann, wenn 0,5 ccm die hämolytische Wirkung von 1 mg Kobra-, oder 0,7 ccm die von der gleichen Menge)0,001 g) Lachesis oder V. berus-Gift zu verbinden imstande ist.

Das antiproteolytische Vermögen wird, nach einer ganz ähnlichen Methode, ebenfalls sehr einfach bestimmt. Eine genügende Anzahl von Reagenzgläsern wird mit gleichen Mengen 20 %iger Gelatine, die zwecks Ausschaltung von Fäulnisvorgängen mit etwas Thymol versetzt ist, beschickt. Bei Brutofentemperatur werden steigende Antitoxinmengen und schließlich je 1 mg Gift hinzugefügt. Man läßt die Röhrchen 6 Stunden bei 38° stehen und kühlt sie dann in kaltem Wasser rasch ab. Man stellt fest, in welchen Röhrchen die Gelatine wieder erstarrt, also nicht angedaut worden ist und bestimmt so ganz direkt die Menge des gegebenen Serums, die die Proteolyse erfolgreich verhindert hat.

Das Immunserum schützt auch Plasma, dessen natürliche Gerinnung durch Zusatz der bekannten Substanzen, ausgeschaltet ist, von der Koagulierenden Einwirkung des Schlangengiftes. Um dies zu zeigen mischt man 0,5 ccm Immunserum mit einem Salzgehalt von 4 % und 1 ccm präpariertes Plasma von gleichem Salzgehalt. Fügt man hierher 1 mg Kobragift, so bleibt jede Wirkung aus. Nach 2 oder mehr Stunden genügten 2 ccm destillierten Wassers, um vollkommene Gerinnung herbeizuführen.

Durch eine Reihe äußerst sinnreich angeordneter Versuche hat in letzter Zeit Morgenroth[12]) Licht in den Mechanismus der Bindung zwischen Schlangengift und dessen Antitoxin gebracht. Er hat gezeigt, daß man durch Behandlung von Schlangengift in wässeriger Lösung mit Salzsäure bei mittlerer Temperatur, das Hämolysin so verändern kann, daß es nicht mehr spezifisches Antitoxin, wohl aber noch Lecithin findet, mit dem es der Kyessche Lecithid gibt. Durch Neutralisation wird das Gift in seinen ursprünglichen Zustand übergeführt.

Es gelingt nicht das Gift zu regenerieren, wenn man den Antikörper vor der Ansäuerung zusetzt.

Die Kombination Gift-Lecithin ist nicht imstande Antikörper zu binden, während es das reine Gift sehr wohl tut. Fügt man zu Schlangengift - Schlangengiftantitoxingemischen Lecithin in geeigneten Mengen hinzu, so gelingt es fast die ganze Giftmenge aus dem Gemisch in Form des stark hämolysierenden Lecithids wiederzugewinnen, während das Antitoxin unwirksam bleibt.

Daraus geht hervor, daß das Gift eine bedeutend größere Affinität zum Lecithin als zu seinem Antitoxin hat.

Jedenfalls ergibt sich, wie ich schon 1895 mit einer anderen, weniger vollkommenen Methodik dargetan habe, die Tatsache daß, wenn es sich in Toxin-Antitoxingemischen aus der Reihe der Schlangengifte überhaupt um chemische Bindungen diese labil sind.

V. Serumtherapie der Schlangenvergiftung.

Der Anwendung von Immunserum in der Therapie des Giftschlangenbisses stehen keinerlei Schwierigkeiten im Wege, da es sich nur darum handelt, möglichst rasch nach dem Biss eine genügend große Dosis des Serums unter die Haut der Bauchgegend oder der Schulterblätter einzuspritzen.

Meist sind 10 ccm bei weitem ausreichend, um in den ersten 2 Stunden nach dem Biss den Tod zu verhüten.

Ist die Verletzung schon älter oder rührt sie von einer besonders gefährlichen Art her, wie in Indien Naja oder Bungarus, so tut man besser, dem Verletzten gleich zwei, sogar drei solche Injektionen zu machen. In den Fällen, in denen bereits die Symptome einer schweren Intoxikation sich manifestieren und die Asphyxie einen bedrohlichen Grad erreicht, darf man nicht zögern 10—20 ccm direkt intravenös zu geben. Am bequemsten ist einem da eine Hautvene der Ellenbeuge, des Handgelenks oder des Handrückens.

Gefährlich ist die intarvenöse Seruminjektion keineswegs, wenn man den Eintritt von Luftblasen oder kleinen Fibringerinnseln in die Blutbahn vermeidet.

Es hat nur dann Zweck die intravenöse oder subkutane Injektion zu wiederholen, wenn die Allgemeinsymptome stärker zu werden scheinen. Gewöhnlich tritt schon wenige Minuten nach der ersten Einspritzung bedeutende Erleichterung ein: Wundschmerz, Erregung, Spasmen und Übelkeit schwinden allmählich. Die Besserung schreitet rasch vorwärts und am anderen Tage ist alles wieder in Ordnung.

Ich habe durch zahlreiche Versuche festgestellt, daß die zur passiven Immunisierung resp. Heilung eines Tieres erforderliche Menge von dem spezifischen Serum umso größer ausfällt, je empfindlicher das Tier gegen Schlangengift ist.

Bei Versuchen an Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen sieht man z. B., daß man einer Maus 1 ccm Serum injizieren muß, um sie gegen 0,0001 g Kobragift — was für dieses kleine Tier die 5fache D. L. darstellt — zu schützen; während in vitro schon 0,3 ccm desselben Serums ausreichen, um das gleiche Giftquantum zu neutralisieren.

Um ein Meerschweinchen von 500 g gegen Intoxikation mit 0,001 g Kobragift erfolgreich zu schützen, sind 3 g Immuntrockenserum nötig. Dieselbe Serummenge genügt nun, um ein 2 kg schweres Kaninchen vor einer Vergiftung mit dem gleichen Giftquantum zu schützen, weil eben 0,001 g, für dieses Tier nur die doppelte Dosis letalis bedeuten.

Spritzt man den Tieren zuerst das Gift und zwar in solcher Menge, daß Kontrolltiere von gleichem Gewicht in 2—3 Stunden eingehen, und erst 15 Minuten später das Serum ein, so ist die Menge des letzteren in diesem Fall fast dreimal so groß, als die zur Neutralisierung der gleichen Giftmenge im Reagenzglase notwendige. Es ist festgestellt worden, daß im allgemeinen die Menge Heilserum, die ein vergiftetes Tier erhalten muß, um nicht zu erliegen, seinem Gewicht **umgekehrt proportional** ist.

Besonders demonstrativ sind nach dieser Richtung die Untersuchungen von C. Guerin[14]) an Hunden.

Ein Hund von 12 kg wird mit 0,009 g Kobragift geimpft. Die Kontrolltiere gehen nach 5—7 Stunden ein. Das Versuchstier wird völlig wieder hergestellt, wenn man ihm 2 Stunden nach der Impfung 10 ccm Heilserum einspritzt.

Wartet man drei Stunden, so sind bereits 20 ccm erforderlich. Nach mehr als drei Stunden ist es nicht mehr möglich, das Tier zu retten.

Diese Tatsachen beweisen:

1. Bei gleicher Dosis des wirksamen Giftes muß diejenige Menge Immunserum, die die Vergiftung verhüten kann, um so größer sein, je empfindlicher das Tier gegen Schlangengift ist.

2. Für eine bestimmte Tierart und eine bestimmte Giftmenge ist die schützende Serumdosis um so größer, je älter die Vergiftung ist.

Daraus ergibt sich, daß ein Mensch von 60 kg, wenn er beim Biss beispielsweise 0,02 g Virus in seine Gewebe erhält (es ist dies ein Mittel, die Menge Trockengewicht —, die eine starke Kobra imstande ist zu applizieren), nur so viel Serum zu bekommen braucht, wie notwendig wäre, um den Überschuß über die gerade nicht mehr letale Giftdosis zu neutralisieren.

Im allgemeinen ist für einen Menschen von 60 kg eine Vergiftung mit 0,014 g Kobragift tödlich. Man würde also in unserem Falle soviel Serum zu geben haben, wie ausreicht, 0,02—0,014 g = 0,006 g Gift zu neutralisieren; mit anderen Worten 16 ccm Immunserum, wenn die Injektion sofort nach dem Biss erfolgt und unter der Voraussetzung, daß das Serum im Verhältnis von 2,0 : 0,001 in vitro bindet.

Diese experimentell festgestellten Zahlen zeigen, wie wenig Serum erforderlich ist, um die natürliche Resistenz der Menschen gegen Schlangengift in genügendem Maße zu verstärken.

So genügen eben bei der Behandlung frischer Bissverletzungen Injektionen von 10—20 g, um fast sicher Heilung herbeizuführen. Der klinische Beweis hierfür ist übrigens für die zahlreichen Beobachtungen erbracht, die in den letzten 8 Jahren in der wissenschaftlichen Literatur aller Länder niedergelegt worden sind.

(Siehe Literatur Bd. I, pag. 310.)

Antikörper gegen pflanzliche Toxine.

XV.

Antiricin, Antiabrin, Anticrotin.

Von

Prof. M. Jacoby

in Berlin.

Das Antiricin.

Das Antiricin ist von P. EHRLICH unmittelbar im Anschluß an BEHRINGS Entdeckung des Tetanus- und Diphtherieantitoxins im Jahre 1891 gefunden worden. Die Technik seiner Darstellung — wenigstens wenn hochwertige Sera in Frage kommen — ist insofern nicht ganz einfach, als es sich um ein sehr starkes und bis zu einem gewissen Grade etwas unberechenbares Gift handelt.

EHRLICH bemerkte sofort, daß ohne Steigerung der Dosis ein Höhertreiben des Antitoxingehaltes nicht gelingt. Die Einleitung der Immunisierung und der Antitoxinanhäufung im Serum wird erleichtert, wenn man mit der Darreichung des Ricins per os beginnt. Ricin wirkt auch bei der Zufuhr vom Magendarmkanal aus toxisch, wenn auch die letale Dosis ungefähr 100mal höher liegt als bei der subkutanen Injektion.

Bei der stomachalen Behandlung gelingt es — solche Versuche sind bei Mäusen, Kaninchen und Ziegen angestellt worden — eine nicht sehr erhebliche aber doch sichere Immunität und einen gewissen Antitoxingehalt des Serums zu gewinnen. Allmählich, d. h. nach einigen Wochen geht man dann zur subkutanen Injektion über und beginnt ungefähr mit der Hälfte der letalen Dosis, die bei genügender Vorbehandlung nur noch lokale Veränderungen hervorruft. Es sei gleich hier hervorgehoben, daß die lokalen Veränderungen nekrotischer Art gewöhnlich auch bei hochimmunen Tieren beobachtet werden. Es ist jedoch möglich, daß bei diesen Tieren eine etwas größere Resistenz des subkutanen Gewebes als bei normalen Tieren besteht. In Abständen von ungefähr einer Woche geht man dann allmählich zu höheren Dosen über. Gewöhnlich beginnt ungefähr 24 Stunden nach einer neuen Injektion ein Gewichtsverlust. Niemals darf man ein Ricinantitoxin ohne Gewichtskontrolle herstellen. Ergeben die täglichen Wägungen, daß nicht spätestens am Ende einer Woche ein Stillstand in der Abnahme und

bald eine wenigstens teilweise Wiederherstellung der früheren Gewichtsgrenze eintritt, so ist Gefahr im Verzuge.

Handelt es sich darum, ein Antitoxin herzustellen und ist bereits eine brauchbare Höhe der Immunität erreicht, so tut man in solchem Falle gut, das Tier zu verbluten, um das Serum zu retten. Sonst setzt man sich der Gefahr aus, daß das Tier in der Nacht stirbt und das Serum verloren geht. Sehr zweckmäßig erwies sich mir bei zahlreichen Immunisierungen mit Ricin und anderen Toxinen, bei denen ähnliche Schwierigkeiten bestehen, ein mir von Herrn Geheimrat Ehrlich gelegentlich erteilter Rat, der sich auch auf unangenehme Erfahrungen mit dem Ricin gründete. Wie stets bei Immunisierungen ist es auch hier natürlich zweckmäßig, mehrere Tiere gemeinschaftlich zu behandeln. Es empfiehlt sich aber nach Ehrlich, der Mehrzahl der Tiere wenigstens ein Individuum zeitlich vorauszuschicken. Es gibt nämlich besonders in den höheren Zonen der Immunität anscheinend kritische Punkte, bei denen eine etwas unvorsichtige Steigerung der Dosis, zu der man gerade bei längerer Immunisierung gern geneigt ist, sich als sehr gefährlich erweist.

Ein als Vorposten dienendes Tier kann dann zum willkommenen Warner werden. Hat man überhaupt erst im Laufe einiger Monate einen hohen Grad von Immunität erreicht, so ist es ohne Bedeutung, die Immunisierung allzulange weiter treiben zu wollen, da dann nur sehr allmählich noch eine Steigerung der Antitoxinwerte eintritt.

Mit dem Auftreten des Antitoxins geht bei der Immunisierung das Erscheinen eines Antikörpers gegen die agglutinierende Ricinwirkung parallel, es tritt ein Antiagglutinin im Serum auf, das ebenfalls von P. Ehrlich (1897) entdeckt worden ist. Im allgemeinen scheint ein ganz bestimmtes Verhältnis zwischen den beiden Antikörpern insofern immer obzuwalten, als immer dieselbe Quantität Serum nötig ist, um die Allgemeinwirkung wie um die agglutinierende Ricinwirkung vollständig aufzuheben. Nach meinen bisherigen Erfahrungen scheint sich daran auch selbst dann nichts zu ändern, wenn das immunisierende Material durch irgend welche Eingriffe so verändert war, daß es nur eine der beiden Wirkungen erkennen ließ. Zunächst muß es daher noch dahingestellt bleiben, ob es überhaupt ein besonderes Antitoxin und Antiagglutinin gibt oder ob es sich nur um die Wirkungen ein und desselben Körpers handelt.

Bei der Immunisierung mit Ricin ist noch ein anderes Antikörperphänomen zu beobachten, nämlich eine Art Präzipitinreaktion. Während normales Serum mit Ricin nur einen sehr geringen Niederschlag gibt, erhält man beim Mischen von Ricin mit Immunserum einen sehr erheblichen Niederschlag. Wie immer bei den Präzipitinreaktionen, müssen auch hier Überschüsse vermieden werden, wenn man einen maximalen Ausfall der Reaktion erzielen will. Aus verschiedenen Beobachtungen geht hervor, daß an dem sich bildenden Niederschlag in erheblichem Maße Serumeiweißkörper beteiligt sind. Hat man nun ein besonders hochwertiges Serum — derartige Beobachtungen habe ich an einer über $1^1/_2$ Jahre immunisierten Ziege gemacht — in dem bereits in einem geringen Bruchteil eines ccm ein hoher Antitoxingehalt sich findet, so kann in diesem Falle bei dem Zusammenbringen einer Ricindosis mit einer bestimmten Antitoxinquantität der Niederschlag bedeutend geringer ausfallen, als wenn dieselbe Ricindosis mit derselben Antitoxinmenge in einer in bezug auf die Antikörper weniger konzentrierten Lösung, also in

einer größeren Serumquantität zusammengebracht wird. Auch scheinen die Ausschläge bei den einzelnen Spezies verschieden intensiv zu sein.

Die Methodik der Antiricingewinnung und Antiricinwirkung besitzt eine wissenschaftliche Begründung in den Beobachtungen Ehrlichs aus dem Jahre 1891. Der Ausgangspunkt für Ehrlichs Studien über die Immunität gegen Ricin waren seine Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution und der biologischen Wirkung von Substanzen. Es schien ihm die Hoffnung zu bestehen, hier von den dunklen Bakteriengiften eine Brücke zu finden zu den Alkaloiden und den noch einfacheren Substanzen der synthetischen Chemie. Es braucht hier nicht angeführt zu werden, daß wir diesem großen Ziele uns auch heute noch nicht wesentlich genähert haben, daß wenigstens die Phytotoxine in dieser Beziehung noch nichts der Wissenschaft geleistet haben. Höchstens indirekt insofern, als Untersuchungen, wie die wichtigen Beobachtungen von Obermayer und Pick sich in langer, aber doch kontinuierlicher Kette an die von Ehrlich gegebenen Ausgangspunkte angliedern.

Nun sollen noch kurz die wichtigsten Gesetzmäßigkeiten registriert werden, die Ehrlich auffand. Gleich bei den ersten immunisierenden Dosen kann man beobachten, daß bis zum Auftreten der Immunität und dem Erscheinen des Antitoxins im Serum eine ganz feste Inkubationszeit verstreicht. Förmlich kritisch am sechsten Tage nach der Zufuhr der immuniserenden Dosis beginnt die Immunität. Ganz ähnlich kritisch findet man das Antitoxin im Serum nach Ablauf einer Inkubations- oder Latenzperiode. Gleich die durch die erste Immunisierung erreichte Immunität kann so groß sein, daß die 13fache letale Dosis nunmehr ertragen wird. Ehrlich hat dann genau den Verlauf der Immunität verfolgt und festgestellt, daß bei der Immunisierung durch Fütterung die Kurve der Immunität etwa dem Typus der Parabel entspricht.

Zur Veranschaulichung der Ehrlichschen Befunde wollen wir einige der wichtigen Versuche im Original hier wiedergeben.

Das Ricin wurde den Versuchsmäusen in Cakesmasse dargereicht. Die Cakes wurden fein verrieben und mit dem gerade nötigen Minimum wäßriger. Rizinlösung (3,2—3,5 ccm pro Cakes) zu einem steifen Teig verrührt, der gerollt und in kleine Würfel geschnitten wurde, die auf Drahtgittern rasch austrockneten. Nachdem festgestellt war, daß eine Menge von 0,02 Ricin pro Cakes gerade noch ertragen wurde, dagegen eine solche von 0,035 g im Laufe von 5—6 Tagen tödlich wirkte, wurde der Einfluß schrittweise gesteigerter Ricindosen ermittelt.

10. Juni 1890 0,002	30. Juni 1890 0,12	21. Juli 1890 munter, aber starke Diarrhöe, ausgesetzt
12. „ 1890 0,004	2. Juli 1890 0,14	22. Juli 1890 0,28 vollkommen erholt
13. „ 1890 0,006	4. „ 1890 0,16	24. Juli 1890 0,30
14. „ 1890 0,008	5. „ 1890 0,18	26. „ 1890 0,33
16. „ 1890 0,01	8. „ 1890 0,21	28. „ 1890 0,32
17. „ 1890 0,0125	10. „ 1890 0,24	29. „ 1890 0,35
18. „ 1890 0,015	11. „ 1890 0,27	2. Aug. 1890 0,36
19. „ 1890 0,02	13. „ 1890 0,30	3. „ 1890 0,38
20. „ 1890 0,03	14. „ 1890 0,33	4. „ 1890 0,40
21. „ 1890 0,04	16. „ 1890 0,37	5. „ 1890 0,45
22. „ 1890 0,05	17. „ 1890 wiegt 12,5 g	6. „ 1890 0,5 wiegt
23. „ 1890 0,06	18. „ 1890 0,40	
25. „ 1890 0,08	19. „ 1890 0,43	
26. „ 1890 0,1		
28. „ 1890 0,11		

7. August $1^3/_4$ Uhr 0,002 Ricin injiziert, abends matt.
8. August munterer als gestern, aber nicht normal.
9. August gestorben.

Sektion: Därme mit dünnen Massen gefüllt. Keine Blutungen, Injektionsstelle nicht ganz reaktionslos.

Um zahlenmäßig den Gang der Immunität zu verfolgen, ging Ehrlich folgendermaßen vor. Es wurden sechs verschiedene Versuchsreihen angestellt. Damit kleine Differenzen, die durch Rasse, Alter und individuelle Verschiedenheiten bedingt sein können, sich nicht störend bemerkbar machen, umfaßte jede Versuchsreihe immer eine größere Anzahl von Mäusen. Die Ernährung der Mäuse erfolgte gleichmäßig so, daß bis zum 10. Tage die in Cakes enthaltene Ricinmenge in Milligramm ausgedrückt, der Zahl des Versuchstages entsprach.

Tabelle.

Zahl des Versuchstages	Letzte verfütterte Dosis in mg	Anzahl der Versuchstiere	Maximal ertragene Injektionsdosis	Höhe der erreichten Immunität	Bemerkungen
IV	4	8	—	1,0	Alle unter $^1/_{200000}$ gelegenen Dosen töten
V	5	16	$^1/_{150000}$	1,3	Kleine Rückennekrose
VI	6	23	$^1/_{15000}$	13,3	Ausgedehnte Rückennekrose
VII	7	5	$^1/_{20000}$	10,0	Kleine Rückennekrose
VIII	8	18	$^1/_{10000}$	20,0	Minimale Rückennekrose
X	12	9	$^1/_{5000}$	40.0	Geringe Rückennekrose
XII	20	3	$^1/_{3000}$	66,6	Leichte Nekrose des Rückens
XV	50	1	$^1/_{2000}$	100,0	—
XVIII	80	4	$^1/_{1000}$	200,0	Mäßige Nekrose d. rechten Seite
XX	80	1	$^1/_{500}$	400,0	Nekrose der Bauchoberschenkelgegend

Bei der Besprechung des Ricins als Antigen haben wir die Beziehung des Agglutinins zu dem Allgemeinwirkungen hervorrufenden Toxin, das wir der Kürze halber nach Analogie anderer derartiger Toxine Neurotoxin nennen wollen, noch nicht berücksichtigt. Es schien zweckmäßig, das erst an dieser Stelle nachzuholen. Wie wir schon gesehen haben, entsteht bei der Immunisierung mit Ricin nach den Beobachtungen Ehrlichs, neben dem Antitoxin auch ein Antiagglutinin. Fraglich blieb, ob das Agglutinin und das Neurotoxin eine einheitliche Substanz ist oder ob es sich um ein Gemisch zweier Substanzen handelt. Franz Müller fand, daß bei der Einwirkung von Pepsinsalzsäure auf Ricin sehr bald die Agglutinationswirkung abgeschwächt wird, während das Neurotoxin erhalten bleibt. Bei der ins einzelne gehenden Prüfung der Sachlage stellte ich folgendes fest. Wenn man Ricin mit Pepsinsalzsäure im Brutschrank behandelt und die Einwirkung in einem Zeitpunkt unterbricht, an dem die neurotoxische Wirkung noch vollkommen erhalten ist, so ist bei vorläufiger Betrachtung keine Agglutinationswirkung mehr nachweisbar. Neutralisiert man nun aber mittels antitoxischen Serums die neurotoxische Wirkung, so bemerkt man, daß man noch ebenso viel Serum dazu braucht als vor der Einwirkung der Pepsinsalzsäure auf das

Ricin. Man überzeugt sich dabei, daß das Agglutinin durch die Pepsinsalzsäure nicht restlos beseitigt ist. Man sieht beim Vergleich sofort, daß eine in bezug auf das Neurotoxin neutrale Pepsin-HCl-Ricin-Serummischung vollkommen indifferent für Blutkörperchen ist, während die Blutkörperchen durch das angedaute Ricin ohne Serumzusatz doch ein wenig agglutiniert werden. Zur Erläuterung gebe ich einen Versuch aus meiner Mitteilung über Ricinimmunität wieder.

Versuch.

0,35 g Mercksches Ricin werden fünf Tage im Brütschrank mit hochwirksamer Pepsinsalzsäure behandelt, dann wird neutralisiert, mit Ammonsulfat eine Salzsättigung von 60% hergestellt, der entstehende Niederschlag mit entsprechender Salzlösung gewaschen und schließlich in 90 ccm einer 10%igen Kochsalzlösung gelöst.

Diese Lösung müßte, wenn kein Gift verloren gegangen ist, in 1 ccm 39 mg Ricin enthalten, die kleinste, schnell tödliche Dosis müßte 0,13 ccm pro Kilogramm Kaninchen betragen, da sie beim Ausgangsmaterial 0,5 mg beträgt, die kleinste agglutinierende etwa 0,06—0,07 ccm, da sie beim Ausgangsmaterial 0,2 mg beträgt.

Der Versuch ergab aber völlig andere Verhältnisse, indem erst 5 ccm der Lösung merklich agglutinierten, während die Tierversuche folgende Resultate ergaben.

1. Kaninchen von 1250 g erhält am 6. Mai mittags 1 ccm oder 0,8 ccm pro Kilogramm.

7. Mai 1172 g, 8. Mai 1002 g. Das Tier wird tot gefunden, die Sektion ergibt einen ganz typischen Ricinbefund.

2. Kaninchen von 1065 g enthält am 7. Mai vormittags 0,4 ccm oder 0,38 ccm pro Kilogramm.

8. Mai 1002 g. Das Tier stirbt am 8. Mai abends nach stundenlangen Krämpfen. Das Endgewicht beträgt 923 g, der Sektionsbefund ist ganz typisch.

3. Kaninchen von 1177 g erhält am 8. Mai 0,2 ccm oder 0,17 ccm pro Kilogramm.

9. Mai 1045 g., 10 Mai 1024 g, das Tier wird tot gefunden, der Sektionsbefund ist ganz typisch.

4. Kaninchen von 1264 g erhält am 9. Mai vormittags 0,1 ccm oder 0,08 ccm pro Kilogramm.

10. Mai 1154 g, 12. Mai 1064 g, 14. Mai 955 g, 15. Mai 973 g, das Tier wird tot gefunden, der Sektionsbefund ist nicht typisch.

Die eben noch schnell tödliche Dosis liegt also nicht über 0,17 ccm, entspricht also dem Resultat (0,13 ccm), welches zu erwarten wäre, wenn alles Gift noch vorhanden ist: im Gegensatz zur agglutinierenden hat also die Giftwirkung nicht abgenommen.

Nunmehr wurde untersucht, wieviel Immunserum nötig war, um unser Gift zu neutralisieren.

Es wurde ein Antitoxin benutzt, von dem genau 1 ccm genügte, um 1 mg nicht vorbehandeltes Ricin (entsprechend 0,26 ccm der Pepsinricinlösung gänzlich zu neutralisieren.

Neutralisationsgrenze für das Agglutinin:
5 ccm Pepsinricin und 1 ccm Antitoxin — keine Agglutination,
6 ccm Pepsinricin und 1 ccm Antitoxin — deutliche Agglutination.

Neutralisationsgrenze für das Toxin.

Es werden gemischt 1 ccm Antitoxin mit:

0,5 ccm Pepsinricin	keine Gewichtsabnahme der Versuchstiere
1 " "	
3 " "	
4 " "	
5 " "	
6 " "	18 % Abnahme
7 " "	19 % Abnahme
8 " "	19 % Abnahme

Wie eigenartig kompliziert die Verhältnisse liegen, das lehrt auch folgender Versuch, den ich meiner zweiten Mitteilung über Ricinimmunität entnehme.

Versuch.

In ein Meßgefäß werden 10 ccm 10 %iger Kochsalzlösung getan, in der 0,1 g Ricin und 0,5 g Natrium citricum gelöst sind. Dazu fließt aus der Carotis eines Kaninchens Blut, bis die Gesamtflüssigksit 50 ccm beträgt. Dann wird das Gemenge gut durchgeschüttelt, zentrifugiert. Man erhält über den fest zusammengebackenen Blutkörperchen 40 ccm klare Flüssigkeit.

0,5 ccm des Plasmas tötet 1 kg Kaninchen in 36—48 Stunden. Das Plasma agglutiniert nicht. (In dieser Versuchsreihe wurde bei den verendeten Tieren ein typischer Ricinbefund festgestellt, der bei anderen Versuchsreihen nicht immer sicher war.) — Im ganzen kamen in dem Versuch 333 schnell tötende Dosen (0,3 mg dieses Ricins ist die pro Kilo schnell tötende Dosis) zur Verwendung, von denen also in den 40 ccm Plasma sich etwa der vierte Teil fand.

Ein Kaninchen von 1960 g erhält steigende Dosen eines agglutininfreien Plasmagiftes, von dem etwa 1 ccm die letale Dosis für 1 kg Kaninchen enthält.

Es erhält am	3. Dez.	1 ccm;	Gewicht	1960 g
"	10. "	2 "	"	1965 "
"	11. "	4 "	"	1908 "
"	15. Jan.	8 "	"	1765 "
"	22. "	16 "	"	1830 "

Am 3. Februar wiegt es 1855 g, es wird verblutet und das Serum durch Zentrifugieren gewonnen.

1 ccm des erhaltenen Serums hob die agglutinierende und toxische Wirkung von 0,5 mg Ricin vollkommen auf, während schon bei viel geringerer Menge, wie das bei derartigen Neutralisationsversuchen die Regel ist, eine erheblich verzögernde Wirkung der Antikörper sich geltend machte.

Das Zusammenbringen von Ricin mit Blutkörperchen nimmt also auch immer einen Teil des Neurotoxins aus der Lösung, vollständig aber

das Agglutinin. Trotzdem die Lösung kein nachweisbares Agglutinin mehr enthält, so bildet sie immunisatorisch dennoch ebenso Antiaglutinin wie Antitoxin. Besonders merkwürdig war, daß sogar quantitativ die beiden Antikörperwirkungen parallel gingen.

Das Antiabrin.

Das meiste, was für das Antiricin gilt, läßt sich mutatis mutandis auf das Antiabrin übertragen. Besonderes Interesse haben die interessanten immunisatorischen Phänomene, die sich nach den Beobachtungen Ehrlichs und Roemers hier besser als beim Ricin an den Augen der Versuchstiere studieren lassen. Wie wir in dem Abschnitt über das Abrin gesehen haben, hat dieses Gift eine ausgesprochene Reizwirkung auf das Auge.

Roemer fand nun im Anschluß an Ehrlichs grundlegende Versuche, daß bei allmählicher Immunisierung, die an einem Auge durch lokale Zufuhr des Giftes in kleinen, vorsichtig steigenden Dosen vorgenommen wird, zuerst dieses Auge, also früher als der übrige Körper immun wird. Später kommt es dann zur allgemeinen Immunität, zum Auftreten von Antiabrin im Serum und nunmehr erweist sich bei lokaler Vergiftung auch das nicht vorbehandelte Auge als immun.

Roemer hat auch eine sehr elegante Prüfungsmethode für die Wertbestimmung des Antiabrins ausgearbeitet, bei der er die Wirkung des Abrins auf das Auge als Indikator benutzt. Bei der Immunisierung gegen Abrin fand Roemer das Antiabrin in der Milz und im Knochenmark früher als im Serum der Versuchstiere.

Aus den Untersuchungen Hausmanns geht hervor, daß in bezug auf das Agglutinin und die Präzipitinreaktion sich im allgemeinen dieselben Verhältnisse finden wie beim Ricin.

Antiricin und Antiabrin fand Ehrlich durchaus spezifisch und leitete daraus einen Beweis für die Spezifität der beiden Antigene ab.

Das Anticrotin.

Die Giftigkeit des Crotin steht, wie wir in dem Abschnitt über Antigene gesehen haben, erheblich hinter der des Ricins und des Abrins zurück und unterliegt außerdem besonders individuellen Schwankungen. Crotin und Anticrotin sind daher für Tierversuche nur in begrenztem Umfange verwertbar.

Sehr nützlich erweist sich aber das Crotin insofern, als man, wie Morgenroth zuerst beschrieben hat, mit seiner Hilfe jederzeit ein antihämolytisches Serum darstellen kann. Injiziert man Kaninchen zunächst mg-Dosen, dann cg-Dosen von Crotin subkutan, so erhält man sehr bald ein Serum, das ausgezeichnete antihämolytische Wirkungen entfaltet.

Mit Hilfe dieses Antilysins kann man in Reagenzglasversuchen sehr schön die Reaktionsgesetze zwischen Antigen und Antikörper studieren. Sehr geringe Antitoxinquantitäten steigern die Wirkung des Toxins, eine Beobachtung, die anscheinend auch bei den anderen Phytotoxinen und vielleicht auch sonst nicht selten wiederkehrt. Man findet zahlreiche Beziehungen quantitativer Art, die Ehrlich auch beim Diphtheriegift und anderen Toxinen kennen gelernt hatte und die bekanntlich Ehrlich zu der Annahme von Toxoiden, Toxonen usw., Arrhenius und Madsen zu ihren Berechnungen geführt haben. In diesem Zusammenhange sei auch noch erwähnt, daß Danysz das nach ihm benannte Phänomen — wonach es einen Unterschied macht, ob man zu einer Toxindosis die zur Entgiftung notwendige Antitoxinmenge in Portionen oder auf einmal zusetzt, zuerst bei der Präzipitinreaktion zwischen Ricin und Antiricin beschrieben hat.

(Literatur siehe Bd. I, pag. 316.)

XV.

Heufieber-Antitoxin.

Von

Dr. C. Prausnitz

in London.

Die älteren Behandlungsmethoden des Heufiebers waren auf viel zu unklaren ätiologischen Auffassungen fundiert, um erfolgreich sein zu können. Ein Teil der Autoren versuchte, die angenommene lokale Disposition der Nasenhöhle durch Ätzen, Brennen und Schneiden zu beseitigen; ein anderer Teil der Ärzte erreichte durch häufige antiseptische Ausspülungen oder durch Anwendung indifferenter oder antiseptischer Salben wenigstens einen gewissen, mechanisch begründeten Erfolg. Andere Maßnahmen richteten sich gegen eine supponierte gichtische oder neuropathische Disposition. Viele begnügten sich gar mit der rein symptomatischen Verabreichung von Narcoticis oder Nebennierenpräparaten*). Aber nur die Vertreter der Pollentheorie haben in klarer Weise als das wesentliche Postulat für die Behandlung des Heufiebers die Vermeidung von Pollen und von pollenhaltiger Luft formuliert.

Nur durch das Fehlen von Pollen erklärt es sich, daß Patienten auf hoher See von Anfällen frei sind, und nur daher rührt der gute Erfolg des Aufenthaltes in den klimatischen Kurorten, wo heufiebererregende Pflanzen kaum oder garnicht vorkommen. Als solche Kurorte kommen u. a. in Betracht für den Kontinent Helgoland und Abbazia, für England die Lundy Inseln, Kap Lizard und einige Inseln an der Westküste von Schottland, für Amerika Fire Island, Long Beach Island und die White Mountains, Green Mountains, Catskill- und Adirondack Mountains (Wyman[59]).

Für Personen, welche derartige Reisen nicht vornehmen können, bleibt als alleinige prophylaktische Maßregel die möglichste Vermeidung pollenhaltiger Außenluft. Sie müssen sich tunlichst im Hause, bei geschlossenen Türen und Fenstern aufhalten, und sollten bei Ausgängen Schleier tragen oder ihre Augen durch Schutzbrillen, ihre Nase durch Wattefilter nach Art der R. Mohrschen[41]) Apparate vor dem Eindringen von Pollen schützen. Durch sorgfältige Beobachtung dieser, allerdings

---

*) Letzthin ist von Heymann[24]) auf Grund einschlägiger Beobachtungen das Thyreoidin empfohlen worden.

recht beschwerlichen Maßregeln konnten sich bereits früher manche Patienten mehr oder weniger frei von Heufieber halten.

Durch die Kenntnis der Ursache der Krankheit sind wir nunmehr in der Lage, auch eine spezifische Therapie des Leidens zu unternehmen. Als die ersten Versuche in dieser Richtung könnte man vielleicht die Methode von Holbrook Curtis[11]) anführen, welcher seinen an Herbstkatarrh leidenden Patienten Extracta liquida der Ambrosia artemisiaefolia innerlich verabreichte. Über die Erfolge dieser Behandlung liegen nur vereinzelte Mitteilungen vor, deren Wert dadurch beeinträchtigt wird, daß gewöhnlich gleichzeitig ein Symptomaticum wie Adrenalin verabreicht wurde.

Die rationelle spezifische Behandlung ist erst von Dunbar[13]) auf Grund seiner ätiologischen Studien eingeführt worden. Im direkten Anschluß an seine ersten Experimente mit Pollen an Heufieberpatienten begann er mit der Injektion von Tieren zwecks Herstellung eines antitoxischen Serums. Wir haben bei der Besprechung des Antigens die bei diesen Versuchen beobachteten Reaktionen der Versuchstiere — Kaninchen, Ziegen und Pferde — geschildert und haben erwähnt, daß nach einigen Impfungen eine Gewöhnung an das Gift eintrat, so daß zur Erzielung gleichstarker Reaktionen die Injektion von steigenden Giftmengen nötig wurde.

Bereits nach zwei Polleninjektionen zeigte das Serum von einem dieser Kaninchen eine deutliche antitoxische Wirkung. Da zu dieser Zeit noch nicht mit dem Protein, sondern erst mit den zertrümmerten Pollen bezw. mit Extrakten daraus gearbeitet wurde, so war eine genaue Dosierung sehr erschwert. Immerhin hatte die Instillation des Serums in die durch Pollenapplikation stark gereizte Conjunctiva oder Nasenhöhle disponierter Personen eine deutlich lindernde Wirkung: subjektiv wurde das lästige Jucken und Brennen rasch beseitigt und bald ein angenehm kühlendes Gefühl empfunden; objektiv beobachtete man einen auffallend raschen Rückgang der Gefäßinjektion und der Schleimhautschwellung. Mischte man gleiche Mengen von Gift einmal mit dem Serum der vorbehandelten, ein anderes Mal mit dem Serum unbehandelter Tiere, und brachte einen Tropfen der ersten Mischung in das eine Auge, einen Tropfen der anderen Mischung in das andere Auge, so war die Reaktion im ersteren Auge subjektiv und objektiv viel schwächer als im letzteren.

Darstellung und Bestimmung des Serums.

Erst im Frühjahr 1903 gelang es nach mehrmonatiger Behandlung von einigen Ziegen ein so wirksames Serum zu gewinnen, daß die Mischung dieses Serums mit Roggenpollenextrakt in der Conjunctiva eines Patienten keinerlei Reiz auslöste; dagegen rief die zur Kontrolle hergestellte Mischung entsprechender Mengen des Pollenextraktes mit normalem Ziegenserum im anderen Konjunktivalsack desselben Patienten eine deutliche subjektive und objektive Reaktion hervor. Auf Grund dieser Resultate wurde nunmehr zur Immunisierung von Pferden geschritten*).

Die Pferde werden unter den gesetzlich vorgeschriebenen Kautelen eingestellt und dauernd tierärztlich beobachtet. Nur die Pferde, welche nach Injektion von 0,5 g Pollen, bezw. 0,2 g Protein eine Reaktion

*) Die fabrikmäßige Herstellung erfolgt durch die Firma Schimmel & Co. in Miltitz bei Leipzig.

zeigen, sind nach den bisherigen Erfahrungen zur Produktion von Antitoxin geeignet. Wie früher angegeben, zeigt nur etwa $^1/_3$ aller so geprüften Tiere die charakteristische Reaktion. Die Giftinjektionen werden in der bei der Diphtherieserumgewinnung üblichen Weise subkutan am Halse vorgenommen und bald nach dem völligen Abklingen der Reaktion mit steigenden Dosen wiederholt. In der Regel werden, der Einfachheit halber, nicht die Proteine, sondern frisch hergestellte Pollenextrakte injiziert. Für das resultierende Serum scheint es gleichgültig zu sein, welche von beiden Substanzen man verwendet. Die Erscheinung der Überempfindlichkeit ist bisher nicht beobachtet worden. Regelmäßig erzielt man im Verlauf von mehrmonatiger Behandlung Toleranz der Pferde gegen das 20—30fache, gelegentlich sogar gegen das 50fache der anfangs stark wirksamen Giftmenge.

Einen klaren Einblick in den Verlauf der Immunisierung gewinnt man durch die regelmäßige Titrierung des Serums, auf deren Methodik weiter unten eingegangen wird. Es hat sich gezeigt, daß zu Anfang der Behandlung mit stark wirksamen Giftmengen das Serum öfters eine ausgesprochene Reizung bei Heufieberpatienten hervorruft, die vielleicht auf das Vorhandensein unresorbierten oder nur teilweise abgebauten Giftes im Kreislauf zurückzuführen ist. Aber schon nach ein bis zwei Monaten ist in der Regel eine deutliche Schutzwirkung des Serums nachweisbar, welche dann von Injektion zu Injektion steigt und einem für jedes Tier verschiedenen Maximum zustrebt. Ist dies Maximum erreicht, so wird eine größere Blutentnahme ausgeführt. Das abgeschiedene Serum wird in geeigneten Apparaten abgehebert und entweder unter Zusatz von 0,25 % Acid. carbol. liquefact. flüssig aufbewahrt oder in Vakuumapparaten bei etwa 45° getrocknet. Die weitere Verarbeitung des flüssigen Serums bietet keine Besonderheiten. Das getrocknete Serum wird in Kugelmühlen fein gemahlen und mit der $1^1/_2$fachen Menge sterilen Milchzuckers gründlich vermischt. Die ganze Herstellung geschieht unter streng aseptischen Maßregeln. Beide Präparate sind nur für lokale Applikation auf die Augen-, Nasen- und Rachenschleimhaut bestimmt. Dem flüssigen Serum wird eine Tropfpipette, dem pulverförmigen eine Schaufel oder ein Bläser für die nasale, ein Pinsel für die konjunktivale Behandlung beigegeben. Die Präparate erhalten die Fabrikationsnamen „Pollantin, flüssig“ und „Pollantin Pulver“ und werden, mit einer Kontrollnummer versehen, abgegeben.

Die in beschriebener Weise hergestellten Serumpräparate werden auf Sterilität und auf konstanten Wirkungswert geprüft. Die Titrierung geschieht nach folgender Methode. An einer größeren Zahl von Heufieberpatienten war, wie bei der Besprechung des Antigens erwähnt wurde, festgestellt, daß ein Tropfen einer Roggenpollenproteinlösung 1:40,000, entsprechend $^1/_{1000}$ mg des trockenen Proteins, bei konjunktivaler Applikation stets charakteristische Heufiebersymptome auszulösen vermochte. Diese Dosis wurde willkürlich als die für Serumprüfungen anzuwendende Giftdosis gewählt.

Zur Titrierung werden eine Reihe von Mischungen hergestellt, die das Serum in fallenden Verdünnungen enthalten, während das Gift in allen in der Verdünnung 1:40,000 vorhanden ist. Zur möglichst vollständigen Absättigung bleiben die Mischungen eine Stunde bei 37° stehen. Es wird dann festgestellt, welche von diesen Mischungen im Konjunktivalsack eines Heufieberpatienten eben noch keine Reizwirkung hervorruft. Der Grad dieser Verdünnung gilt als Maßstab für die Wertig-

keit des Serums. Ist z. B. die Mischung gleicher Teile eines 30fach verdünnten Serums und einer Roggenpollenproteinlösung 1:20,000 gerade noch unwirksam, während die Mischung einer etwas geringeren Serummenge mit derselben Giftmenge reizend wirkt, so wird das Serum als 30wertig bezeichnet. Nur Sera von dieser Stärke gelangen zur Abgabe. In analoger Weise werden die Herbstkatarrhsera an Patienten titriert, die für Ambrosia- und Solidagopollenprotein empfindlich sind.

Durch die geschilderte Methode gelingt es einem geübten Beobachter, mit einem Fehler von nicht über 10 %, die Wertigkeit des Serums zu bestimmen. Die Giftempfindlichkeit ist bei verschiedenen Patienten recht verschieden, bleibt aber bei ein und demselben Patienten jahrelang konstant. Bei Verfasser ist beispielsweise erst nach Ablauf von drei Jahren, während welcher Zeit sehr zahlreiche Versuche, oft mehrmals täglich ausgeführt wurden, eine merkliche Herabsetzung der Giftempfindlichkeit eingetreten.

Die Serumtitrationen wurden längere Zeit hindurch regelmäßig von Dunbar und Verfasser gleichzeitig ausgeführt. Stets waren die $^1/_{1000}$ mg Protein enthaltenden, für Letzteren neutralen Gemische auch für Ersteren, welcher etwa 20mal so giftempfindlich ist, unwirksam oder riefen höchstens eine leichte „Grenzreaktion“ hervor, d. h. subjektiv geringes, rasch wieder vergehendes Jucken ohne jede objektiven Symptome. Hiernach darf diese Methode der Serumtitration Anspruch auf große Genauigkeit erheben. Es kommt hinzu, daß wir den Verlauf der Reaktion in allen seinen Einzelheiten am Menschen viel genauer studieren können, als es am Versuchstier jemals möglich sein könnte. Endlich bildet bei Versuchen an dem einen Auge eines Heufieberpatienten das andere Auge eine ideale Kontrolle. Durch diese Vorteile werden die unverkennbaren Nachteile der Methode reichlich aufgewogen, welche in der numerischen Beschränkung des verfügbaren Patientenmateriales bestehen. Die Ausführung der Versuche ist zwar gelegentlich unangenehm, darf aber nach unseren sehr zahlreichen Erfahrungen als ganz ungefährlich bezeichnet werden. Die Beseitigung einer noch nicht voll ausgebildeten Giftreaktion gelingt durch rechtzeitige Serumanwendung leicht.

Nach der geschilderten Methode und gestützt auf die bereits gewonnene Kenntnis von der Haltbarkeit des zweckmäßig aufbewahrten Pollengiftes wurde eine Reihe von Versuchen angestellt, die über einige Eigenschaften des Serums Aufklärung gebracht haben. Grundbedingung für die Beweiskraft dieser Versuche war natürlich die wirkliche Spezifizität des angewandten Serums. Tatsächlich ist bei einer sehr großen Zahl von Versuchen mit den Seris unbehandelter Kaninchen, Ziegen und Pferde niemals eine antitoxische Wirkung entdeckt worden. Auch das Diphtherieantitoxin zeigt, entgegen der Angabe von Rowland [45]), nach den Untersuchungen Kammanns [28]) keine antitoxische Wirkung gegenüber dem Pollengift.

Nach Weichardt [52]) soll das Blutserum von Wiederkäuern zur Zeit der Grasblüte Schutzkörper gegen das Pollengift enthalten. Nach einer noch nicht veröffentlichten Methode wird aus solchem Serum ein Präparat „Graminol“ hergestellt, welches gegen das Heufiebergift schützen soll. Nach Versuchen, welche Verfasser und später Kammann mit dem Graminol anstellten, war eine derartige Schutzwirkung bei drei Patienten nicht nachweisbar. Kammann hat ferner versucht, bei Kaninchen und Ziegen die Bildung von Antitoxin durch Fütterung mit großen Pollenmengen künstlich hervorzurufen. Er hat aber nach etwa dreimonatiger

Behandlung auch nicht eine Spur von Antitoxin in ihrem Serum auffinden können, während nach Abschluß dieser Versuche an denselben Tieren durch subkutane Polleninjektion bereits in 1 $^1/_2$ Monaten ein antitoxisches Serum erhalten werden konnte. Daraus scheint hervorzugehen, daß eine nachweisbare, also für praktische Zwecke in Betracht kommende Serumimmunität gegen das Pollengift nicht durch Fütterung, sondern nur durch Injektion erzielt werden kann. Tatsächlich ist die Gewinnung eines antitoxischen Serums durch Fütterung bisher nur mit überaus differenten Körpern, wie dem Abrin, gelungen und konnte daher von den für den tierischen Darm unwirksamen Pollen wohl kaum erwartet werden.

An dieser Stelle sei noch bemerkt, daß auch die Sera von Normalpersonen sowie von Heufieberpatienten keine nachweisbaren Mengen von Antitoxin enthalten.

Die weitere Untersuchung des Pollenantitoxins bezog sich zunächst auf seine Haltbarkeit und seine chemischen Eigenschaften. Die Haltbarkeit des Serums wurde an Proben festgestellt, die im Dunkeln bei 8°, bei 23° und 37° in paraffinierten Gläschen aufbewahrt wurden. An Trockenserum konnte nach zweijähriger Aufbewahrung im Eisschrank kein Antitoxinverlust beobachtet werden, während die bei 23° aufbewahrte Probe nach Jahresfrist eine Herabsetzung um etwa $^1/_4$, die bei 37° aufbewahrte Probe eine Herabsetzung um fast $^1/_2$ zeigte. Die Haltbarkeit flüssigen Serums ist selbst im Eisschrank eine beschränkte. Bereits nach Jahresfrist sahen wir gelegentlich einen Verlust von etwa $^1/_4$—$^1/_2$ der ursprünglichen Wirksamkeit ohne äußerlich erkennbare Änderung des Serums. Neuere Versuche an zwei anderen flüssigen Seris haben jedoch nach ein- bezw. zweijähriger Aufbewahrung im Eisschrank keine Herabsetzung ihrer Wertigkeit gezeigt.

Bei fraktionierter Ausfällung mit Ammoniumsulfat nach Hofmeister zeigte sich, analog wie beim Diphtherie- und Tetanusserum, daß die giftneutralisierende Wirkung des Serums nur an den Globulinen haftete.

Bei Erhitzung auf die Koagulationstemperatur des Eiweißes ($^1/_2$ St. auf 60°) wird das, zur Vermeidung der Gerinnung, mit physiologischer Kochsalzlösung 1:5 verdünnte Serum trüb und verliert seinen Wirkungswert vollkommen. Unter Benutzung dieses Umstandes wurden Versuche zur Trennung des Antitoxins von dem thermostabileren Toxin unternommen. Eine Mischung gleicher Teile von Roggenpollenproteinlösung 1:10,000 und Serum Pferd „F" 1:5 wurde hergestellt und erwies sich nach viertelstündigem Stehen bei 37° als neutral. Nachdem diese Mischung alsdann im Wasserbade eine halbe Stunde auf 75° erhitzt worden war, genügte die Einbringung eines Tropfens in den Konjunktivalsack eines Patienten, um deutliche subjektive und objektive Heufiebererscheinungen auszulösen. Bei mehrmaliger Wiederholung dieses Versuches zeigte es sich indessen regelmäßig, daß nur ein Teil des Giftes beim Erhitzen frei wurde. In Analogie zu diesem Ergebnis sei daran erinnert, daß Calmette [9]) ein neutrales Schlangengiftantitoxingemisch durch Erhitzen auf 68° wieder giftig machen konnte, daß aber Martin und Cherry [39]) aus einem entsprechend hergestellten Gemisch, welches vor dem Erhitzen 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen blieb, nach der Calmetteschen Methode kein Gift wiedergewinnen konnten. Diese Erscheinungen wären im vorliegenden Falle wohl so zu erklären, daß zwischen Pollengift und Antitoxin zwar eine chemische Bindung eintritt, daß aber der Verlauf dieser Bindung nur ein langsamer oder vielleicht unvollkommener ist.

Eine nähere Untersuchung erforderte die Frage, ob die Bindung von Pollengift und Antitoxin dem Gesetze der konstanten Proportion folgt, d. h. ob das Mengenverhältnis von Giftdosis und gerade neutralisierender Serumdosis ein konstantes ist. Bekanntlich ist dies Gesetz bereits für eine größere Zahl von Toxinen und anderen Antigenen gegenüber ihren spezifischen Seris erwiesen. Zu diesem Zwecke standen zunächst die Augenpaare zweier Patienten von verschiedener Empfindlichkeit zur Verfügung. Es wurde nach der bereits geschilderten Methode der Serumtitration mit frisch hergestellten Gift- und Serumverdünnungen gearbeitet. Die Mischungen blieben 15 Minuten bei 37° stehen, und es wurde dann ein Tropfen in den Konjunktivalsack des einen Patienten gebracht. In zahlreichen Versuchen zeigte es sich, daß die Methode richtige Ergebnisse lieferte, wenn nach dem völligen Abklingen einer leichten Reaktion mindestens eine Stunde gewartet wurde, ehe ein neuer Versuch unternommen wurde. Die nachstehenden Tabellen, deren Resultate in den Kurven von Fig. 1 graphisch dargestellt sind, zeigen, daß in diesen Untersuchungen bei wachsender Giftdosis das Verhältnis Antitoxin: Pollengift erst langsam, dann immer rascher ansteigt (Prausnitz[43]).

Tabelle 1. Patient „A“: Dosis minima efficax: 1 Tropfen einer Toxinlösung 0,00125 mg in 1 ccm = 1 : 800 000.

Toxinmenge ? mg in 1 ccm der Mischung	Antitoxinzusatz, welcher das Toxin überneutralisiert (? mg in 1 ccm Mischung)	Antitoxinzusatz, welcher das Toxin noch nicht neutralisiert (? mg in 1 ccm Mischung)	Bemerkungen
0,01	1,0		
0,02	10,0	5,0*	Grenzreaktion
0,03	33,3	25,0	
0,04	250,0	100,0	
0,05	750,0	500,0*	Grenzreaktion

Tabelle 2. Patient „B“: Dosis minima efficax: 1 Tropfen einer Toxinlösung 0,02 mg in 1 ccm = 1 : 50 000.

Toxinmenge ? mg in 1 ccm der Mischung	Antitoxinzusatz, welcher das Toxin überneutralisiert (? mg in 1 ccm Mischung)	Antitoxinzusatz, welcher das Toxin noch nicht neutralisiert (? mg in 1 ccm Mischung)	Bemerkungen
0,02	5,0		
0,03	20,0	14,3	
0,04	30,0	25,0	
0,05	35,0	30,0*	Grenzreaktion
0,067	66,7	50,0	
0,1	500,0	250,0	

Zu diesen Tabellen ist zu bemerken, daß ein Gemisch der Einfachheit halber als „überneutralisiert“ bezeichnet wurde, wenn es völlig wirkungslos war, als „noch nicht neutral“, wenn es deutliche subjektive und objektive Reaktionen auslöste. Unter „Grenzreaktionen“ wird ein leichter, subjektiver und rasch wieder verschwindender Juckreiz ohne jede objektiv wahrnehmbaren Veränderungen verstanden. Die Kurven sind aus den Mittelwerten der in den Tabellen angegebenen Wertepaare konstruiert.

Gegen diese Versuche ist von Kammann[28]) eingewendet worden, daß ein Teil von ihnen mit sehr verdünnten Toxinlösungen ausgeführt worden

ist, so daß hier eine beträchtliche Dissoziation der Toxin-Antitoxingemische anzunehmen sei, und daß ferner das zu untersuchende Gemisch in $^1/_4$ Stunde kaum vollständig habe neutralisiert werden können. Kammann hat mit Ambrosiatoxin, gegen welches er in den letzten Jahren empfindlich geworden ist, an sich selber eine kleine Versuchsreihe ausgeführt, die in nachstehender Tabelle folgt.

Tabelle 3.

Dosis minima efficax: 0,008 mg = 1 Tropfen einer Toxinlösung 1 : 5000.

Toxinmenge	Antitoxinmenge	Bemerkungen
0,02 mg	0,2 mg	neutral
0,4 „	4,0 „	ganz geringer Reiz
0,8 „	8,0 „	neutral

Wie ersichtlich, benutzte er ein weit stärkeres Serum, als zu unseren Versuchen zur Verfügung stand. Er hat in seinen Versuchen nun tatsächlich eine Neutralisierung nach dem Gesetz der konstanten Proportion erhalten. Die jüngsten Selbstversuche Dunbars haben ebenfalls eine Neutralisation nach konstanter Proportion im Intervall zwischen einfacher und fünffacher Giftdosis ergeben. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung müssen zeigen, wie diese Diskrepanz zu erklären ist und ob sie vielleicht mit der Verschiedenheit der verwendeten Gifte in Zusammenhang steht.

An dieser Stelle mag auf eine Reihe von Einwänden eingegangen werden, die von A. Wolff-Eisner[55]) gegen die Toxinnatur des Pollengiftes und die Antitoxinnatur des Pollantins erhoben worden sind und die von Kammann[28]) bereits eine ausführliche Beantwortung erfahren haben. Die Grundidee dieser Einwände ist, daß das aus den Pollen hergestellte, bezw. in ihnen enthaltene Gift nicht ein echtes Toxin im Ehrlichschen Sinne, sondern ein Endotoxin sei. Als solches könne es im Tierkörper nicht die Bildung von Antitoxinen, sondern nur von cytolytischen, also pollenlösenden Stoffen veranlassen. Ein solches Serum würde nun im frischen Zustande oder wenn es im menschlichen Körper passende Komplemente fände, die Pollenkörner auflösen und so deren Gifte noch rascher in Freiheit setzen, als dies unter natürlichen Verhältnissen, ohne Serumanwendung geschehen würde. Danach hätte man hier ein Analogon zu den Versuchen R. Pfeiffers, in welchen Choleraimmunserum in der Bauchhöhle der Meerschweinchen die mehrfach tödliche Dosis von Choleravibrionen unverhältnismäßig rasch auflöste und so den Tod der

———— Patient A.

-------------- Patient B.

Fig. 1. Neutralisationskurven von Pollengift und Antitoxin.

Tiere nicht aufhielt, sondern vielmehr beschleunigte. Die unbestritten günstige Wirkung des Pollantins wurde von Weichardt[52]) auf Grund der obigen Annahme durch eine Amboceptorenwirkung erklärt, während er[53]) und Wolff-Eisner[55]) neuerdings ihre Zuflucht zur Annahme gewisser nicht spezifischer, reaktionshindernder Stoffe kolloidaler Natur nehmen.

Im voraus mag hierzu bemerkt werden, daß unserer Auffassung nach die Frage, ob das Pollengift ein Toxin oder Endotoxin ist, heute als gänzlich gegenstandslos zu bezeichnen ist, da die Untersuchungen von R. Kraus[30]), Besredka und Allan Macfadyen[38])*) neues Licht in die Endotoxinfrage gebracht haben. Mit Hilfe des Antitoxins gegen seine akut wirkenden Toxine des choleraähnlichen Vibrio Nasik und der aus El Tor stammenden Choleravibrionen konnte Kraus ein Choleratoxin neutralisieren, das von einer von Brau und Denier modifizierten Cholerakultur gebildet war. Damit ist bereits die Herstellung eines Toxins und Antitoxins von einem Bakterium gelungen, welches bisher als typischer Endotoxinbildner gegolten hatte.

Was nun die Charakterisierung des Toxins im engeren Sinne betrifft, so ruht sie nach den Ausführungen von Ehrlich und seiner Schule auf folgenden Eigenschaften.

1. Das Toxin ist durch die starke Wirksamkeit äußerst kleiner Dosen ausgezeichnet.

2. Es ist ein sehr labiler, durch Erhitzen, Säure-, oder Alkaliwirkung usw. leicht zerstörbarer Körper.

3. Es ist dadurch charakterisiert, daß es im Tierkörper erst nach einer bestimmten Inkubationszeit wirkt.

4. Das Toxin besitzt eine spezifische Wirkung, sowohl in bezug auf die Individualität des Tieres, wie die Eigenart seiner Wirkung.

5. Das Toxin ruft im Tierkörper die Bildung eines spezifischen Antitoxins hervor, und die Neutralisation des Toxins durch dies Antitoxin folgt bestimmten chemischen Gesetzen.

ad 1. Die wirksame Dosis des Pollengiftes ist nach Bruchteilen eines Milligrammes bemessen. Vom Roggenpollenprotein genügt bei einem empfindlichen Patienten ein Tropfen einer frisch bereiteten Lösung 1:800000, also $^1/_{20\,000}$ mg zur Hervorrufung der typischen Heufiebersymptome; bei keinem unserer Patienten war die kleinste wirksame Dosis größer als $^1/_{1000}$ mg.

ad 2. Daß das Pollengift in Lösungen relativ rasch zerstört wird und daß es eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber verdünnten Säuren und Alkalien zeigt, wurde bereits erwähnt. Andererseits zeigen das Schlangengift und gewisse pflanzliche Toxine, wie Abrin u. a. eine weit höhere Hitzebeständigkeit als die Bakterientoxine und ähneln darin also dem Pollengift, während gerade die Macfadyenschen Endotoxine sehr labile Körper sind.

ad 3. Die Latenzzeit ist beim Pollengift in der Regel wenig ausgesprochen. Immerhin dauert es auch nach der Applikation einer nicht zu konzentrierten Giftlösung auf die Schleimhaut einige Minuten bis zum Beginn selbst der leichtesten subjektiven Symptome. Gelegentlich hat jedoch Verfasser mit Roggenpollengift und kürzlich hat Kammann mit Ambrosiagift eine etwa 12stündige Latenzzeit bis zur Ausbildung der ersten lokalen Symptome gesehen.

---

*) Siehe Kraus dieses Handbuch: Über Choleraantitoxine.

Andererseits fehlt die Inkubationszeit gerade bei einigen echten Toxinen, wie dem Schlangengift und den akuten Toxinen von Kraus.

ad 4. Die Wirksamkeit des Pollengiftes ist nach den früheren Auseinandersetzungen streng spezifisch; denn es reizt nur eine beschränkte Anzahl von Personen, ruft aber bei diesen einen wohl charakterisierten Symptomenkomplex hervor.

ad 5. Die Frage nach der Entstehung eines Antitoxins ist vor allen die wichtigste und bedarf eingehender Erörterung. Die vorstehenden Ausführungen haben gezeigt, daß das Serum von hinreichend intensiv mit Pollen behandelten Pferden oder anderen Versuchstieren eine spezifische neutralisierende Wirkung gegenüber dem Pollengift in vitro sowie eine kurative Wirkung in vivo nach dem Ausbruch der Vergiftungssymptome zeigt; eine solche Wirkung ist bei Hunderten von Versuchen mit den Seris nicht vorbehandelter Tiere völlig vermißt worden, und sie ist demnach als streng spezifisch aufzufassen. Aus der Mischung von Gift und spezifischem Serum in vitro resultiert eine physiologisch unwirksame Substanz, aus der durch Erhitzen auf die Zerstörungstemperatur des Serums nur ein Teil des Giftes wiedergewonnen werden kann. Dies ist in einfachster Weise erklärlich unter der Annahme einer chemischen Bindung zwischen den beiden reagierenden Körpern. Nun wäre es ja allerdings denkbar, daß das spezifische Serum nicht ein Antitoxin, sondern einen pollenlösenden Amboceptor enthielte. Dann würde bei Anwesenheit genügender Komplementmengen der Amboceptor die Pollen sogar rascher auflösen und eine rapid einsetzende Giftwirkung hervorrufen. Würde man aber ein älteres oder ein auf 56° erhitztes Serum, das keine Komplemente mehr enthält, verwenden, so könnten nur die in der Tränenflüssigkeit eventuell vorhandenen Komplemente in Frage kommen. Ein Ausbleiben der Giftwirkung unter diesen Umständen könnte entweder so erklärt werden, daß durch den Überschuß der Amboceptoren eine Ablenkung der vielleicht nur spärlich vorhandenen Komplemente erfolgte, oder man müßte supponieren, daß die menschlichen Komplemente nicht zu den Pferdeamboceptoren paßten. In beiden Fällen wäre es denkbar, daß die Pollen die Amboceptoren verankert hätten und daß so die Auflösung der Pollen und damit der Eintritt ihrer Giftwirkung so lange verzögert würde, bis die Pollenkörner aus der Schleimhaut hinausgeschwemmt worden wären. Mit Hilfe solcher Hypothesen wird von den genannten Autoren versucht, die an einer geringen Zahl von Heufieberpatienten beim Serumgebrauch beobachteten Mißerfolge so zu erklären, daß hier zufällig passende Komplemente vorlägen, welche die Pollenwirkung nicht abschwächten, sondern die Auflösung der Pollengifte beschleunigten. Wir werden später eine einfachere Erklärung dieser Mißerfolge bringen.

Für die vorliegenden Verhältnisse dürfte indessen die Anschauung, daß die Auflösung der Pollen und das Freiwerden der Giftstoffe durch Bindung an nicht abgesättigte Amboceptoren verhindert würde, doch zu grob mechanisch sein. Man kann sich kaum vorstellen, wie die großen Pollenkörner nicht den anderen im Tränensekret nachgewiesenermaßen reichlich vorhandenen lösenden Einwirkungen hinreichende Angriffspunkte bieten sollten. Tatsächlich hat Kammann in seinen Versuchen unter dem Mikroskop keinen Unterschied in der Lösung der Pollen gesehen, gleichgiltig ob er frisches oder auf 56° erhitztes oder älteres Immunserum oder Normalserum verwendete; schon früher hatte Dunbar gerade auf

den leichten und raschen Zerfall der Pollen in allen Körperflüssigkeiten hingewiesen.

Gegen die Annahme, daß die oben ausgeführte Amboceptorenwirkung sich nicht auf die Pollen, sondern auf das Pollengift bezöge, sprechen Versuche, welche wiederholt vom Verfasser mit Roggenpollenprotein und kürzlich von Kammann an zwei anderen Patienten mit Protein und Pollenextrakten ausgeführt worden sind. Der letztgenannte Versuch möge hier in extenso wiedergegeben werden. „Ein Patient erhielt in das rechte Auge ein Gemisch von wenige Stunden altem Kaninchenimmunserum und Maispollenaufschwemmung in Normalkaninchenserum, in das linke Auge dieselbe Maispollenaufschwemmung und frisches Normal-Kaninchenserum. Im rechten Auge trat trotz der damals verwandten außerordentlich großen Giftmenge auch nach fünf Minuten keine Reizwirkung auf. Im linken Auge, also in dem Auge, in welches kein Immunserum gebracht war, machte sich sofort starkes Brennen und Jucken bemerkbar, nach fünf Minuten war das Auge diffus gerötet und noch stark juckend. Nach Einbringung eines Tropfens des ganz frischen Kaninchenimmunserums in das linke Auge verschwand nach weiteren fünf Minuten das Jucken.“

Hiernach muß wohl die Annahme, daß im Pollenimmunserum spezifische Cytolysine gebildet würden, fallen gelassen werden. Da nach unseren Ausführungen eine spezifische Wirkung des Serums und eine chemische Bindung zwischen dem Gift und dem Immunkörper des Serums als festgestellt erscheinen müssen, so kann dieser Körper — per exclusionem — nur ein Rezeptor erster Ordnung, ein Körper vom Charakter der Antitoxine sein.

Inbetreff der Bindungsverhältnisse zwischen Pollengift und Antitoxin liegen zur Zeit noch nicht genügend zahlreiche und ausgedehnte Reihen vor, um mit Bestimmtheit zu entscheiden, ob sie dem Gesetz der konstanten Proportion folgt oder nicht. Aber auch wenn die von Dunbar und Verfasser ursprünglich gefundene Bindungsart sich allgemein als die richtige herausstellen sollte, so wäre damit noch nichts gegen die Antitoxinnatur des Pollantins bewiesen. Wo die Avidität zwischen Toxin und Antitoxin so intensiv ist, wie zwischen starken Säuren und Basen, da muß natürlich das Gesetz der konstanten Proportion giltig sein. Je schwächer aber diese Avidität und je höher namentlich der Verdünnungsgrad ist, desto größer wird der dissoziierte Anteil sein, bezw. desto länger wird es bis zu ihrer völligen Neutralisierung dauern. Die Untersuchungen Ehrlichs [19]) und v. Behrings [5]) haben gezeigt, daß man für Gemische weniger avider Gifte und Antitoxine nur bei protrahiertem Kontakt das Gesetz richtig erhält. Es ist daher wohl möglich, daß das Gleiche für die Verhältnisse beim Pollengift und seinem Antitoxin zutrifft. Es ist aber auch denkbar, daß die Avidität der Pferdeserumhaptine zu den haptophoren Gruppen des Pollengiftes geringer wäre, als diejenige der Heufieberpatientenreceptoren zu den Giftgruppen, und daß in einem Gift-Antitoxingemisch stets ein Teil dissociiert bliebe. In diesem Falle würde bei Verwendung größerer Giftmengen ein größerer Teil des Giftes frei bleiben und ein unverhältnismäßig viel größeres Antitoxinquantum nötig werden, um dies Gift unschädlich zu machen. Nimmt man weiter an, daß ein Teil des ungebundenen Toxins sich mit den Receptoren der Zellen des Patienten verbindet, so würden die Verhältnisse wohl ähnlich liegen, wie in den Versuchen v. Behrings und Knorrs [6]), wo das Gift (Tetanusgift) $^1/_4$ Stunde vor dem Antitoxin injiziert wurde. Bei diesem

Modus der Giftapplikation war das Gesetz der konstanten Proportion naturgemäß nicht giltig, sondern es schützte gegen eine 100fache Giftdosis erst die 10000fache Antitoxindosis. Ein Blick auf die Kurven unserer Versuche wird zeigen, daß sie zwar nicht streng Kurven zweiten Grades sind, aber daß sie doch eine gewisse Ähnlichkeit mit Parabeln haben.

Letzthin ist nun von WEICHARDT[53]) und WOLFF-EISNER[55]) die Hypothese aufgestellt worden, daß die Heufieberreaktion stets das Ergebnis eines cytolytischen Vorganges sei; eine Schutzwirkung durch Serum — sei es Pollantin oder Graminol (cfr. pag. 4) — würde durch gewisse „Hemmungskörper" bedingt, welche das Zustandekommen dieser Cytolyse verhinderten. Ein Beweis für das Vorhandensein solcher Hemmungskörper ist, soweit uns ersichtlich, nicht erbracht worden, während die oben angeführten Versuche und die nachstehenden Erfahrungen über aktive und passive Immunisierung die Bildung spezifischer Pollengift-Antikörper, oder Antitoxine, beweisen.

Dafür, daß bei der Immunisierung sich im Tierkörper ein spezifisches Antitoxin bildet, spricht ganz besonders der Umstand, daß sowohl aktive wie passive Immunisierung nachgewiesen ist. Betreffs der aktiven Immunisierung der Pferde und anderen Versuchstiere mag auf die obigen Angaben verwiesen werden. Auch bei konjunktivaler Giftapplikation ist im Laufe der Zeit wenigstens beim Verfasser eine geringe aber unzweifelhafte Immunisierung beobachtet worden: seine Giftempfindlichkeit ist auf fast die Hälfte zurückgegangen. Daß es demnach auch mit subkutaner Giftinjektion möglich sein müßte, Heufieberpatienten aktiv gegen das Pollengift zu immunisieren, kann kaum bezweifelt werden; vorläufig scheint allerdings der geeignete Zeitpunkt hierfür noch nicht gekommen zu sein.

Die Ausführbarkeit einer passiven Immunierung durch subkutane Seruminjektion ist nach den Versuchen von DUNBAR und Verfasser, sowie von BORROWMAN[7]) als erwiesen zu betrachten. Daß sie nicht sehr nachhaltig war, ist bei der Kleinheit der injizierten Serummengen nicht zu verwundern. Man kann die Verhältnisse beim Heufieber nicht mit denen bei bakteriellen Infektionen vergleichen. Bei diesen steigt die Giftproduktion binnen wenigen Tagen auf ein Maximum an; sowie durch die antibakteriellen Schutzkräfte des Organismus und durch zweckmäßige lokale Behandlung die Bakterien unterdrückt worden sind, hört auch die Giftproduktion auf. Immerhin hat es sich bei der Diphtherie als wünschenswert herausgestellt, die subkutanen Antitoxininjektionen in den ersten Krankheitstagen regelmäßig zu wiederholen. Beim Heufieber gelangt aber das Gift wochenlang Tag für Tag in den Körper, und so müßte hier die Seruminjektion belästigend oft wiederholt werden. Da ferner das Heufiebergift doch in erster Linie auf die exponierten Schleimhäute und vielleicht auch die lokalen Sympathicus-Ganglienzellen wirkt, so stellt offenbar hier gerade die lokale Applikation der Antitoxins das gegebene Verfahren dar. Es kommt hinzu, daß Heufieberpatienten gegen die Injektion selbst geringer Mengen spezifischen wie auch normalen Pferdeserums recht empfindlich sind und darauf mit Exanthemen von wechselnder Stärke reagieren. Man kann von der subkutanen Seruminjektion um so eher absehen, als die lokale Behandlung der Augen- und Nasenschleimhäute eine Immunisierung von völlig ausreichender Dauer und Intensität bewirkt. Bei drei Patienten, die seit vielen Jahren schwer an Heufieber gelitten hatten und bei denen in früheren Jahren eine energische Serum-

behandlung erfolgreich ausgeführt worden war, sind in den letzten zwei bezw. drei Jahren keine Anfälle mehr eingetreten.

Aus den obigen Erwägungen geht hervor, daß das Pollengift ein Antigen ist, gegen welches die aktive Immunisierung geeigneter Versuchstiere gelingt. Im Serum solcher Tiere kommt es zur Bildung spezifischer Antitoxine, welche das Gift in vitro neutralisieren und eine bereits bestehende Giftwirkung einschränken bezw. beseitigen können.

Da wir nun wissen, daß eine Kategorie von Patienten durch Gramineenpollen, eine andere durch Kompositenpollen, andere durch beide Arten beeinflußt werden, so ist klar, daß das Gift der ersteren von dem der letzteren Pollen verschieden sein muß. Wahrscheinlich bestehen sogar gewisse Differenzen feinerer Art zwischen den Giften verschiedener Gramineen, da dieselben in ihren Neutralisierungsverhältnissen gegenüber den mit verschiedenen Gramineenpollenarten hergestellten Antitoxinen leichte Differenzen zeigen. Bedeutend größer ist jedoch der zwischen den Giften der Gramineen einerseits und denen der Ambrosia- und Solidago-Arten andererseits bestehende Unterschied. Dunbar[15]) fand seinerzeit, daß ein hochwertiges Gramineenantitoxin eine zwar relativ schwächere, aber noch deutliche neutralisierende und kurative Wirkung gegenüber dem Solidagotoxin besitzt*). Es handelt sich hier offenbar um eine gewisse Verwandtschaftsreaktion, ähnlich wie sie von den Agglutininen her bekannt ist und wie sie auch bei gewissen Toxinen beobachtet wird; so werden sowohl Robin wie Ricin durch Antiricinserum, Schlangen- wie Skorpionengift durch Antivenin neutralisiert.

Es werden zurzeit zwei Arten Pollantin hergestellt, das eine durch Impfung von Pferden mit verschiedenen Gramineenpollen, das andere durch gleichzeitige Impfung mit Gramineen- und mit Ambrosia- und Solidagopollen. Das erstere Präparat ist für die Behandlung des europäischen Heufiebers und des Frühsommerkatarrhes der Vereinigten Staaten bestimmt; das letztere wird speziell für die Behandlung des Herbstkatarrhes der Vereinigten Staaten hergestellt, kann aber auch für die andere Form des Heufiebers Verwendung finden.

Es erübrigt noch, diese theoretischen Betrachtungen mit einigen Angaben über die praktische Verwendung des Heufieberserums zu ergänzen. Aus den Arbeiten von Doenitz[12]) ist die Bedeutung der prophylaktischen Anwendung des Diphtherieserums bekannt. In den Versuchen, wo das Antitoxin eine Stunde nach dem Toxin injiziert wurde, war 40 mal soviel Serum zur Rettung des Tieres erforderlich, als bei gleichzeitiger Verabreichung von Toxin und Antitoxin genügt hätte. Nach unseren Anschauungen von der relativ geringeren Bindungsenergie zwischen Pollengift und Pollenantitoxin müßte gerade bei der Behandlung des Heufiebers ein noch besonderer Nachdruck auf die Prophylaxe gelegt werden. Diese Auffassung ist in den Erfahrungen der Praxis durchaus bestätigt worden.

Eine rationelle Prophylaxis besteht im vorliegenden Falle darin, daß das Serum auf die noch ungereizte Schleimhaut gebracht wird. In dem Maße, wie aus den auf die Schleimhaut gelangenden Pollen das Gift frei wird, findet es dann zu seiner Absättigung eine reichliche Menge von antitoxischen Haptinen in der Lösungsflüssigkeit vor. Man kann sich zweckmäßig — wenigstens in der schlimmen Zeit — die Arbeit der

---

*) In neueren Untersuchungen hat Dunbar eine solche Verwandtschaftsreaktion nicht wieder nachweisen können.

passiven lokalen Immunisierung dadurch erleichtern, daß man durch Schließen der Schlafzimmerfenster während der Nacht den Pollen das Eindringen in den Körper erschwert. Schläft man nämlich bei offenen Fenstern, so gelangen zahlreiche Pollen in die beim Schlaf trockene Nase; die Pollen bleiben dann zunächst unverändert in der Nase liegen, ohne daß ihre Gifte in genügender Menge frei werden, um die Reizschwelle der nasalen Reflexe zu überschreiten. Bald nach dem Erwachen beginnt eine stärkere Schleimsekretion, und findet daher diese Auflösung rasch statt: es erfolgt ein heftiger Anfall, der die Arbeit der prophylaktischen Immunisierung für den ganzen Tag a limine unmöglich machen kann. Schläft man aber bei geschlossenen Fenstern, und wird sofort beim Erwachen Serum angewendet, so ist man in der Regel für einige Stunden oder gar für den ganzen Tag gesichert. Vor jedem Ausgang ins Freie, vor allem vor Ausfahrten, Ausritten und Bahnfahrten sollte die Behandlung ausgeführt und bei dem leisesten Juckreiz wiederholt werden.

Anwendung des Serums.

Die Frage nach dem zu verwendenden Serumpräparat wird gewöhnlich zugunsten des Pollantinpulvers zu entscheiden sein, da es haltbarer ist, kein Karbol enthält und da seine Einbringung in die Nasenhöhle, den Hauptsitz des Leidens, einfacher ist. Von den üblichen Methoden der endonasalen Applikation — Aufschnupfen und Einblasen — ist nur die letztere empfehlenswert. Beim Aufschnupfen wird durch den plötzlichen Kontakt der aspirierenden Schleimhautflächen ein unangenehmer Reiz ausgeübt, und die Verteilung des Pulvers auf der Oberfläche ist keine gleichmäßige. Beide Übelstände fallen beim Einblasen weg.

Die einzuführende Serummenge sollte klein sein, da sie sonst nicht rasch genug gelöst wird und einen lästigen Fremdkörperreiz ausübt. Es empfiehlt sich daher, eine etwa senfkorngroße Menge (ca. 1—2 mg) auf einmal zu verwenden und die Applikation häufig zu wiederholen.

Für die Behandlung der Augen genügt es, wenige Körnchen des Pulvers mit dem Pinsel oder dem Rücken der am Korken befindlichen Schaufel auf den Lidrand zu bringen. Ein sofort empfundenes Fremdkörpergefühl verschwindet binnen wenigen Sekunden.

Die Anwendung des flüssigen Serums in der Nase bietet keine Vorteile. Im Auge ist sie aber bei allen Erkrankungen der Binde- und Hornhaut unbedingt vorzuziehen. Zur Beseitigung der Rachen-, Kehlkopf- und bronchialen Symptome ist die Anwendung des flüssigen Präparates mittels Sprays geeignet.

Da die Hauptmenge von Pollen in die Nase kommt, so ist die Behandlung der Nase am wichtigsten und muß mit größeren Mengen und häufiger ausgeführt werden. Für die Augen genügt meistens eine früh am Morgen ausgeführte Behandlung.

Das Heuasthma entsteht nach den früheren Darlegungen entweder lokal durch direkte Aspiration von Pollen oder auf dem Wege des Kreislaufes durch Resorption des Giftes in der Nasenhöhle. Gelingt es durch ausreichende Behandlung die Nase frei und durchgängig zu halten, so werden die Pollen auch nicht aspiriert werden, sondern bleiben in der Nase liegen. Bei ausgiebiger Serumanwendung wird aber das Gift hier nicht zur Resorption kommen, sondern an Ort und Stelle neutralisiert. Sollten sich doch einmal schwere Asthmaerscheinungen ent-

wickelt haben, so dürfte die subkutane Injektion von 1–2 ccm flüssigen Serums zweckmäßig sein.

Bei Erwägung der hier resümierten Verhaltungsmaßregeln ist ersichtlich, daß mehrere Möglichkeiten vorliegen, durch die bei nachlässiger oder gleichgültiger Serumanwendung ein Kurerfolg illusorisch gemacht wird. Wiederholt war die Verwendung eines Übermaßes von Pollantin an Mißerfolgen schuld und hatten die Patienten nachher bei Benutzung nur kleiner Mengen guten Erfolg. Die ganz vereinzelt auftauchenden Mitteilungen, daß bei Serumanwendung der Krankheitszustand sich verschlimmert habe, sind wahrscheinlich durch eine ausnahmsweise konstatierte Empfindlichkeit der Schleimhäute gegen Pferdeserum — gleichgültig ob normales oder spezifisches — zu erklären.

Die Statistik über die in den letzten Jahren dem Hygienischen Institut in Hamburg mitgeteilten Fälle von mit Pollantin behandeltem Heufieber umfaßte bis Ende 1905 997 Fälle, die sich wie folgt verteilen:

Tabelle 4.

Veröffentlicht von	Jahrgang	Ausgezeichn. Erfolg		Teilweiser Erfolg		Kein Erfolg	
			%		%		%
Luebbert[35]) Zarniko[60])	1903/4	299	59,2	143	28,3	63	12,5
Europ. Fälle	1905	189	65,9	78	27,1	20	7,0
Amerik. Fälle	1905	113	55,1	35	17,1	57	27,8

Unter „ausgezeichnetem Erfolg“ werden hier diejenigen Fälle aufgeführt, welche sich in der ganzen Heufieberzeit von Anfällen haben frei halten können und deren Befinden so gut war, daß sie ihren Beschäftigungen ungestört nachgehen konnten. Unter „teilweisem Erfolg“ werden alle die Fälle verstanden, die von der Serumbehandlung einen deutlichen Erfolg verspürten, deren Leiden aber nicht völlig behoben wurde; hierzu gehören auch die Patienten, bei denen nur ein Teil, z. B. nur die Augen- oder nur die Nasensymptome oder alle Symptome außer dem Asthma gebessert wurden, oder bei welchen alle Erscheinungen unter dem Serumgebrauch gebessert und abgekürzt, aber nicht völlig geheilt wurden.

An dieser Stelle mag darauf hingewiesen werden, daß vom „Heufieberbund von Helgoland“ eine Statistik über 298 Fälle aufgestellt ist, deren Zahlen weit weniger günstig sind (183 mit Erfolg, 84 ohne Erfolg, 31 mit angeblichem Nachteil). Dazu ist zu bemerken, daß diese Zahlen vorwiegend von Patienten stammen, welche nur zum geringsten Teil unter ärztlicher Behandlung standen; dagegen sind die Hamburger Zahlen vorwiegend aus ärztlichen Berichten zusammengestellt. Zahlreiche dieser Berichte umfassen die Behandlungsergebnisse in Serien von 10–20 Patienten, mit durchschnittlich $^2/_3$ gutem Behandlungserfolg. In den Gesamtzahlen der in Deutschland, wie der in Amerika beobachteten Fälle ist seit drei Jahren die Zahl der ausgezeichneten Erfolge regelmäßig fast 60% oder noch größer gewesen.

Gegen eine günstige Beurteilung der vorstehend angeführten Zahlen ist weiterhin eingewendet worden, daß die günstigen Fälle nur leichte, die ungünstigen aber schwere Fälle gewesen wären. Im Widerspruch mit dieser Auffassung stehen aber die folgenden Zahlen aus einer Statistik, die von Schwarz auf Grund der für das Jahr 1905 in Hamburg eingelaufenen

Berichte über 287 Fälle aufgestellt ist, und aus der die günstigen Ergebnisse gerade bei den mit Asthma komplizierten, also schweren Fällen vorwiegen. Danach waren unter 189 mit „ausgezeichnetem Erfolg" behandelten 79 = 41,8 %, unter 78 mit „teilweisem Erfolg" behandelten 24 = 30,8 % und unter 20 „ohne Erfolg" behandelten 7 = 35 % mit Asthma kompliziert.

Wenngleich allen solchen statistischen Mitteilungen Mängel anhaften, so gestattet doch ein so reiches Material wie das vorliegende einen Rückschluß auf die Brauchbarkeit des Serums.

Literatur.

Die mit * bezeichneten Arbeiten sind vorwiegend klinischen Inhaltes.

* 1) Alberts, Med. Weekblad 1903, Nr. 12.
* 2) Avellis, Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 11.
* 3) Axillos, Bull. de la Soc. de Méd. de Gand 1901, juillet.
* 4) Barnhill, Med. and Surg. Monitor. (Indianapolis) 1905, Nr. 4; Journ. Amer. Med. Ass. 1906, Vol. II, pag. 447.
5) v. Behring, Allgemeine Therapie der Infektionskrankheiten 1899.
6) v. Behring und Knorr, Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIII, pag. 416.
* 7) Borrowman. Scott. Med. and Surg. Journ. 1903, Vol. XIII, Nr. 3; 1906, Sept.
* 8) Bullette, Colorado Medicine 1905, Nr. 2.
9) Calmette, Ann. de l'Inst. Pasteur 1895, pag. 250.
*10) Cott, Journ. Amer. Med. Ass. 1906, Vol. II, pag. 523.
11) Curtis, H., New York Med. News 1900, 7. July; New York Med. Record 1901, 13. July.
12) Doenitz, Deutsche med. Wochenschr. 1897, pag. 428.
13) Dunbar, Zur Ursache und spezifischen Behandlung des Heufiebers, München 1903.
14) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 9.
15) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 24—26, 28.
16) Ders., Ebenda 1905, Nr. 26, 28—30.
*17) Eden, van, Nederl. Tijdschr. voor Geneeskunde 1905, 4. Nov.
*18) Edwardes, Journ. Amer. Med. Ass. 1906, Vol. II, pag. 794.
19) Ehrlich, Klin. Jahrbuch 1897.
*20) Elias, Med. Weekblad 1904, Nr. 11.
*21) Finder, Ärztl. Praxis 1904, Nr. 14.
*22) Halbertsma, Geneeskundige Courant 1903, Nr. 28.
*23) Heindl, Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 23.
24) Heymann, Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr, 13.
*25) Hirshberg, Maryland Med. Journ. 1904, Nr. 9; Journ. Amer. Med. Ass. 1906, Vol. II, pag. 447.
*26) Immerwahr, Berl. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 28; 1904, Nr. 26.
*27) Joachim, New Orleans Med. and Surg. Journ. 1904, Nr. 4; 1905, Nr. 1.
28) Kammann, Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 26.
*29) Knight, Intern. Clinics, 1905, Vol. III; New York Med. News, 1905, 23. Sept.; Med. Record, 1906, 10. March.
30) Kraus, R., Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 22.
*31) Kuttner, Zeitschr. für ärztl. Fortbildg. 1904, Nr. 20.
*32) Levy, Journ. Amer. Med. Ass. 1906, Vol. II.
*33) Loeb, Cl., Annals of Otology etc. 1903, Nr. 2.
*34) Loeb, H. W., Ebenda, 1905, June.
35) Luebbert, A. und Prausnitz, C., Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 11/12.
*36) Lübbert, A., Therapeut. Monatshefte 1904, Nr. 12.
*37) Mac Coy, New York Med. Journ. 1903, 21. Nov.; New York Med. News, 1904, pag. 391.
38) Macfadyen, A., Brit. Med. Journ. 1906, 21. April; Zentralbl. f. Bakt., 1. Abt., 1906, 1907.
39) Martin and Cherry. Proc. Royal Society 1898, Vol. LXIII, pag. 420.
*40) Mills, La Clinique, 1903, Nr. 32.
41) Mohr, Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 4

*42) Moreau, Annal. du cercle méd. de Charleroi 1904, Nr. 6.
43) Prausnitz, C., Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 9.
*44) Rosenberg, Arch. intern. de Laryngologie, etc., 1904, Tome XVIII, Nr. 6.
45) Rowland, American Medicine 1904, 17. Dezember.
*46) Schadle, Journ. Amer. Med. Ass. 1906, Vol. II, pag. 605.
*47) Semon, Sir F., Brit. Med. Journ. 1903, pag. 2220.
*48) Solis-Cohen, Journ. Amer. Med. Ass. 1906, Vol. II, pag. 345.
*49) Somers, Proc. Philadelphia County Med. Soc., 1903, Vol. XXIV, Nr. 10; Medicine 1904, Nr. 3; Laryngoscope, 1906, May.
*50) Stein, Chicago Med. Recorder, 1905, Nr. 3; New York Med. Record, 1905, 6. May.
*51) Thost, Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 23; Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 47, Vereinsbeil.
52) Weichardt, Berliner klin. therap. Wochenschr. 1903, 15. Dezember.
53) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 36.
*54) Weigert-Sterne, New York Med. Journ. 1905, Nr. 10.
55) Wolff-Eisner, Beitr. zur klin. Medizin, Festschr. für Senator 1905.
56) Ders., Das Heufieber, sein Wesen und seine Behandlung, München 1906.
57) Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 7.
*58) Wood, Therap. Review, 1904, Nr. 8.
59) Wymann, Autumnal Catarrh, New York 1872.
*60) Zarniko, Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 37.

XVII.

Über Phagocytose.

Von

Dr. C. Levaditi,

Abteilungsvorsteher am Institut Pasteur in Paris.

Einleitung.

Bei einer ganzen Reihe biologischer Vorgänge, z. B. der Entzündung, der natürlichen, der erworbenen Immunität, den Resorptionsvorgängen im Verlauf der senilen Involution usw. nimmt das interessante Phänomen der Phagocytose einen so breiten Raum ein, daß die bloße Aufzählung und Beschreibung der hierher gehörigen objektiven Tatsachen einen stattlichen Band für sich in Anspruch nehmen würde. Einen Begriff davon gibt das Werk METSCHNIKOFFS: „Die Immunität bei Infektionskrankheiten“ [136]).

Dem Charakter und Zweck des vorliegenden Buches entsprechend, ist hier der Hauptnachdruck auf die Methodik und Technik der phagocytären Reaktionen in ihren Beziehungen zur angebornen respektive erworbenen Immunität gelegt worden, ohne indeß theoretische Erwägungen ganz auszuschließen. Die bloße Aufzählung technischer Vorschriften und Kniffe hätte ein unorganisches Konglomerat ergeben müssen und dem Verständnis des nicht durch und durch sachkundigen Lesers die größten Hindernisse in den Weg gelegt. Der Ausgangspunkt für die Gliederung des reichen Stoffes bildet die phagocytäre Theorie der Immunität mit den hierher gehörigen Forschungsergebnissen; und zwar folgt jedesmal auf die beschreibende Darstellung einer Tatsachenreihe die genaue Anleitung zu den betreffenden experimentellbiologischen Versuchen.

Naturgemäß erhebt unter diesen Voraussetzungen die vorliegende Darstellung keineswegs Ansprüche auf Orginalität. Sie möge dafür genommen werden, was sie ist: eine Zusammenfassung der wichtigsten Punkte in METSCHNIKOFFS zahlreichen Veröffentlichungen über Phagocytose, vor allem in den beiden Werken: „Über die Immunität bei Infektionskrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der Cellu-

lartheorie“ [137]) und „die Lehre von den Phagocyten und deren experimentelle Grundlagen“ [138]).

Unter den äußerst zahlreichen in der Phagocytoseliteratur niedergelegten Versuchsanordnungen und Technicismen der verschiedenen Autoren habe ich auf Grund eigener, mehrjähriger Erfahrung in diesen Fragen, mit Sorgfalt diejenigen ausgewählt und dargestellt, die zugleich praktisch und einfach zu handhaben und bei denen Mißerfolge am wenigsten zu erwarten sind.

Geschichtliches.

Den ersten Hinweis auf die Möglichheit der Aufnahme niederster einzelliger Organismen durch lebende Zellen findet sich in einer Bemerkung von Panum [163]) über die Beobachtung von Rawitsch, daß Fäulniserreger, nach Einverleibung in lebendes tierisches Gewebe, schließlich spurlos verschwinden. Panum bemerkt hierzu, daß es sich sehr leicht um die Aufnahme der Spaltpilze in Körperzellen handeln könne; hatte doch Birch-Hirschedld festgestellt, daß Mikrokokken, die in die Blutbahn injiziert werden, zum größten Teil in die Blutkörperchen eindringen und schließlich in den Lymphdrüsen und der Milz auftauchen.

Abgesehen von der heute nicht mehr akzeptablen Hypothese des aktiven Eindringens der Bakterien in die Blutzellen, unterliegt es keinem Zweifel, daß die Bemerkung von Panum sich auf phagocytäre Vorgänge zwischen weißen Blutzellen und gewissen Mikroorganismen bezieht. Nach Metschnikoff [137]) muß Karl Roser [681]) gleichfalls, und vielleicht mit noch mehr Recht, zu den Vorläufern der phagocytären Immunitätslehre gezählt werden. In einer 1881 in Marburg veröffentlichten Broschüre drückt er sich folgendermaßen aus: „Die Immunität vollkommen gesunder Tiere und Pflanzen gegenüber Infektionspilzen beruht meiner Auffassung nach 1. auf dem relativen Salzgehalt ihrer Flüssigkeiten, 2. auf der Fähigkeit ihrer kontraktilen Zellen, den eindringenden Feind in sich aufzunehmen“. Roser hat also schon 1881 auf die Beziehungen zwischen der Widerstandskraft des Organismus gegen eine Infektion und die Phagocytose der betreffenden Infektionserreger durch Zellen des bedrohten Organismus hingewiesen. Leider ist Roser auf die ganze Frage nicht weiter eingegangen; ja er hat sich sogar in einer späteren Veröffentlichung [182]) gegen die Auffassung erklärt, daß Entzündung und die sie fast immer begleitende Phagocytose der Ausdruck eines Kampfes zwischen Körpergewebe und eindringenden pathogenen Spaltpilzen seien.

Metschnikoff blieb es somit vorbehalten, die Phagocytentheorie in die Immunitätslehre einzuführen und auf eine begründete Basis zu stellen. Den ersten Baustein legte er schon vor 25 Jahren. Seitdem hat er teils allein, teils durch seine zahlreichen Schüler, Tatsache auf Tatsache gehäuft, um seine einheitliche Auffassung der die Immunität bedingenden Wirksamkeiten immer wieder zu stützen. Das Wesentliche seiner Anschauung läßt sich in der Kürze folgendermaßen ausdrücken:

„Jedesmal, wenn ein Organismus, der entweder von Hause aus (natürliche, angeborene Immunität) oder auf eine andere bestimmte Weise (künstliche, erworbene Immunität) unempfindlich gegen die pathogene Wirkung eines bestimmten Krankheitserregers ist, respektive geworden ist, mit diesem letzteren in Konflikt gerät, entwickelt sich ein Kampf zwischen den Krankheitserregern und den Phagocyten des bedrohten Individuums. Aus diesem Kampfe gehen die Phagocyten als Sieger her-

vor, insofern, als sie die Mikroben in das Innere ihres Protoplasmaleibes einschließen, sie dort mehr oder minder verdauen und dadurch unschädlich machen.“

Diese intracelluläre, in den Freßzellen vorsichgehende Verdauung der Infektionserreger ist eben in der Mehrzahl der Fälle die letzte Ursache der natürlichen, sowie der erworbenen Immunität. Wo die Zelle nicht imstande ist, das Verdauungsgeschäft durchzuführen und das Virus zu zerstören, verhindert sie wenigstens die Weiterentwicklung und Vermehrung ihrer Opfer. (Tetanussporen in Kaninchenphagocyten u. a.)

Den Ausgangspunkt der Metschnikoffschen Lehre bildete jedoch nicht das Studium des reciproken Verhaltens von Körpergewebe und pathogenen Mikroorganismen, wie man vielleicht annehmen könnte; vielmehr war es die Analyse einer ganz anderen Kategorie von Tatsachen, die den Gelehrten auf die Bedeutung der Phagocyten für die Immunität aufmerksam werden ließ. Zur Zeit, als er seine ersten Veröffentlichungen über die intracelluläre Verdauung und die Rolle der mesodermalen Gewebe in der Resorption von körperfremden Elementen (1882—1883) machte, war es ihm gelungen eine Reihe von Befunden sicherzustellen, deren Tragweite er damals nur ahnen konnte.

Die erste überaus bedeutungsvolle Feststellung, die er machte, war, daß es außer der extracellulären Verdauung durch die in den Digestionstraktus secernierten Verdauungsfermente, wie sie bei den höheren Tieren die Norm bildet, noch eine andere Art der Digestion und Absorption bezw. Assimilation gibt, nämlich im Innern des Zellprotoplasmas selbst.

Diese, von Couch und G. Lews[31]) noch nicht geahnte, dagegen von Krukenberg lebhaft bestrittene intracelluläre Verdauung läßt sich ohne weiteres demonstrieren. Man braucht dazu nur, wie es Metschnikoff[139]) und neuerdings Mesnil gemacht haben, das Schicksal von Nahrungspartikelchen im Innern von Aktinien mit Aufmerksamkeit zu verfolgen. Man sieht dann, daß solche feste Partikel, sowie sie in die Leibeshöhle des Versuchsobjektes hineingelangen, sofort von feinen Filamenten ergriffen werden, mit welchen die Wandungen des Cöloms austapeziert sind. Kurz darauf fangen die Epithelzellen dieser Filamente an Protoplasmafortsätze (Pseudopodien) auszustrecken, mit denen sie die Nahrung umgreifen und nach und nach sich vollständig einverleiben. Es erfolgt eine mehr oder minder vollständige und mehr oder minder rasche Verdauung der Speiseteilchen durch intracelluläre Fermente und die Resorption der assimilierbar gewordenen Produkte. Besonders schön läßt sich das alles an kernhaltigen Erythrocyten verfolgen (Mesnil)[132]). Man sieht dann, daß die Blutzellen völlig intakt bleiben, solange sie frei im Innern der Actinie sich befinden; jedoch eine ganze Reihe regressiver Veränderungen von dem Moment an durchmachen, wo sich das Protoplasma einer Epithelzelle um sie legt. Der Faktor für diese Veränderungen, deren digestiver Charakter nicht angezweifelt werden kann, ist ein dem Papaïn sehr nahe- stehendes diastatisches Ferment aus den epithelialen Belegzellen jener Filamente, die Aktinodiastase (Mesnil). Ec wirkt sowohl in neutraler als auch in schwach saaurer und schwach alkalischer Lösung.

Es entsteht nun die Frage, ob sich analoge Vorgänge bei höher stehenden Tieren, z. B. den Vertebraten, nachweisen lassen, wenngleich es a priori wahrscheinlich ist, daß die primitivste Form der Verdauung: die intracelluläre (intraprotoplasmatische) Gewinnung assimilierbarer Stoffe

aus dem Nährrohmaterial, bei relativ vollkommenen Organismen mit weitgehendster Spezialisierung des zur Verdauung bestimmten Apparates in seinen einzelnen Teilen, nur auf einer sehr niedrigen Stufe ontogenetischer Entwicklung auftritt. Jedoch läßt sich ohne weiteres zeigen, daß körperfremde Substanzen aus der Klasse der Eiweißstoffe unter gewissen Bedingungen auch im ausgebildeten Vertebratenorganismus der intracellulären Verdauung unterliegen, indem sie von bestimmten, dem Mesenchym entstammenden Freßzellen, den Makrophagen Metschnikoffs aufgenommen werden und in deren Protoplasma die Veränderungen durchmachen, die wir für die Verdauung bei Aktinien kennen gelernt haben.

Bringt man z. B. kernhaltige rote Blutkörperchen (Gänseblut) in die Peritonealhöhle eines Meerschweinchens, so sieht man, wie sie sehr bald von großen einkernigen Leukocyten (Makrophagen) mit Beschlag belegt werden; wie ihr Hämoglobin sich in das umgebende Protoplasma hinein auflöst, der ovale Umriß des Blutkörperchens einer mehr unregelmäßigen Zeichnung Platz macht, bis schließlich nur noch der Kern der phagocytierten Zelle sichtbar ist, der der Verdauung auch am längssten widersteht[136]).

Technik. Ein Teil defibrinierten Gänseblutes wird mit zwei Teilen einer sterilen 0,85 %igen (isotonischen) Kochsalzlösung versetzt und das Gemisch zentrifugiert; vorsichtig wird die Flüssigkeit vom Bodensatz dekantiert, zu diesem frische Kochsalzlösung hinzugefügt und abermals zentrifugiert. Die derartig gewaschenen Blutzellen werden in steriler Kochsalzlösung aufgeschwemmt und etwa zwei Kubikzentimeter dieser Aufschwemmung in die Peritonealhöhle eines Meerschweinchen injiziert. Die Beobachtung geschieht an kleinen Tröpfchen des entstehenden peritonealen Ergusses, die man mit einer Glaskapillare durch einfachen Einstich entnimmt. Man untersucht sowohl im frischen ungefärbten Präparat, als auch mit vitaler Färbung oder wendet schließlich an fixierten Präparaten Doppelfärbungen an.

Untersuchung des frischen Präparates. Man untersucht in der bekannten Weise „im hängenden Tropfen“: ein Tröpfchen des Exsudates wird auf ein größeres Deckglas gebracht, letzteres umgedreht und vorsichtig auf einen hohlgeschliffenen Objektträger gelegt, den man vorher mit etwas Vaseline bestrichen hat. Oder aber noch einfacher: man bringt einen entsprechend großen Tropfen zwischen einen gewöhnlichen Objektträger und ein Deckglas und verstreicht dessen Rand mit Vaseline.

Untersuchung mit vitaler Färbung. a) Mit Brillantkresylblau nach Nakanishi[157]). Auf einen sorgfältig gereinigten Objektträger bringt man eine alkoholische Lösung von Brillantkresylblau, deren Konzentration so bemessen sein muß, daß die Lösung schön dunkelblau aussieht. Über der kleingedrehten Flamme läßt man den Alkohol rasch verdunsten, wobei der Farbstoff in Form eines leichten blauen Nebels auf dem Glase zurückbleibt.

Auf den so präparierten Objektträger bringt man jetzt den zu untersuchenden Tropfen, deckt rasch ein Deckglas darüber und untersucht sofort. Die Farbe diffundiert langsam in den Tropfen hinein und färbt die zelligen Elemente samt Einschlüssen in elektiver Weise.

b) Mit Neutralrot. Diese von Plato[168]) empfohlene Methode besteht darin, daß der zu untersuchenden Flüssigkeit eine Spur einer 1 %igen Lösung von Neutralrot in isotonischer Kochsalzlösung zugesetzt wird. Die Untersuchung findet entweder im hängenden Tropfen oder in

der gewöhnlichen Weise statt. Wir werden später sehen, welche Bedeutung diese Färbung für die Beurteilung der intimeren Einzelheiten der Phagocytose (Zustand der phagocytierten Elemente, Reaktion des secernierten Verdauungssaftes der Zelle, ihres Protoplasmas usw.) gewinnt.

Dauerpräparat. Man reinigt eine Anzahl Deckgläschen, indem man sie nacheinander durch Salzsäure, Alkohol und Äther schickt und gut trocknet. Der Exsudattropfen wird auf ein so hergerichtetes Deckglas gebracht, ein zweites ohne Druck darauf gelegt. Die Flüssigkeit breitet sich nun gleichmäßig zwischen den Glasplättchen aus. Man braucht diese letzteren nur noch sanft und ohne größeren Ruck auseinander zu ziehen, um gleich zwei Präparate zur weiteren Behandlung zur Verfügung zu haben. (Von Ehrlich empfohlene Methode.) Eine andere besteht darin, daß man den Flüssigkeitstropfen an das eine Ende eines Objektträgers bringt und ihn mittels eines schräggehaltenen Deckgläschens resp. eines zweiten Objektträgers nach dem anderen Ende möglichst gleichmäßig ausstreicht, wobei allerdings die zelligen Elemente mehr an das eine Ende des Präparates zu liegen kommen.

Die Fixierung der Präparate geschieht, nachdem sie völlig lufttrocken sind, durch Einlegen in absoluten Alkohol für 15—30 Minuten; dann läßt man sie abermals gut trocknen und färbt nach einer der Methoden, die weiter unten für Leukocyten angegeben sind. (Karbol-Thionin, Giemsas Farblösung oder Ehrlichs Triacidlösung, s. Absch. III.)

Alle diese Methoden eignen sich vorzüglich zur Darstellung der Phagocytose und der nachfolgenden intracellulären Verdauung von kernhaltigen Erythrocyten im Meerschweinchenperitoneum. Man kann mit demselben Erfolg die roten Blutkörperchen, statt in die Bauchhöhle, auch in den Kreislauf direkt injizieren. Man findet sie dann in den großen Mononukleären der Milz und kann dort Schritt für Schritt die Veränderungen beobachten, die sie in den Verdauungsvakuolen des Phagocytenprotoplasmas durchmachen (Levaditi[100]).

Technik. Ein Kubikzentimeter einer dicken Aufschwemmung von sorgfältig gewaschenen Taubenblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung wird in die Jugularis eines Meerschweinchens injiziert. (Über das Nähere der Technik dieser Injektionen ist das Kapitel „Künstliche Immunität" nachzuschlagen.)

Nach einiger Zeit (ca. $^1/_2$ Stunde) wird das Tier durch Ersticken getötet und die Milz in Essigsäure-Sublimat (3—5 Tropfen Acid. acetic. glac. auf 100 ccm konzentr. $HgCl_2$lösung) fixiert. Paraffineinbettung und Färbung der Schnitte in folgender Weise:

a) Färben in schwacher wässeriger Eosinlösung durch einige Minuten.
b) Rasches Abspülen in Wasser.
c) Färben in 1 $^0/_0$iger wässeriger Methylenblaulösung, 3—4 Minuten.
d) Differenzierung in absolutem Alkohol, dem einige Tropfen Nelkenöl zuzusetzen sind.
e) Alkohol absol., Xylol, Kanadabalsam.

Alle oben geschilderten Phasen der Phagocytierung und intracellulären Verdauung roter Blutkörperchen lassen sich an so behandelten Schnitten überaus schön und deutlich demonstrieren.

Wir ersehen aus diesen Befunden, daß auch bei höheren Organismen intracelluläre Verdauung vorkommt. Hat im allgemeinen die höhere Organisation eine sorgfältige Verteilung des Verdauungsgeschäfts auf eine ganze Reihe von Organen und Organapparaten bedingt, so ist doch offenbar einer besonderen Kategorie von Zellen die Fähigkeit

geblieben, in ihr Inneres gelangende Substanzen im Sinne der Assimilationsfähigkeit mehr oder weniger zu verändern und schließlich zur Resorption zu bringen. Das ist die eine fundamentale Tatsache, durch deren Kenntnis resp. Entdeckung METSCHNIKOFF zur Konzeption seiner Phagocytentheorie der Immunität geführt wurde.

Die andere besteht in der Erkenntnis der funktionellen Bedeutung der vom Mesoderm abstammenden Gewebe, ihrer intimen Beziehungen zu den resorptiven und digestiven Fähigkeiten des Organismus. Eine im Jahre 1882 zu Messina ausgeführte Versuchsreihe, die darin bestand, daß er verschiedenes körperfremdes Material in das Mesenchym von *Bipinnarien* (Seesternlarven) einbrachte und die eintretenden Gewebsveränderungen beobachtete, brachte METSCHNIKOFF zu der Überzeugung, daß weitgehende Analogien zwischen der so hervorgerufenen Reaktion einerseits und den Vorgängen bei der Entzündung andererseits bestehen. In diesem und jenem Fall erfolgt in der nächsten Umgebung des reizausübenden Fremdkörpers (so auch der diversen Bakterien) eine lebhafte Anhäufung von Zellen des Mesenchyms, Leukocyten sowohl als auch fixer Elemente, die sich der Störenfriede bemächtigen, mit ihrem Protoplasma einhüllen, unschädlich machen, zerstören. METSCHNIKOFF sah sich außerdem veranlaßt, diesen Phagocyten die Fähigkeit einer gewissen Auswahl in dem Sinne zuzuschreiben, als sie von den jeweilig vorhandenen Fremdkörpern nur die zum Objekt ihrer Tätigkeit wählen, die ihnen als Nahrung dienen können. (So bleiben z. B. Seeigeleier im Innern von *Phylirrhoë* völlig intakt.) Alle diese Befunde, ferner die Rolle der Mesodermzellen bei der Resorption nekrotischer Partien von *Bipinnaria asterigera,* endlich die Existenz von Zellen mit Bakterieneinschlüssen bei *Botryllus* brachten METSCHNIKOFF zu dem Schluß, daß die vom mittleren Keimblatt herstammenden Zellen ein System darstellen, dessen eine sehr wichtige Aufgabe es ist, den Organismus gegen krankheitbringende, bakterielle und andere Eindringlinge zu schützen.

Zur Zeit, als METSCHNIKOFF diesen Gedanken faßte, konnte er sich freilich nur auf Überlegungen und Befunde stützen, welche in einem lediglich sehr losen Zusammenhang mit den geweblichen Veränderungen standen oder wenigstens zu stehen schienen, die man bei Infektionen höherer Tiere, insbesondere der Säuger und des Menschen kannte. Trotzdem keine eigenen Beobachtungen über den Verlauf solcher Infektionen vorlagen, zögerte METSCHNIKOFF auf dem Naturforscherkongreß 1883 in Odessa nicht seinem Gedanken Ausdruck zu geben und zu behaupten, daß die Dinge bei den Vertebraten ebenso liegen müßten, wie bei niederen Tieren, und **daß der Grund für die Heilung von Infektionen in der Aufnahme der Krankheitserreger in die Phagocyten des betroffenen Organismus und ihrer intraprotoplasmatischen Verdauung und Vernichtung innerhalb dieser Freßzellen zu suchen sei.**

Mit dieser Theorie stieß METSCHNIKOFF auf heftigen Widerspruch, der sich im wesentlichen aus Beobachtungen an Präparaten von HOYER ableitete. Es waren dies Schnitte von Organen an Milzbrand gefallener Tiere. Man sah sehr deutlich massenhaft freiliegende Bakterien auch in der nächsten Nähe der von METSCHNIKOFF als Phagocyten bezeichneten Zellen, die aber keinerlei Beziehung zu diesen Bakterien aufwiesen. Das sprach gegen METSCHNIKOFFs Auffassung. Die Erklärung war jedoch leicht zu geben: es handelte sich um Tiere, die der Infektion erlegen, für dieselbe also empfänglich waren und deren Phagocyten eben nicht imstande waren,

den befallenen Organismus zu verteidigen; die Verhältnisse entsprachen also durchaus den theoretischen Voraussetzungen. Wollte man ein klares Bild von der Rolle der Freßzellen im Kampfe des Organismus gegen die Infektion gewinnen, so war es geboten, vielmehr ein Tier als Versuchsobjekt zu wählen, das gegen Milzbrand von Hause aus immun ist. METSCHNIKOFF ging sofort an die Untersuchungen heran und veröffentlichte die Resultate im Jahre 1884[140]). Er stellt in dieser Arbeit direkte Beziehungen fest zwischen dem Grad der Empfänglichkeit eines Tieres für Milzbrandbazillus und der Art und Weise, wie die Phagocyten der betreffenden Tierart sich diesem Spaltpilz gegenüber verhalten.

Das war der Ausgangspunkt der langen Reihe von Arbeiten METSCHNIKOFFS und seiner Schule über die Rolle der Phagocyten in den verschiedensten Fällen von natürlicher und erworbener Immunität, die uns aus der Pathologie bekannt sind. Der wichtigsten dieser Arbeiten wird im Kapitel über Immunität Erwähnung getan werden. Inzwischen gehen wir an das Detailstudium der Phagocyten und ihre Klassifikation heran, und wollen versuchen, dabei zu einer einheitlichen Auffassung und Begriffsbestimmung zu gelangen.

Was nennen wir „Phagocyten"?

Mit einer einzigen Ausnahme, gehören alle uns bekannten Zellen, deren Charakteristikum es ist, körperfremde Partikel aufzunehmen und in ihrem Protoplasmaleib festzuhalten, dem mittleren Keimblatt an. Wir gehen also nicht fehl, wenn wir sagen, daß die Phagocytose im allgemeinen eine Funktion des Mesoderms ist. Die erwähnte Ausnahme wird durch die Nervenzelle dargestellt, die nach SUDAKEWITSCH[202]), BABES[4]) u. A. unter entsprechenden Verhältnissen eine größere oder geringere Anzahl von Leprabazillen beherbergen kann, die nach Ansicht METSCHNIKOFFS durch phagocytäre Tätigkeit ihrer Wirte dahinein gelangt sind. Alle sonst im Körper vorkommenden Zellen, die mit solchen Eigenschaften ausgerüstet sind: die freien Leukocyten des Blutes und der Lymphe, die fixen Mononucleären der Milzfollikeln und der Lymphdrüsen entsprechen ihrem Ursprung nach durchaus dem oben aufgestellten Grundsatz.

METSCHNIKOFF teilt die Phagocyten nach zweierlei Gesichtspunkten ein: erstens nach ihrem morphologischen und funktionellen Verhalten; zweitens nach ihren Beziehungen zu dem umgebenden Gewebe. Von diesem letzteren Gesichtspunkt aus ist eine scharfe Trennung zu machen zwischen mobilen, frei sich bewegenden Phagocyten, und stabilen, fixen, an bestimmte Gewebe und Organe gebundenen. Zu den ersteren gehören die Blut- und Lymphleukocyten, ohne daß freilich alle weißen Blut- und Lymphzellen als Freßzellen fungieren könnten oder müßten. So scheinen z. B. die kleinen Lymphocyten (nach der EHRLICHschen Bezeichnung) mit ihrem stark basophilen Kern und schmalem Protoplasmasaum, nicht imstande zu sein, irgendwelche Zellen oder Mikroorganismen aufzunehmen bzw. zu verdauen. Dazu stimmt recht gut, daß nach allem bis jetzt bekannten, ihr Protoplasma sich nicht aktiv bewegt, daß ihnen ebenso die Eigenschaft der Diapedese ganz abgeht, also Charakteristika mangeln, die den poly- und großen mononuclearen Leukocyten in höchstem Maße eigen sind. Wenn JOLLY[78]),

Almkvist[2]), Wolff[230]), Hirschfeld[68]), Maximow[130]), Rosin und Bibergeil[183]), Houston[69]) u. a. unter ganz speziellen Versuchsbedingungen sich von einer gewissen Beweglichkeit des Lymphocytenprotoplasmas überzeugen konnten, wird man mit Wlassow und Sepp[224]) und ganz im Sinne der Auffassung von Ehrlich und Lazarus[47]) sagen müssen, daß es sich um eine ganz minimale und langsam verlaufende Kontraktion handelt, die nicht imstande ist einen lokomotorischen Effekt auszuüben. Und die von Pröscher[170]), Wolff und Arpad von Torday[232]) und Gottfried Schwarz[191]) angestrebten Beweise der Diapedese von Lymphocyten, stützt sich auf Untersuchungen und Befunde, deren demonstrativer Wert sehr zu wünschen übrig läßt (v. Israel[74]).

Ebensowenig wie die Lymphocyten, sind auch die sogenannten Mastzellen Ehrlichs den Phagocyten zuzurechnen, ganz im Gegensatz zu früheren Anschauungen. Zwar kann man durch geeignete Verfahren richtige Mastzellen-Leukocytosen erzeugen (Schmauch[190]), Levaditi[101])); auch Diapedese ist beobachtet worden; es ist aber bisher nicht gelungen, die Aufnahme von Bakterien oder fremden Zellen in Mastzellen sicher nachzuweisen. Dahingegen lassen sich Modifikationen im quantitativen Verhalten der basophilen Zellen des Rattenperitoneums künstlich erzeugen, und zwar unter dem Einfluß infektiöser und toxischer Faktoren (Fahr[50]), was dafür spricht, daß die Mastzellen ohne eigentliche Phagocyten zu sein, dennoch in gewisser Richtung an den Verteidigungsmaßnahmen des Organismus beteiligt sind.

Von den fixen Phagocyten wird die Hauptmasse von großen mononuclearen Zellen dargestellt, die sich hauptsächlich in den Milzfollikeln und den Sinus der Lymphdrüsen verfinden. Ihr runder oder leicht ovaler Kern ist sehr reich an Kernsaft, das Protoplasma ist gut entwickelt und ist leicht basophil, manchmal sogar schwach acidophil. Sie finden sich auch in größerer Anzahl im Gewebe des Netzes. Es sind Freßzellen par excellence und fremde Zellen und Zelltrümmer, Bakterien, Spirillen (*Spir. gallinarum, anserina*), Pigmentpartikel usw., werden von ihnen aufgenommen und im Sinne der Verdauung weiter verarbeitet. In die gleiche Kategorie gehören nach Metschnikoff die zuerst von Kupffer entdeckten und nach ihm benannten Sternzellen in den intralobulären Kapillaren der Leber. Kupffer hielt diese auffallenden mit längeren Fortsätzen versehenen Elemente zuerst für Nervenzellen, ließ aber diese Auffassung rasch fallen und erklärt sie einfach für Gefäßendothelien (Kupffer[90]). Auf Grund eigener Versuche über die Festnahme artfremder Blutkörperchen durch diese Sternzellen und Untersuchungen von Mesnil, wonach diese Zellen im Embryonalleben nicht vorhanden sind, stimmt Metschnikoff der Kupfferschen Auffassung nicht bei, sondern sieht in den Sternzellen mononucleare Leukocyten die bei ihrer Passage durch die Leberkapillaren festgehalten und hier gewissermaßen verankert worden sind[136]).

Fügen wir zu den aufgezählten Zellarten noch gewisse Endothelzellen, die Knochenkörperchen und einige wenige andere, dem Muskel- resp. Bindegewebe angehörigen Zellgattungen, so haben wir damit die Reihe der fixen Freßzellen erschöpft. Die sogenannten Alveolarepithelien in der Lunge gehören nicht hierher; sie sind nach Metschnikoff und seinem Schüler Tschistowitsch[204]) nichts anderes als mononucleare Blut- und Lymphleukocyten, die, nachdem sie in das Innere einer Alveole gelangt sind, sich auf deren Wandungen fixieren.

Ihre phagocytären Leistungen sind sehr beträchtlich: man findet in ihnen nicht nur Staub- und Kohlepartikel, die auf dem Luftwege in die Alveolen gelangen, sondern auch diverse Mikroben, von denen u. A. genannt sein mögen: der Milzbrandbazillus (TSCHISTOWITSCH, LUBARSCH[108]) und die Spirochaeta pallida von SCHAUDINN und HOFFMANN, der Erreger der Syphilis, den man bei der sogenannten weißen Pneumonie (pneum. alba) phagocytiert und in körniger Umwandlung massenhaft in den alveolären Makrophagen vorfindet (LEVADITI[103]).

Demnach ist, wenn man den Standpunkt von METSCHNIKOFF einnimmt, die Existenz resp. Verbreitung und Bedeutung fixer Phagocyten im Organismus doch recht beschränkt: den Hauptanteil an phagocytären Äußerungen beanspruchen Wanderzellen. Diese fixen Freßzellen spielen noch eine bedeutsame Rolle auch unter mehr normalen Bedingungen: bei der Beseitigung von untergehenden körpereigenen Zellen (Seneszenz, Resorption von abgestorbenem Gewebe, von Blutergüssen usw.).

Hier muß noch kurz die Frage der Umwandlung von Wanderzellen (Leukocyten) in fixe Zellen berührt werden. METSCHNIKOFF[142]) hält diese Umwandlung auf Grund seiner Experimente an Amphibienlarven, trotz der gegenteiligen Ansicht von ZIEGLER für erwiesen. Die peinliche histologische Untersuchung kleiner Entzündungsherde an solchen Objekten zeigte METSCHNIKOFF[143])*), daß ursprünglich bewegliche Zellen, die sich mit Pigment- resp. Karminkörnchen beladen hatten und sternförmige Fortsätze tragen, sich im Entzündungsherd einstellten, hier zu fixen Zellen wurden, ja sogar proliferierten. Da die Streitfrage mehr ins Gebiet der Entzündungslehre, als das der Immunität fällt, soll sie uns hier nicht weiter beschäftigen.

Neben dieser Einteilung der Phagocyten in mobile und fixe, unterscheiden wir nach METSCHNIKOFF noch zwischen Mikrophagen und Makrophagen (Hämo- und Lymphomakrophagen).

Die Mikrophagen entsprechen den polynuclearen Leukocyten (Leukocyten mit polymorphem Kern nach EHRLICH), also meistens kleinen farblosen Zellen mit gelapptem, oft wie ineinander gedrehtem chromatinreichem Kern, der sich durch sehr ausgesprochene Affinität zu den basischen Farbstoffen auszeichnet; das Protoplasma dieser Zellen enthält, wie wir im Abschnitt III auch des näheren sehen werden, eigentümliche, durch spezifische Färbbarkeit charakterisierte Körnungen (Granulationen).

Die Makrophagen sind bedeutend größere Zellen; ihr Kern ist groß und saftreich; der umfangreiche Protoplasmaleib ist im Gegensatz zu dem leicht acidophilie der Mikrophagen, eher basophil und enthält keine Granula (s. Tafel I, Fig. 13 und 14).

Stößt die Bezeichnung „Mikrophagen“ auf keinerlei Mißverständnis, da die so benannten Zellen den polynuclearen Leukocyten genau entsprechen, so ist durch die „Makrophagen“ insofern einiger Anlaß zur Verwirrung gegeben, als darunter durchaus nicht etwa nur die großen Mononuclearen (nach der hämatologischen Nomenklatur) zu verstehen

*) Worin er von NIKIFOROFF[159]) angegriffen wird; die Kritik der NIKIFOROFFschen Arbeit findet man bei METSCHNIKOFF[142]).

sind. In der Metschnikoffschen Einteilung spielt die Ein- resp. Vielkernigkeit eine untergeordnete Rolle gegenüber der Größe der Zelle als Ganzen, dem oft beträchtliche Volumen des Kerns, der Basophilie des Protoplasmas und dem Fehlen von Granulationen. So sind nicht alle Makrophagen mononukleär; solche aus der Peritonealflüssigkeit von Meerschweinchen z. B. weisen oft 2—3 deutliche voneinander getrennte Kerne auf. Ebenso ist die typische Riesenzelle des spez. Tuberkels ein Makrophage, trotz der Vielheit ihrer Kerne.

Daß die Beschaffenheit des Kerns in der Tat nur eine sekundäre Bedeutung hat, ergibt sich auch aus dem Studium der Wanderzellen niederer Wirbeltiere. Während da z. B. bei *Ammocoetes*[136]) die Verhältnisse denjenigen bei Säugern im großen Ganzen entsprechen, liegen die Verhältnisse beim Alligator mississipiensis umgekehrt: bei diesem Tier*) enthalten die Makrophagen bald einen, bald mehrere Kerne, die Mikrophagen, die sich von jenen deutlich durch geringere Größe und reichliche Granulationen, durch ihr tinktorielles und biologisches Verhalten unterscheiden, nur ein einheitliches Kerngebilde.

Ferner gehören in die Gruppe der Makrophagen Phagocyten der allerverschiedensten Provenienz, aus allen möglichen Organen und Geweben, gleichgültig, ob sie nun bewegliche Wanderzellen oder fixe Zellen sind: die granulationslosen Mononuklearen des Meerschweinchenperitoneums; die fixen Freßzellen der Milz, der Lymphdrüsen, des Netzes; die Kuppfferschen Sternzellen; die einkernigen großen Zellen der Lungenalveolen (Tschistowitsch); schließlich die Myeloplaxen oder Riesenzellen des Knochenmarks.

Diese letzteren**), große Zellen mit unregelmäßigem Kern, sind echte Phagocyten. In ihrem Innern findet man häufig zahlreiche polynukleäre Leukocyten, die auf solche Weise endgültig aus dem Knochenmark ausgeschaltet werden. Dieser interessante Vorgang ist von Löwit, H. F. Müller, Freiberg[53]), Dominici[43]) und Levaditi[104]) näher untersucht worden. Bei gewissen Tieren (Kaninchen und Meerschweinchen) gehört er zu den normalen Befunden am Knochenmark. Besonders bemerkenswert daran ist der Umstand, daß in diesem Fall zuerst der Kern dem verdauenden Einfluß des Phagocytenprotoplasmas unterliegt, dann die übrige Zelle und daß sich mit diesem Beispiel die strenge Spezifizität (Elektivität) des phagocytären Prozesses besonders schön illustrieren läßt: die Myeloplaxen phagocytieren ausschließlich die sogenannten pseudoeosinophilen Polynuklearen und lassen die echten Eosinophilen unbehelligt.

Dies sind in großen Umrissen die morphologischen Unterscheidungsmerkmale zwischen Mikro- und Makrophagen. Aber ihre Unterscheidung stützt sich nicht nur auf Formenverhältnisse und tinktorielles Verhalten, sondern auch auf funktionelle Verschiedenheiten, die sich z. T. in spezialisierten phagocytärer Avidität, z. T. in sekretorischen Leistungen ausprägt. Mit Bezug auf erstere läßt sich die allgemeine Regel aufstellen, daß den Makrophagen die Vernichtung von Zellen und Zelltrümmern obliegt, während die Mikrophagen hauptsächlich

---

*) Nach Untersuchungen von Frau Podwyssotzki[175]) zitiert nach Metschnikoff.

**) Über diese von Bizozzero entdeckten Riesenzellen des Knochenmarkes siehe die Untersuchungen von Bizozzero und Torre[12]), Korn[85]), Hess[65]), Werner[227]) usf.

Bakterien gegenüber ihre Tätigkeit entfalten*). Von dieser Regel gibt es jedoch mehrfache Ausnahmen.

So können Makrophagen ausnahmsweise auch phatogene Mikroorganismen phagocytieren; z. B. tun dies die sogenannten Riesenzellen, die ja, wie oben erwähnt, als Makrophagen aufzufassen sind, mit dem Tuberkelbazillus und dem *Aktinomyces*. Der Bazillus der Menschentuberkulose wird von den Makrophagen der gegen diesen Parasiten refraktären Taube ebensowenig verschmäht (Dembinski[34]), wie die Sacharow[184]) und Marchoux-Salimbenische[124]) Spirochaete von den Mononuklearen des Peritoneums und der blutbildenden Organe (Cantacuzène[24]), Levaditi, Levaditi und Manouélian[111]), Sawtschenko[196]), usw. usw.)

Andererseits gibt es Fälle, wo Mikrophagen, die Bakterienphagocyten par excellence, ihre Tätigkeit auf tierische Zellen erstrecken. So phagocytieren z. B. die polynuklearen Leukocyten der Meerschweinchenbauchhöhle rote Blutkörperchen, wenn diese vorher mit Ambozeptor**) (sensibilatrice) präpariert worden waren (Sawtschenko[193]).

Abgesehen von diesen wenigen Ausnahmen ist dies oben zitierte Gesetz der funktionellen Verschiedenheit zwischen Makro- und Mikrophagen in den weitesten Grenzen gültig.

Weitere Unterscheidungsmerkmale bieten die sekretorischen Verhältnisse bei den beiden Zellarten dar. Metschnikoff und Tarasèwitsch[204]), haben nachgewiesen, daß das sogenannte Komplement**) des bakteriolytischen Immunserums von den Mikrophagen geliefert wird (daher „Mikrocytase"), während in der anderen großen Reihe der Immunsera, den hämolytischen bzw. cytolytischen Sera, dieses Komplement von Makrophagen sezerniert wird (Makrocytase) (siehe hierzu die gegenseitige Ansicht von Morgenroth und Korschun[86]). Wir werden auf die Einzelheiten dieser Frage, auf die Versuche, die Metschnikoffs Auffassung stützen, im Kapitel über erworbene Immunität ausführlich zurückkommen.

Aus dem bisher gesagten erhellt, daß die Wanderzellen für die Immunität resp. die Abwehrbestrebungen des Körpers eine ungleich größere Bedeutung haben, als die fixen Phagocyten. Denn die ersteren sind es, die an der Eintrittspforte einer Schädlichkeit in so überraschender Menge auftreten und bei der „Entzündung" mitwirken; sie liefern das Material für die mannigfachen im Verlauf von Infektionskrankheiten auftretenden Leukocytosen, und sie stellen schließlich die Stoffe her, die einem Immunserum seine Wirksamkeit nach der oder jener Richtung hin ermöglicht. Daher ist subtile Kenntnis der morphologischen Eigentümlichkeiten der weißen Blutzellen, sowie der zu deren Darstellung anzuwendenden Methoden unerläßlich, wo es sich, wie hier, darum handelt, die Bedeutung der Phagocyten und ihrer Tätigkeit für die Immunität darzustellen und kritisch zu beleuchten.

---

*) Vielleicht spielen sie auch bei der Unschädlichmachung von Bakterienprodukten eine gewisse Rolle.

**) Über die Bedeutung der Begriffe Ambozeptor und Komplement s. d. Handbuch: Sachs, Über Hämolysine.

Morphologie der Leukocyten. Technik der analytischen Methode Ehrlichs.

Ehrlichs sogenannte analytische Methode gründet sich auf die spezifische Affinität der verschiedenen Leukocytengranula zu gewissen Farbstoffen, unter denen die Anilinfarben den ersten Platz einnehmen. So halten die Körnchen im Protoplasma von sogenannten „eosinophilen" Zellen begierig Farbstoffe mit saurem „Auxochrom"*) zurück (Eosin, Säurefuchsin); die „basophilen" Granula der Mastzellen solche mit basischem (Methylenblau, Methylgrün, Dahlia); die „neutrophilen" Granulationen nehmen weder die noch jene Farbstoffe an und färben sich ausschließlich mit neutralen Gemischen beider Gruppen (den Neutralfarben Ehrlichs).

Man hat von dem intimen Mechanismus des färberischen Prozesses trotz reichlicher, freilich zu keiner Übereinstimmung führenden Arbeiten von Knecht und Appleyard[87]), Knecht, Löwenthal und Rawson[88]), Nietzki[158]), Sissley[197]), Giorgiewics und Löwy[58]), Witt[229]) u. a. noch immer keine so ganz präzise Anschauung. Es ist z. B. immer noch offene Frage, ob dieser Mechanismus auf einen chemischen, dem Prozeß der Salzbildung analogen Vorgang hinausläuft, oder ob es sich um rein physikalische, molekulare Dinge handelt. Ohne hier näher auf die Frage einzugehen, sei hier nur erwähnt, daß, wenn manche physikalischen Einflüsse, z. B. Wärmeeinwirkung im speziellen Fall der Leukocytengranula gewisse Modifikationen der Affinität herbeiführen können, andere Tatsachen wieder dafür zu sprechen scheinen, daß die Beziehungen zwischen Granulis und Farbstoffen doch wohl im engeren Sinne chemische sind. Dafür spricht schon per se die Tatsache der Spezifität dieser Granula. Ohne sehr weitgehende Unterschiede in ihrer chemischen Konstitution wäre es unverständlich, daß aus einem Gemisch von Methylenblau und Eosin die acidophilen Körnchen ausschließlich die rote, die basophilen Mastzellengranula wiederum nur die blaue Farbe aufnehmen. In diesem Sinne spricht auch das histo-chemische Verhalten der verschiedenen Zellkörnungen gegenüber diesem oder jenem Reagens.

Auf Grund dieser Befunde hat Ehrlich die verschiedenen Leukocyten des Blutes, der Lymphe und der hämatopoietischen Organe so eingeteilt, wie sich ihre Körnungen tinktoriell verhalten**), selbstverständlich unter systematischer Hinzuziehung physiologischer und genetischer Momente[47]).

1. Technik der diversen Granulafärbungen.

I. Vitale Färbung. Einige sogenannte vitale Färbungen haben wir im II. Abschnitt (s. d.) bereits eingehend kennen gelernt. Die dort gemachten Angaben seien durch einige weiteren Methoden ergänzt, die sich besonders gut zur Darstellung der Leukocytengranulationen eignen.

---

*) Nach der Theorie von O. Witt (Färb.-Zeitschr. 1890) ist die färbende Substanz konstruiert aus einem für diese Farbe charakterischen Kern, dem „Chromophor", und aus einer entweder basischen oder sauren zweiten Gruppe, dem „Auxochrom". Diese letztere wird in sauren Farbstoffen repräsentiert durch die Hydroxylgruppe OH; in basischen durch —NH. Durch Verbindung der ersteren mit Basen, der letzteren mit Säuren kommt der eigentliche fertige Farbstoff zustande. Mithin ist das essigsaure Rosanilin eine basische, das Säurefuchsin, welches das Natronsalz des Sulfroanilins ist, eine saure Farbe.

**) Über das Historische siehe: Ehrlich[45]) und Altmann[3]).

Die Färbung von lebendem Gewebe im lebenden Tiere ist zuerst von Ehrlich[46]) ausgeführt worden. Nach Injektionen von gewissen Farbstofflösungen (Alizarinblau und Methylenblau) entweder subkutan oder intravasikulär, gelang es Ehrlich einerseits das Reduktionsvermögen der lebenden Zelle, andererseits die spezifische Affinität bestimmter Gewebe (Nervenendigungen) für den injizierten Farbstoff festzustellen. Im Anschluß hieran wandte man dieses Prinzip auch in vitro an: man brachte die frisch dem Organismus entnommenen, folglich noch lebenden Zellen, in entsprechende Farblösungen und konnte die sich abspielenden Vorgänge bis in alle Einzelheiten und in allen Phasen verfolgen. Derartige Untersuchungen sind in systematischer Weise von sehr vielen Autoren (bes. L. Michaelis, Plato, Nakanishi, Markus, Bettmann, Wolff, Levaditi und jüngst von Rosin und Bibergeil[183])) und mit allen möglichen Farbstoffen: Methylenblau, Neutralrot, Brillantkresylblau, Methylgrün-Pyronin, angestellt worden und haben zu wichtigen Befunden geführt, von denen die wesentlichen folgen mögen.

Eine grundlegende Tatsache ist die, daß der Zellkern keine Spur von Farbe annimmt, solange die Zelle lebt; während protoplasmatische Granulationen sich gerade dann sehr schön färben und mehr oder weniger den Grundton der Farblösung annehmen*). Die Färbung von Leukocyten gelingt nur dann gut, wenn ihre Lebensfähigkeit im Schwinden ist, was sich äußerlich durch den Verlust der Fortsätze und Abrundung der Form kennzeichnet. Plato[169]) hat darüber mit Neutralrot fortlaufende Untersuchungen angestellt und gefunden, daß extrazellulär liegende Bakterien ungefärbt bleiben, die intrazellulär gelagerten sich dagegen leuchtend rot färben, solange die Vitalität der beherbergenden Zelle intakt ist. Stirbt letztere ab, so verlieren die phagocytären Bakterien (spez. Gonokokken) rasch ihre Färbbarkeit mit Neutralrot. (Markus, Wiener klin. Wochenschr. 1900, Nr. 39.)

Gewisse Eigentümlichkeiten des Neutralrots geben ferner Aufschluß über die Reaktion und Beschaffenheit der von den Phagocyten in Form von Vacuolen gebildeten Zellsekrete. Und zwar dadurch, daß der erwähnte Farbstoff in saurer Lösung leuchtend rot, in alkalischer mehr hellgelb aussieht. Die Tatsache, daß die Kerne roter, von Makrophagen phagocytierter Blutkörperchen sich schön rot färben, ebenso wie phagocytierte Bakterien (Metschnikoff) beweist, daß die intrazelluläre Verdauung in einem sauren Milieu stattfindet (s. Himmel[67])). Metschnikoff hatte schon früher gefunden, und zwar bei Anwendung von kleinen Lakmuskörnchen, daß der Inhalt der Zellvakuolen sauer ist. Dies erklärt auch den oben erwähnten Umstand, daß die Färbbarkeit der Einschlüsse mit dem Tode der Zelle erlischt; in diesem Falle wird eben kein neuer Verdauungssaft mehr sezerniert und der vorhandene diffundiert jetzt aus der Vakuole und ihrem Inhalt in das übrige Protoplasma, dessen gewöhnliche Reaktion nach Metschnikoff[136]) als alkalisch anzusehen ist.

Die Technik der vitalen Färbung ist denkbar einfach. Rosin und Bibergeil[183]) empfehlen folgendes, der Methode von Nakanishi[157]) (resp. Ito[75])) ähnliches Verfahren, das von dem in Abschn. II beschriebenen etwas abweicht.

---

*) Im einzelnen Falle hängt die Nuance der Färbung von der Natur der Körnungen ab; so färben sich z. B. mit Brillantkresylblau die neutrophilen Granulationen grünlich blau, die eosinophilen leuchtend grün, die Mastzellengranula violett bis blau.

Ein nicht zu kleines (24 qmm) sorgfältig gereinigtes Deckglas wird mit der alkoholischen oder wässerigen Farblösung benetzt, die Flüssigkeit mittels eines zweiten annähernd senkrecht aufgesetzten Glasplättchens in gleichmäßiger Schicht verteilt. Unter Vermeidung von Niederschlägen und Kristallbildung läßt man die Lösung verdunsten und trägt dann auf die Farbschicht einen kleinen Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit (Blut, Exsudat usw.) auf, um ihn rasch, in ähnlicher Weise wie vorhin die Farblösung auszubreiten und das Deckglaspräparat kunstgerecht auf einen vorher in üblicher Weise mit Vaseline bestrichenen hohlen Objektträger zu bringen, wo man es leicht andrückt. Ehe so das Präparat austrocknen kann, umzieht man den Rand des Deckgläschens noch mit etwas Paraffin oder Vaseline und geht an die mikroskopische Untersuchung.

Noch einfacher ist es einen Tropfen der zellhaltigen Flüssigkeit mit einem Tropfen einer Neutralrotlösung in physiologischem Kochsalzwasser zusammen auf ein Deckglas zu bringen, gut zu vermischen und in feuchter Kammer (hohlgeschliffener Objektträger) zu untersuchen.

Derartige Präparate konservieren sich genügend lange, so daß man das Schicksal der Phagocyten, resp. der sonst noch vorhandenen Elemente genau verfolgen kann. Immerhin sind es keine Dauerpräparate. Zur Herstellung dieser empfiehlt sich folgende von Golowin[59]) angegebene Methode (für Schnitte): die mit Neutralrot (vital) gefärbten Präparate werden in einer Lösung von Sublimat oder Chrom- oder Pikrinsäure gehärtet und fixiert und dann durch Behandlung mit folgenden Lösungen entwässert:

1. 70 ccm destilliertes Wasser, 40 Tropfen gesättigte Ammoniummolybdatlösung, 30 ccm 90%iger Alkohol.

2. 10 ccm destilliertes Wasser, 20 Tropfen gesättigte Ammoniummolybdatlösung, 90 ccm 90%iger Alkohol.

Zwischen 1. und 2. Alkohol in steigender Konzentration und schließlich

3. konzentr.-alkohol. Lösung von Ammoniumpikrat. Einschließen in der üblichen Weise.

Die Methode ist in erster Linie für Schnittfärbungen bestimmt.

II. Färbung nach vorausgegangener Fixierung. Die Wahl der Fixationsmethode hängt davon ab, welches Färbeverfahren man nachher anzuwenden beabsichtigt.

Will man mit der Ehrlichschen Triacidlösung färben oder handelt es sich in erster Linie um intensive Bakterienfärbung, so fixiert man die Präparate durch Erhitzen; für Methylenblaufärbungen und Behandlung mit einem der Methylenblau-Eosin-Gemische empfiehlt sich mehr die Fixierung durch ein flüssiges Fixans; dergleichen Verfahren liefern im fertigen Präparat auch feinere Details.

Fixierungsverfahren. a) Hitze. Die geeignetste Temperatur für die Darstellung der Zellkörnungen schwankt nach Ehrlich zwischen (110°—150° (höchstens!)). Das einfachste Verfahren besteht darin, daß man das mit Material (Blut usw.) beschickte und lufttrockene Deckglas, 2—3mal durch die Flamme zieht (Engel, Cabot, Marino); aber man riskiert dabei das Präparat zu verbrennen.

Ehrlich empfiehlt das Erhitzen auf einem Kupferblech: ein Stück solchen Blechs von 3 mm Dicke, 5—10 cm Breite und etwa 30 cm Länge wird so auf einen Dreifuß gelegt, daß beide Enden frei in die

Luft ragen. Der eine davon wird durch Unterstellen einer nicht zu hoch brennenden Flamme gleichmäßig erhitzt; nach einiger Zeit ist das Blech an verschiedenen Stellen verschieden stark aber konstant erwärmt. Man stellt die Temperatur der verschiedenen Abschnitte durch Auftropfenlassen von Flüssigkeiten mit bekanntem Siedepunkt fest: Wasser 100°, Toluol 110°, Xylol 139°, Terpentinöl 150°. Man legt die Präparate auf eine Stelle, wo annähernd die optimale Temperatur (120°) herrscht.

Ich gebe dem Verfahren von Rubinstein zur Bestimmung dieser Temperatur den Vorzug: man sucht die Stelle der Kupferplatte, wo — vom kalten nach dem heißen Ende hin — zuerst das Phänomen des „rollenden Tropfens" (Leidenfrost sches Phänomen) auftritt. Indem man z. B. ein Blutpräparat auf 2—5 Minuten an diese Stelle legt, erzielt man eine ganz vortreffliche Fixierung der Leukocyten und ihrer Granula.

Ein weiteres Verfahren ist das von Ehrlich und Lazarus[47]) angegebene: man legt die zu fixierenden Präparate auf den Deckel eines Kupferblechkästchens, das Toluol enthält, sobald dieses letztere, von der Unterfläche aus zum Sieden gebracht ist. Ein Abzugsrohr sichert das Entweichen des Dampfes. Schließlich empfiehlt Türk[207]) zu dem gewünschten Zweck einen Heißluftapparat mit automatischem Quecksilberregulator (Fig. 1).

Fig. 1. Fixierungsapparat nach Türk.

b) Chemische Verfahren. Der absolute Alkohol, rein oder in Verbindung mit anderen Chemikalien, ist für hämatologische Zwecke und speziell für Leukocytenfärbungen das beste Fixierungsmittel. Von einigen Seiten wird empfohlen, die horizontal gelagerten Deckglaspräparate mit einem Gemisch von Alkoholäther (wasserfrei!) zu bedecken und dieses dann spontan verdampfen zu lassen, womit die Fixation beendet ist. Diese Vorschrift ist nicht ganz einwandfrei, weil die Dauer der Fixierung hier in erster Linie von der umgebenden Temperatur abhängt. Vielmehr empfiehlt es sich, die lufttrockenen Präparate mit der Schicht nach oben in eine Petrischale zu legen, absoluten Alkohol darauf zu gießen und mit dem Deckel sorgfältig zu verschließen; nach 15—30 Minuten sind die Präparate in den feinsten Strukturverhältnissen der Objekte fixiert.

In der gleichen Weise kann man, statt des reinen Alkohols, nach dem Vorschlage Türks[207]) ein Alkohol-Formol-Gemisch einwirken lassen:

ein Teil einer 10%igen wässerigen Formollösung auf neun Teile absoluten Alkohol, oder nach HUBER[71b]) fixieren: in einem genügend weiten Glasgefäß ruht horizontal auf einem kleinen Gestell ein Drahtnetz mit den Präparaten. Auf den Boden des Gefäßes gießt man 10% Formol, so daß die Präparate nicht benetzt werden, deckt das Ganze luftdicht zu und läßt die Formalindämpfe 5 Minuten einwirken; dann kommen die Präparate, wie oben beschrieben, in absoluten Alkohol.

TÜRK zieht für das Fixieren von Blutausstrichen den Methylalkohol dem Äthylalkohol vor. Die Anwendung ist die gleiche; nur fixiert der Methylalkol besser und schneller (5′).

Endlich ist noch der Angabe verschiedener Autoren Erwähnung zu tun, daß der Zusatz von Sublimat zum Alkohol ganz besonders gute Dienste für den beregten Zweck leistet.

Färbung. EHRLICHS Triacidlösung. Das Triacid ist ein Farbstoffgemisch, das neben einer basischen und einer sauren Farbe noch einen „neutralen“ Farbstoff enthält und das zuerst zur Darstellung der neutrophilen Granula benutzt wurde. Seine Herstellung und Anwendung ist folgende:

Man benötigt konzentrierte wässerige Lösungen von a) Säurefuchsin, b) Orange G, c) Methylgrün, die man einige Tage vor dem Gebrauch herstellen soll*). Die Lösungen sind im Dunklen aufzubewahren und häufig umzuschütteln. Nach einem definitiven Absetzen bereitet man das Gemisch, indem man in dieselbe Flasche nacheinander bringt:

konzentriertes wässeriges	Orange G . . .	14 ccm
,, ,,	Säurefuchsin . .	6—7 ,,
	destilliertes Wasser	15 ,,
	Alkoh. absol. . .	15 ,,
konzentriertes wässeriges	Methylgrün . . .	12,5 ,,
	Alkoh. absol. . .	10 ,,
	Glyzerin	10 ,,

Die Mischung wird tüchtig geschüttelt und einige Tage stehen gelassen, ehe man sie in Gebrauch nimmt.

Man färbt, indem man auf das durch Hitze fixierte Präparat einige Tropfen der Lösung**) bringt und sie einige Minuten einwirken läßt. Wasserspülung, Trocknen zwischen Fließpapier, Kanadabalsam. Die Kerne der Leukocyten sind blaßgrün, die eosinophilen Granulationen orangerot, die neutrophilen violettrot gefärbt; die Mastzellengranula bleiben ungefärbt.

Gemische aus Eosin und Methylenblau oder Methylenblauderivaten.

Der Ausarbeitung einer wirklich praktischen Vorschrift für Doppelfärbungen mit Eosin-Methylenblaugemischen, sowohl zur Darstellung von Leukocytengranula als auch der Struktureinzelheiten von Protozoen, stellten sich anfänglich große Schwierigkeiten entgegen; erst in neuerer Zeit sind wir durch die Arbeiten von NOCHT, MICHAELIS und GIEMSA in den Besitz brauchbarer Verfahren gesetzt worden.

*) Die Farbstoffe müssen sehr rein sein. Die genannten konzentrierten wässerigen Lösungen entsprechen für Säurefuchsin einer 25%igen, für Methylgrün und Orange G etwa einer 8—9%igen Lösung.

**) Triacid ist gebrauchsfertig von Grübler & Co., Leipzig zu beziehen. Über eine Modifikation siehe PAPPENHEIM[164]).

Ältere Verfahren:

a) EHRLICH und LAZARUS[47]). Unmittelbar vor dem Gebrauch stellt man eine Lösung her von:

1 %igem wässerigen Eosin	10,0 ccm
Methylalkohol	8,0 „
konzentriertem wässerigen Methylenblau	10,0 „

Die hitzefixierten Präparate werden in dieser Mischung 1—2 Minuten lang gefärbt. Die Zellkerne werden blau, die neutrophilen Granula violettrot.

b) CHENZINSKI*):

a) konzentriertes wässeriges Methylenblau .	40,0 ccm
b) 0,5 %ige Eosinlösung in 70 % Alkohol .	20,0 „
c) Aq. dest.	40,0 „

c) L. MICHAELIS[149]). Man bereitet:
Lösung I = 1 %ige wässerige**) Lösung von Methylenblau (zinkfrei)
Lösung II = 1 % Eosin (Tetrabromfluoreszeinkalium pur).

Von diesen Stammlösungen nimmt man:

A. Lösung I	20 ccm
absoluten Alkohol . . .	20 „
B. Lösung II	12 ccm
Aceton (56—58°) . .	28 „

Vor dem Gebrauch gießt man in ein Uhrschälchen 1 ccm A und 1 ccm B zusammen und färbt $^1/_2$—10 Minuten (bis das Präparat einen rötlichen Ton annimmt).

d) von WILLEBRAND[228]):

0,5 %ige Eosinlösung in 70 % Alkohol
konzentrierte wässerige Methylenblaulösung } āā

Man setzt zu 50 ccm dieser Mischung 10—15 Tropfen Eisessig. Vor dem Gebrauch zu filtrieren. Färbedauer 5—10 Minuten.

e) MAY-GRÜNWALD[128]). Man mischt 1 l 1 ‰ige wässerige Eosinlösung mit der gleichen Menge einer 1 ‰ige wässerigen Methylenblaulösung. Nach einigen Tagen bildet sich ein Niederschlag, den man auf dem Saugfilter bis zu völlig klar ablaufendem Spülwasser wäscht, trocknet und in Methylalkohol bis zur Sättigung auflöst. Die trockenen, aber nicht fixierten Präparate kommen auf 2—5—10 Minuten in diese Lösung***). Abspülen mit destilliertem Wasser, dem man vorher einige Tropfen der Farblösung zusetzt.

F. HUBER[71a]). Die Präparate werden erst fünf Minuten in Formol und dann in 96 %igem Alkohol fixiert. Dann bringt man auf die Schichtseite der Präparate zuerst eine 1 %ige wässerige Eosinlösung und fügt, ohne abzuspülen, eine wässerige 1 %ige Methylenblaulösung hinzu. Das Abspülen geschieht in destilliertem Wasser (wichtig!), ebenso wie das Herstellen der Farblösungen. Trocknen. Kanadabalsam Es färben sich alle Granulationen mit Ausnahme der Mastzellengranula.

---

*) Nach TÜRK[207]).

**) Das destillierte Wasser muß absolut rein sein. Man prüft durch Hinzufügen eines Tropfens einer 5 %igen Hämatoxylinlösung: enthält das Wasser Spuren von Alkali, schlägt die Farbe ins rötliche über.

***) Auch die MAY-GRÜNWALDsche Lösung wird gebrauchsfertig von G. Grübler geliefert.

Neuere Verfahren. Die mit den eben geschilderten Methoden zu erzielenden Resultate sind im allgemeinen befriedigend. Immerhin ist die getrennte Anwendung der Eosin- und Methylenblaulösungen sehr umständlich und die Färbung der neutrophilen Granula gelingt auch nicht immer mit Sicherheit. Die auf Vereinfachung und Verbesserung der Eosin-Methylenblaufärbung für Bakterien, Protozoen, Zellelemente, Blut usw. gerichteten vielfachen Bestrebungen, sind so von Erfolg gekrönt worden, daß wir heute über eine ganze Reihe sozusagen vollkommener Vorschriften verfügen.

Es fiel zuerst ROMANOWSKI[180]) und nach ihm ZIEMANN[136]) auf, daß es gelingt bei Benutzung alter Methylenblaulösungen und besonderer Kombination mit Eosinlösungen ein in Malariaparasiten und Trypanosomen vorkommendes winzige Gebilde (Centrosom von LAVERAN und MESNIL) leuchtend rot zu färben, ein Befund, den man bis dahin an E.-M.-Präparaten noch nicht gemacht hatte. NOCHT[161]) und MICHAELIS[150]) zeigten nun, daß die genannte Färbung auf der Anwesenheit eines vom Methylenblau differenten Farbstoffes in jenen alten Lösungen beruht, dem „Rot aus Methylenblau“ (NOCHT) oder „AZUR“ (MICHAELIS).

Wir gehen hier nicht auf alle die zahlreichen Verfahren ein, die in der Anwendung basischer, das Azurblau enthaltender Farbmischungen bestehen (Methoden von LAURENT[93]), LEISHMAN[97]), NOCHT, MICHAELIS u. a.), beschränken uns vielmehr auf diejenige, die heute speziell zu Bluntuntersuchungen die gebräuchlichsten und praktischesten sind.

a) GIEMSAS[57]) Methode. Die von G. Grübler gelieferte GIEMSA-lösung wird folgendermaßen hergestellt:

Azur II-Eosin	3,0 g
Azur II	0,8 g.

Diese Mischung wird im Exsikkator über Schwefelsäure peinlichst getrocknet und dann pulverisiert. Man fügt 250 g chemisch reines Glyzerin (Merk) hinzu, läßt die Farbe sich bei 60° lösen und fügt 250 ccm Methylalkohol (Kahlbaum I) hinzu, erwärmt abermals bis zu der angegebenen Temperatur, läßt erkalten und kann die Lösung gleich benutzen.

Färbung: Fixieren in Methylalkohol 2—3 Minuten. Färben in einer Lösung von „GIEMAS Lösung für die ROMANOWSKI-Färbung“. 1 Tropfen auf 1 ccm Wasser. Dauer 10—15 Minuten. Wasserspülung. Trocknen, Balsam*).

b) Methode von MARINO[125]). Man stellt eine Lösung her, welche auf 100 Teile Wasser 0,5 Methylenblau, 0,5 Azurblau und 0,5 Na_2CO_3 enthält. Man läßt das Gemisch 24—48 Stunden bei 37° stehen und setzt sodann eine zwischen 0,1 % und 0,3 % schwankende Eosinlösung hinzu. Es entsteht ein Niederschlag, den man auf das Filter bringt und trocknet. Lösung A**) besteht aus 0,2 ccm dieses Niederschlages und 100 ccm Methylalkohol; Lösung B = wässerige Eosinlösung 0,05 : 1000,0.

Färbung: Auf das lufttrockene, jedoch nicht fixierte Deckglaspräparat kommen 4 Tropfen Lösung A; nach 3 Minuten fügt man, ohne

---

*) Man kann die Färbekraft der (verdünnten) GIEMSAschen Lösung wesentlich erhöhen, indem man zu 10 ccm derselben 1—2 Tropfen einer 1 %igen Lösung von Natriumkarbonat zusetzt.

**) Wird von der Firma Cogit-Paris, Boulevd. St. Michel geliefert.

die erste Farbe zu entfernen, 8—10 Tropfen B und färbt weitere 2 Minuten. Dann Waschen, Trocknen auf Fließpapier, Kanadabalsam.

Die Kombination von Eosin und Methylenblau kann auch für das Studium von Leukocyten, Phagocytosedetails, Bakterienfärbung usw. in Organschnitten verwendet werden; z. B. mit dem:

1. Verfahren von Schridde[192]). Die dünnen (5 mm) Paraffinschnitte werden 20 Minuten in einer Lösung von zwei Tropfen Grüblerscher-Giemsa-Lösung auf ein Kubikzentimeter Wasser gefärbt, im Wasser abgespült und in Aceton differenziert und entwässert. Xylol, Balsam.

2. Methode von Zieler[235]). Färben der Schnitte in einer $^1/_4$ $^0/_0$-igen Verdünnung der May-Grünwaldschen Farblösung in Methylalkohol 2—3 Minuten. Abspülen in destilliertem Wasser, Entwässern in reinem (säurefreiem) Aceton. Xylol usw.*)

3) Methode von Levaditi: Färben der in Formol gehärteten Paraffinschnitte in unverdünnter Giemsa-Lösung 5—10 Minuten. Abspülen in Wasser. Differenzieren in absolutem Alkohol, dem einige Tropfen Nelkenöl zugesetzt sind; absoluter Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Mit dieser letzteren Methode werden die neutrophilen Granulationen nicht gefärbt; dagegen ist sie außerordentlich geeignet für die Darstellung von phagocytären Prozessen und für Bakterienfärbung in Geweben.

2. Die Klassifikation der weißen Blutkörperchen von hämatologischen Gesichtspunkten aus.

I. Unter Zugrundelegung morphologischer Verschiedenheiten und dem Verhalten der Granulationen in tinktorieller Hinsicht kann man, in Übereinstimmung mit Ehrlich[47]) und der Mehrzahl der Autoren, die weißen Zellen des Blutes und der Lymphe in mehrere Kategorien sondern, deren Hauptunterscheidungsmerkmale folgende sind:

1. Die kleinen Lymphocyten. Kleine rundliche Zellen mit rundem Kern, der fast die ganze Zelle einnimmt. Das sehr stark basophile Protoplasma erscheint nur als schmaler Saum um die Masse des Kerns herum. Auf Methylenblaupräparaten sieht dieser letztere bläschenförmig aus und hebt sich hell von dem intensiv blau gefärbten Protoplasma ab. Bei Behandlung mit Methylgrün-Pyronin (Pappenheim) nimmt dieses Protoplasma einen leuchtend roten Ton an.

2. Die großen Lymphocyten. Sie gehören in dieselbe Gruppe, wie die vorigen, haben aber größere Dimensionen. Der Kern ist rundlich bis oval, saftreicher als der Kern der kleinen Lymphzellen; das Protoplasma ist entwickelter.

In beiden Arten lassen sich mit gewissen Färbemethoden Kernkörperchen (Nukleoli) in den Kernen feststellen.

Noch vor einigen Jahren glaubte man, daß sowohl die großen wie auch die kleinen Lymphocyten gänzlich ungekörntes Protoplasma enthielten und schied daraufhin die Gesamtmasse der Leukocyten in zwei Hauptgruppen: solche ohne Granula (Lymphocyten) und solche mit granuliertem Protoplasma (eosino-, neutro- und basophile). Die Untersuchungen von

*) Siehe auch K. Helly[64]).

L. MICHAELIS und WOLFF[151]) haben indes gezeigt, daß mit der ROMANOWSKI-Färbung in ungefähr $^1/_3$ aller Lymphocyten sich eine charakteristische Körnung nachweisen läßt, wobei diese Azurgranula einen bläulich-roten Farbton annehmen.

In einer neueren Publikation kommt WOLFF[231]) auf die Frage der Lymphocytengranula zurück. Er behauptet darin, sie seien in allen Lymphocyten konstant vorhanden; wenn man sie in Azurblaupräparaten nur in einer gewissen Anzahl dieser Zellen fände, so läge das an der leichten Löslichkeit der Granula im Wasser, so daß sie im Farbebad zerstört würden.

Eigene Untersuchungen (LEVADITI[107])) haben das Vorkommen von Körnungen im Lymphocytenprotoplasma und ihre strenge Spezifizität (histochemischen Reaktionen) bestätigen können; zugleich aber gezeigt, daß ihr Vorkommen ein inkonstantes ist. Des weiteren haben diese Untersuchungen, in Übereinstimmung, mit Befunden TÜRCKS, nachgewiesen, daß nicht nur in Lymphocyten, sondern auch in den großen Mononuklearen und einigen der sogenannten „Übergangsformen" (EHRLICH) feinste Protoplasmakörnungen vorkommen, die allerdings nur an sublimatgehärteten (LINSAYsche Lösung) GIEMSApräparaten sichtbar sind.

Keineswegs vermag die Entdeckung dieser Granula der EHRLICHschen Einteilung der weißen Blut- usw. Zellen in Granulocyten und nicht granulierte Leuko-(Lympho-)cyten ihre Berechtigung zu entziehen. Denn ganz im Gegensatz zu der Konstanz der Leukocytengranula, kommen die Azurgranula eben nur bei einem Bruchteil aller Lymphocyten vor, und dann gründet sich außerdem die obige Einteilung nicht nur auf rein morphologische Unterschiede, sondern auch auf cytogenetische und funktionelle Momente.

3. Große Mononuklearen und Übergangsformen. Diese Gruppe ist von den voraufgehenden scharf zu trennen. Ihre Angehörigen sind relativ große Zellen (bedeutend größer als die großen Lymphocyten), mit rundem, ovalem, manchmal auch gelappten Kern, der stark basophil ist, während das Protoplasma basische Farbstoffe weniger gut annimmt. Die sogenannten „Übergangsformen" enthalten vereinzelt neutrophile Granula. (EHRLICH).

4. Leukocyten mit polymorphem Kern. Fälschlich als „polynukleare Leukocyten" bezeichnet, sind diese Zellen in erster Linie durch einen unregelmäßigen Kern charakterisiert, deren einzelne Lappen durch feinste Chromatinfäden miteinander in Verbindung stehen, die meist so zart sind, daß sie im Jugendalter der hämatologischen Forschung wohl übersehen werden konnten, so daß der Anschein einer „Vielkernigkeit" erweckt wurde. Der Kern der polymorphen Leukocyten ist stark basophil, das Protoplasma dagegen deutlich acidophil. Eigentümlich ist letzterem auf den ersten Blick die Anwesenheit größerer und kleinerer Granula. Je nach dem Verhalten dieser Granula gegenüber gewissen Farbstoffen unterscheidet man: neutrophile (= pseudoeosinophile L. der Nager), eosinophile (acidophile) und basophile Leukocyten (Mastzellen).

a) Neutrophile L. Ihr Protoplasma enthält zahlreiche feine Körnchen, (ε-granula EHRLICHS) die sich elektiverweise mit Gemischen färben, die einen neutralen Farbstoff enthalten, also z. B. mit Triacid. Sie sind sehr fragil, sowohl in verdünnten Säuren, wie in verdünnten Alkalien löslich.

Die polymorphkernigen neutrophilen Leukocyten sind die Phagocyten par excellence; zu ihnen zählt die Hauptmasse der Mikrophagen METSCHNIKOFFS.

b) Eosinophile L. Ihr Kern ist weniger unregelmäßig und nicht so stark basophil, wie der der vorigen Gruppe; häufig ist er zweilappig und zeigt Hufeisenform (JOLLY). Das Protoplasma enthält gröbere, stark lichtbrechende Körnchen, die sich elektiv mit sauren Farbstoffen (Eosin, Säurefuchsin) färben. Diese Granula (α-granula EHRLICHS) erweisen sich auch als viel beständiger gegenüber den mikrochemischen Reagentien als die ε-granulationen. Ihre Form ist rund bis oval.

Zu bemerken ist, daß bei manchen Tierspezies, besonders beim Frosch und bei Vögeln (Gans) die α-Granula nicht rundlich, sondern mehr eckig, ja kristallförmig auftreten (kristalloide Granulas). Ähnliche Formen von α-Granula hat LEVADITI[104]) in besonders fixierten Blutpräparaten gewisser Nager gefunden*).

Die eosinophilen Leukocyten spielen nur in seltenen Fällen die Rolle von Phagocyten. Persönlich habe ich mich wenigstens im Reagenzglasversuch nie davon überzeugen können. Dagegen gibt MESNIL[133]) an, daß unter gewissen Umständen acidophile Leukocyten Bakterien aufnehmen und verdauen können. Auch METSCHNIKOFF zählt diese Zellart zu den Mikrophagen seines Systems.

c) Basophile Leukocyten oder Mastzellen. Der schwach basophile Kern dieser Leukocyten ist ebenfalls am häufigsten zweilappig, hufeisenförmig; er wird gewöhnlich durch die Granulationen des Zellprotoplasmas (γ-Granula nach EHRLICH) verdeckt. Diese Granula sind unregelmäßig geformt und zeigen die Eigenschaft der „Metachromasie“: Sie färben sich mit violetten Farbstoffen, wie Methylenviolett, Dahlia, Thionin, Kresylviolett R-extra (MORGENROTH) leuchtend rot. Die Körnchen sind sehr leicht in Wasser löslich, daher sind bei der Färbung wässerige Lösungen nur mit großer Vorsicht anzuwenden. EHRLICH empfiehlt folgendes:

Technik der Mastzellenfärbung: Hitzefixierung. Färben in schwacher Methylenblaulösung in 33 $^0/_0$igem Alkohol einige Sekunden lang; rasches Abspülen mit Wasser, Trocknen, Kanadabalsam.

Die γ-Granulationen scheinen nicht bei allen Tierarten in morphologischer und tinktorieller Hinsicht übereinzustimmen**). So enthalten z. B. die Mastzellen der Ratte große runde, regelmäßige Granula, die den Kern fast gänzlich verdecken, sodaß er nur als blauer Fleck im Zentrum der Zelle sichtbar ist.

Die Bedeutung der Mastzellen als Phagocyten haben wir in einem früheren Abschnitt bereit kennen gelernt.

Bei einigen Nagetierarten, namentlich beim Meerschweinchen und Kaninchen, zeichnen sich die den Neutrophilen des Menschen entsprechenden polymorphkernigen Leukocyten durch einige Besonderheiten aus. Ihre Granula zeigen Amphophilie (EHRLICH): sie färben sich sowohl mit basischen, wie mit sauren Farbstoffen; man hat sie daher als amphophile resp. pseudo-eosinophile Leukocyten bezeichnet.

*) Siehe auch BIZZOZERO und TORRE[11]) und H. F. MÜLLER[154]).
**) Über Mastzellen siehe LEVADITI[101]).

Streng genommen zeigen auch die Neutrophilen des Menschen- und Affenbluts eine gewisse Amphophilie in dem Sinne, daß sie unter gewissen Umständen sowohl saure, als auch basische Farben annehmen (Dominici, Jolly, Marino). Immerhin ist diese Amphophilie bei weitem weniger ausgesprochen, als bei den polymorphkernigen Leukocyten der Nager und tangiert die spezifische Färbbarkeit in neutralen Farbstofflösungen nicht im mindesten. Deshalb erscheint der Vorschlag von Marino [126]), statt eosinophile Leukocyten — makrogranulierte, statt neutrophile — mikrogranulierte zu sagen, eigentlich überflüssig; umsomehr, da die Spezifizität der α- und ε-Granula nicht nur eine tinktorielle, sondern ebenso eine histochemische und cytogenetische ist. In der Tat kommen Übergänge zwischen den beiden Arten nicht vor und ihr numerisches Verhältnis in der Norm, wie in pathologischen Zuständen ist ein voneinander völlig unabhängiges.

Die quantitativen Schwankungen der weißen Blutelemente: Leukocytose und Leukopenie. Technik der Leukocytenzählung.

Sowohl die absolute Zahl der im Blut kreisenden Leukocyten, als auch das prozentuale Verhalten der einzelnen Sorten sind für den normalen Menschen, ebenso wie für normale gesunde Tiere, konstante Größen. Zwar kommen auch beim ganz Gesunden geringere und größere Schwankungen in der Zahl seiner weißen Blutzellen vor und das unter den verschiedensten, zum großen Teil bekannten Bedingungen, z. B. bei der Verdauung (Verdauungsleukocytose*)). Aber es handelt sich bei diesen sogenannten „physiologischen" Schwankungen immer nur um ganz vorübergehende meist auf Stunden beschränkte Änderungen in der Blutzusammensetzung. Anders liegt die Sache, wenn der Organismus unter dem Einfluß toxischer und infektiöser Noxen steht. Dann geht, Hand in Hand mit der lebhaften Phagocytose in verschiedenen Organen resp. auch an der Infektionspforte, eine quantitative Änderung des Leukocytenbestandes im Gesamtblut. Die Vermehrung der weißen Blutkörperchen führt über eine gewisse Grenze hinaus zur sogenannten Leukocytose, die in dem Sinne spezifisch ist, als es sich dabei entweder um eine besonders starke Vermehrung der Neutrophilen (Neutrophilie), der Eosinophilen (Eosinophilie) oder der Mastzellen (Mastzellenleukocytose) handeln kann. Im Gegensatz zur Leukocytose steht die Leukopenie, die absolute Verminderung der Gesamtzahl weißer Blutkörperchen (z. B. bei Typhus). Diese quantitativen und qualitativen Veränderungen im Leukocytenbestand interessieren uns für die Frage der Phagocytose umsomehr, als verschiedene Autoren auf einen gewissen Parallelismus zwischen jenen und den phagocytären Prozessen aufmerksam gemacht haben. Inwiefern diesem Parallelismus ein innerer Zusammenhang entspricht, wie die Leukocytenschwankungen als Kraftanstrengungen des Organismus im Sinne von Abwehrmaßregeln gedeutet werden können, soll uns jetzt zunächst beschäftigen. Vorher aber müssen wir einen raschen Blick auf die Technik der Leukocytenzählung im Blut resp. in Exsudaten werfen.

---

*) Über Verdauungsleukocytose siehe: Moleschott [153]), Gregor [60]), Halla [61]), Pohl [176]), v. Limbeck [113]), Burian und Schur [22]), Japha [76]).

1. Zählung der weißen Blutkörperchen.

Sie geschieht mit Hilfe der Thoma-Zeissschen Zählkammer (s. Fig. 2), deren Konstruktion und Handhabung als bekannt vorausgesetzt werden können*). Anstatt der einfachen $^1/_3$—$^1/_2$ %igen Essigsäure empfiehlt TÜRK folgende Verdünnungsflüssigkeit.

Acidi acetici glacialis	3,0 ccm
Aq. destillat.	300,0 „
1 %ige wässerige Gentianaviolettlösung	3,0 „

Ihr Vorteil ist, daß das Gentianaviolett**) die Kerne der Leukocyten färbt; man kann auf diese Weise, neben der absoluten Zahl der Leukocyten im Kukikmillimeter gleichzeitig die prozentualen Mengen der einzelnen Arten mitbestimmen.

Fig. 2. THOMA-ZEISSsche Zählkammer.

Von ZOLLIKOFER[237]) ist folgendes Verfahren angegeben worden:

Lösung I.

Eosin pur.	0,1 ccm
Formaldehyd (40 %)	2,0 „
Aq. dest.	200,0 „

Lösung II.

Methylenblau (Grübler)	0,1 ccm
Formaldehyd (40 %)	2,0 „
Aq. dest.	200,0 „

Eine Mischung dieser Lösungen āā gibt eine ausgezeichnete Verdünnungsflüssigkeit, die gleichzeitig die Leukocytengranula entsprechend färbt und eine ganz genaue quantitative Bestimmung der einzelnen Sorte gestattet.

Unter den verschiedenen Arten der Zählung selbst und der nachfolgenden Berechnung verdient folgende wegen ihrer Einfachheit den

*) Über Einzelheiten siehe die Hand- und Lehrbücher der Hämatologie, z. B. TÜRK[207]).

**) Die Essigsäureverdünnung und die Farblösung sind getrennt aufzubewahren; man mengt kleine Mengen davon unmittelbar vor dem Gebrauch.

Vorzug. Bekanntlich besteht der Boden der Thoma-Zeissschen Kammer aus einem Quadrat von 1 mm Seitenlänge, das durch ein Liniennetz in 400 kleine Quadrate geteilt ist. Diese sind durch Verdoppelungen der Grenzlinien in 16 größere Quadrate à 25 kleine zusammengefaßt. Man verfährt so, daß man diese 16 großen Quadrate nacheinander durchzählt und die erhaltenen Zahlen notiert. Man muß sich dabei nur hüten, die halbierten Quadratreihen zweimal zu zählen, was indes bei einiger Aufmerksamkeit ganz leicht ist.

Fig. 3. Leukocytenzählkammer nach Türk. A—B = 1 mm; 1—2 = $^1/_{20}$ mm; 4—5 = $^1/_{40}$ mm.

Angenommen, die Summe der in den 16 großen Quadraten gezählten Zellen sei X. Da die Höhe der Kammer 0,1 mm beträgt und die Summe aller Quadrate den Flächenwert von 1 qmm hat, so ist der Raum der Kammer, den wir gezählt haben = **0,1 cmm.** Ist die Zahl der darin gezählten Leukocyten x, so beträgt sie demnach in 1 cmm der untersuchten Flüssigkeit das 10fache, also 10x und da die Verdünnung in der Mischpipette (gewöhnlich) 1 : 10 ist, so enthält 1 cmm des unverdünnten Blutes 100x. Man hat also die Gesamtzahl der Leukocyten in sämtlichen Quadraten nur mit 100 zu multiplizieren und hat sofort die gesuchte Zahl im Kubikmillimeter Blut. War die Verdünnung 1 : 20, dann muß natürlich mit 200 multipliziert werden usw.

Diese Methode hat auch den theoretischen Vorzug, daß eine so große Anzahl Zellen gezählt und in die Rechnung gesetzt wird, als die Kammer technisch zuläßt. Es ist aber ohne weiteres klar, daß die Bestimmung um so genauer wird, je mehr wir zählen und je weniger wir also multiplizieren. TÜRK [208]) hat von dieser Überlegung aus durch Zeiss eine Zählkammer in den Handel gebracht deren Bodenfläche 9 qmm beträgt. (Fig. 3.)

Wesentlich einfacher, aber weniger exakt ist die von KURLOFF [91])*) beschriebene Methode der Leukocytenzählung. Sie geschieht an möglichst gleichmäßig dicken mit Triacid oder sonst gefärbten Ausstrichpräparaten mit Hilfe einer beweglichen Zählplatte. Auch auf diese Weise lassen sich annähernd richtige Werte gewinnen, freilich unter der Voraussetzung, daß die Präparate tadellos gleichmäßig sind.

Das prozentuale Verhalten der diversen Leuko- resp. Lymphocytenarten läßt sich in folgender einfacher Weise feststellen: man durchmustert möglichst gleichmäßig angestrichene GIEMSA- oder Triacidpräparate von dem betreffenden Blut mit mittlerer Vergrößerung so, daß nach Möglichkeit das ganze Präparat durchgesehen wird, wobei vermieden werden muß, schon durchgezählte Gesichtsfelder ganz oder teilweise nochmals zu benutzen. In jedem Gesichtsfeld werden alle darin sichtbaren Leukocyten nach ihrer Spezies bestimmt und jedesmal in die gehörige Rubrik (α, ε, γ, kl. Lymphocyten usw.) eingetragen. Ist das Präparat auf diese Weise gut durchuntersucht, so berechnet sich der Prozentgehalt für jede Sorte in verständlicher Weise mit Hilfe der Formel:

$$x = \frac{n \times 100}{N},$$

wo x die gesuchte Prozentzahl (z. B. der eosinophilen Zellen), n die gezählte Zahl dieser Zellen, N die Gesammtsumme aller gezählten Leukocyten ist.

Das numerische Verhalten der weißen Blutzellen unter normalen und pathologischen Zuständen.

Die normale Anzahl weißer Blutzellen beim gesunden erwachsenen Menschen beträgt 7000—8000 im ccm.

Die Prozentwerte ergeben sich aus nachstehenden Tabellen, die den Arbeiten von EHRLICH-LAZARUS [136]) und von JOLLY [79]) entlehnt sind.

Nach JOLLY.

Spezies	Neugeborene	Greise	Erwachsene
Lymphocyten, große Mononukleare . .	53,9 %	25,7 %	35,2 %
Übergangsformen	2,8 %	2,0 %	2,2 %
Neutrophile	40,7 %	70,5 %	61,7 %
Eosinophile	2,3 %	1,6 %	0,9 %

*) Siehe auch EHRLICH und LAZARUS [136]).

Nach Ehrlich und Lazarus.

Spezies	Bei Erwachsenen
Lymphocyten	22—25 %
Große Mononukleare u. Übergangsform	2— 4 %
Neutrophile	70—72 %
Eosinophile	2— 4 %
Mastzellen	0,5 %

Aus der ersten Tabelle erhellen die Verschiedenheiten in der Zusammensetzung der farblosen Blutelemente auf den verschiedenen Altersstufen. Das kindliche Blut enthält auffallend viel Lymphocyten (Hock und Schlesinger[71]), Japha[77]) und eosinophile Zellen, während das Greisenblut durch das Vorwiegen neutrophiler Elemente ausgezeichnet ist (Jolly, Dobrovici[41]).

Im Verlauf der verschiedenen Infektionskrankheiten bei Menschen und Tieren erleidet die Zusammensetzung des Blutes eine durchgreifende Änderung insofern, als die Zahl der Leukocyten entweder die Norm erheblich übersteigt (Leukocytose) oder unter sie sinkt (Leukopenie). Näher auf diese Frage einzugehen ist hier nicht der Ort. Nur soviel sei bemerkt, daß diese Änderungen im Leukocytenzustand sehr weitgehend spezifisch sind: das gegenseitige Mengenverhältnis der einzelnen Sorten variiert bei verschiedenen Krankheiten und läßt nicht nur prognostische, sondern mitunter sogar diagnostische Schlüsse zu.

So ist eine starke, vorwiegende Vermehrung der Neutrophilen charakteristisch für alle mit Eiterung einhergehenden Infektionen. Die Kurve der Neutrophilen ist hierbei durchaus regelmäßig, wenn die Krankheit selbst nach einem bestimmten Schema verläuft (Pneumonie*), Rückfallfieber). In bestimmten Fällen weist eine starke Vermehrung der Neutrophilen im allgemeinen auf einen günstigen Verlauf der Krankheit hin.

Eosinophilie wird beobachtet bei gewissen tierparasitären Erkrankungen, besonders bei Wurmkrankheiten (Trichinosis, Schleip[189]), Stäubli[200]), Anchylostomiasis, Müller und Rieder[155]), Zappert[234]), Lieremberger[112]), Leichtenstern[98]) u. a., Bilharziosis, Balfour[5])); ferner bei einigen Hautkrankheiten: Pemphigus (E. Neusser), Dühringscher Krankheit, Lepra u. a. m.

Mastzellenleukocytose kennt man bis jetzt nur bei Tieren als Effekt gewisser chemischer oder bakterieller Gifte (Schmauch[190]), Levaditi[101]), Pröscher[170])).

Die bisher aufgedeckten und sichergestellten Befunde gestatten jedoch nicht etwa für jede der uns bekannten Infektionskrankheiten nun ein besonderes „Leukocytenbild" aufzustellen. Mit Ausnahme der Pocken (Weil[225]), Courmont und Montagnard[32])), wo man im Blute granulierte Myelocyten und gewisse einkernige Formen, die für diese Krankheit typisch sind, findet und des Typhus**) mit der hinlänglich bekannten auffallenden Leukopenie, handelt es sich eben um eine im speziellen uncharakteristische Neutrophilie.

*) Über Leukocytose bei Pneumonie siehe Rieder[178]), Bieganski[13]), Loeper[115]), Türk[209]); Leukocytose bei Erysipel, Chantemesse und Rey[28]).

**) Rieder, Türk, Courmont und Barbaroux[33]), Chetagurow[30]), Stiénon[201]).

Dies ist auch ohne weiteres verständlich, wenn man bedenkt — worauf schon im Anfang des Abschnitts hingewiesen worden ist —, daß die Hyperleukocytose bei Infektionskrankheiten eine Abwehrbewegung des Organismus darstellt. Da nun die Neutrophilen Phagocyten par excellence sind, so ist die Bedingung für das vermehrte Auftreten gerade dieser Zellen jedesmal dann gegeben, wenn es sich um Invasion von Mikroorganismen (namentlich Bakterien und ihrer Produkte) handelt*).

Ob nun die „Polynukleose" (richtiger „Multinukleose") auf einer vermehrten Produktion von neutrophilen Leukocyten in den hämatopoetischen Organen oder lediglich auf veränderter Verteilung der weißen Blutkörperchen in den verschiedenen Körpergebieten beruht — immer ist ihr Effekt der, daß eine große Menge von Phagocyten an eine bedrohte oder schon betroffene Stelle zu dringen vermag**).

Die Bedeutung der Phagocytose für die natürliche (angeborene) Immunität.

Für die Erklärung und Deutung jener in ihrem Wesen ungemein komplizierten, in ihren Äußerungen so geheimnisvollen und fesselnden biologischen Tatsachenreihen, deren Gesamtheit uns unter dem Namen „Immunität" bekannt und geläufig ist, sind mehrere Hypothesen resp. Theorien***) aufgestellt worden, von denen die „Erschöpfungstheorie" (Pasteur), die Retentionstheorie (Chauveau), diejenige der bakteriziden und antitoxischen Wirksamkeit der Körpersäfte (Buchner, Pfiffer, Behring) und die Ehrlichsche „Seitenkettentheorie" die bekanntesten sind. Jedoch beziehen sie sich alle vorzüglich auf das Problem der **erworbenen Immunität**. Für die natürliche, angeborene Widerstandskraft normaler Organismen gegen die Wirkungen pathogener Bakterien mit deren Sekretionsprodukte liefert die Phagocytentheorie von Metschnikoff zurzeit noch immer die plausibelste Erklärung. Wir beginnen deshalb unsere Darstellung der mannigfachen Beziehungen zwischen Phagocytose und Immunität mit Befunden, die sich auf die natürliche Immunität beziehen.

Von den niederen Tieren bieten die Daphnien (Wasserflöhe) ein schönes Beispiel für die Mitwirkung charakteristischer Freßzellen im Kampfe eines Organismus gegen bakterielle Infektion. Metschnikoff[144] hat beobachtet, daß diese kleinen Crustaceen häufig der Infektion mit einem besonderen Sporenpilz erliegen (Monospora bicuspidata), dessen Sporen bei der Nahrungsaufnahme der Tierchen in den Darmtraktus eindringen, von hier aus in die Leibeshöhle sich verbreiten, auskeimen und durch rasche Vermehrung die erkrankte Daphnie schließlich zum Absterben bringen. Dennoch entgeht ein gewisser Prozentsatz von jenen

*) Siehe Besredka[9]) „Leukocytose bei Diphterie".

**) Zusammenfassende Arbeiten über Leukocytose: Jolly[80]), Josué[81]), Levaditi[108]).

***) Eine eingehende Darstellung und kritische Würdigung aller dieser Theorien siehe bei Metschnikoff[137]).

Sporen schon befallener Individuen dem Tode und wird resp. bleibt gesund, namentlich, wenn man solche Tierchen vor einer zweiten Infektion schützt.

Beim näheren Studium dieses Falles von natürlicher Immunität fand Metschnikoff, daß mit dem Moment des Eindringens der pathogenen Sporen in die freie Leibeshöhle ein Kampf zwischen diesen Sporen und den farblosen Wanderzellen der Daphnie entbrennt, indem die Zellen die Tendenz zeigen, die Sporen aufzunehmen und innerhalb ihres Protoplasmas zu verdauen. Gelingt so eine völlige Vernichtung sämtlicher eingedrungener Sporen, dann gesundet der Organismus; bleiben hingegen auch nur ganz wenige unbeschädigt, dann keimen sie rasch aus; die Phagocytose ist jetzt nicht mehr genügend wirksam, denn der reife Pilz sezerniert eine giftige Substanz, welche die Wanderzellen der Daphnie tötet und auflöst*).

Es handelt sich demnach bei der natürlichen Immunität der Daphnien um eine rein phagocytäre Immunität. Interessant ist besonders, daß die tödliche Infektion nur zustande kommt, wenn der erwähnte Giftstoff Gelegenheit hat, seine schädigende Wirkung auf die Phagocyten auszuüben. Es ist dies das erste bekannte Beispiel eines bakteriellen Leukocytengiftes; wir werden in einem besonderen Kapitel ein zweites in Gestalt des Leukocidins, eines spezifisch die Leukocyten schädigenden, von van de Velde[217]) entdeckten Sekretionsproduktes von Staphylococcus aureus kennen lernen.

Von Amphibien**) ist der Frosch das am meisten auf natürliche Immunität hin untersuchte Tier. Als bakterielles Virus hat man von jeher mit Vorliebe Milzbrand verwendet. Wir werden uns deshalb vorwiegend mit dieser Infektion zu befassen haben, obschon die Versuche mit anderem Bakterienmaterial [Bac. ranicid., Ernst[49]), Bazillus der Mäusesepsis, Lubarsch[119]), Mesnil[133]), Vibr. cholerae usw.] ebenfalls sehr interessantes Material gefördert haben.

Koch[84]) hat zuerst auf die natürliche Resistenz des Frosches gegen Milzbrandinfektion unter normalen äußeren Lebensbedingungen hingewiesen. Er sah, daß die eingebrachten Bakterien sehr rasch in gewisse Rundzellen „eindringen“, die nach Ansicht Kochs einen vorzüglichen Nährboden für jene darstellen. Metschnikoff[140]) zeigte aber bald darauf (im Jahre 1884), daß diese Deutung nicht richtig ist. In der Tat sind die von Koch erwähnten Rundzellen Leukocyten, welche die z. B. in den Lymphsack des Frosches eingebrachten Milzbrandstäbchen mit ihren Protoplasmafortsätzen umhüllen und schließlich ganz in ihr Inneres hineinziehen, wo die Bakterien eine Reihe destruktiver Veränderungen erleiden, die sich durch Änderungen der äußeren Form und der Färbbarkeit (Eosinophilie des intracellulären Stückes eines unvollkommen phagocytierten Stäbchens) dokumentieren. Als Gegenprobe gilt für Metschnikoff der Umstand, daß geschädigte Froschleukocyten (wenn man etwa die Versuchstiere auf 38° erwärmte) diese phagocytäre Tätigkeit nicht oder nur in bescheidenstem Umfange ausüben, so daß wenig intracellulär gelagerte Stäbchen vorhanden sind, während nach Kochs Auffassung das Gegenteil der Fall sein müßte.

---

*) Siehe Kapitel: Leukocidin, I. Bd., s. 221.

**) Über natürliche Immunität bei Fischen siehe Mesnil[133]).

Die Phagocytierung der Milzbrandbazillen durch Froschleukocyten läßt sich mit folgender Methode leicht demonstrieren:

Methode. a) Mit einer sterilisierten Pravazspritze entnimmt man einer 24stündigen Bouillonkultur von Bac. anthracis das Impfmaterial, sticht seitlich von der Wirbelsäule in dorsoventraler Richtung mit der Nadel in den Lymphsack ein und injiziert nicht zu reichliche, im übrigen aber variable Mengen der Kultur. In regelmäßigen Zeitabständen, etwa von Stunde zu Stunde, wird mittels einer kleinen Glaskapillare durch Einstich etwas Lymphflüssigkeit entnommen und mikroskopiert. Die Kapillarpipetten stellt man sich folgendermaßen her: ein Glasrohr von etwa 0,6 cm Kaliber wird in Stücke von ca. 30 cm Länge zerschnitten, beide Enden jedes Stückes mit Watte lose verschlossen, wobei die Watte keinesfalls über die Mündung hervorragen darf, und im Trockenofen (PASTEURschen Ofen) bei 170° sterilisiert. Im Bedarfsfalle wird das so vorbereitete Röhrchen mit beiden Händen festgehalten, sein mittlerer Abschnitt im Gebläse bis zur Rotglut erhitzt und nun außerhalb der Flamme ziemlich rasch und möglichst in der Achse ausgezogen. Nach Durchschmelzen in der Mitte hat man zwei gleich große, an den Enden kapilläre, sterilisierte und gebrauchsfertige Pipetten zur Verfügung, deren Herstellungskosten überdies so gering sind, daß man sich die Mühe des Reinigens, ohne Verschwendung zu treiben, sparen und jedesmal frische Röhrchen benutzen kann.

Die Untersuchung der entnommenen Lymphe geschieht entweder im hängenden Tropfen (siehe Abschn. I), frisch oder mit vitaler Neutralrot- resp. Brillantkresylblaufärbung; es empfiehlt sich, die so gewonnenen Übersichtsresultate an Objektträgeranstrichen zu kontrollieren, die man in Alkohol fixiert und mit BORELLschem Karbolthionin*) oder nach GIEMSA färbt. Organstückchen werden in Paraffin eingebettet und nach GRAM mit Fuchsingegenfärbung (verdünntes Fuchsin) behandelt.

b) Phagocytose in vitro. Man aspiriert mit einer Kapillarpipette etwas Flüssigkeit aus dem Lymphsack eines Frosches und läßt sie in ein Reagenzgläschen einlaufen, in das man gleichzeitig einen Tropfen einer Bouillonkultur resp. einer Aufschwemmung von Bac. anthracis bringt. Die Mischung bleibt, mit einem Wattepfropfen leicht verschlossen, bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen; von Zeit zu Zeit untersucht man Pröbchen davon in der unter a beschriebenen Weise. Da die gewöhnliche Froschlymphe relativ arm an weißen Blutkörperchen ist, so empfiehlt es sich, statt dessen in das Peritoneum eines Frosches 1—2 ccm eine Mischung von Bouillon und steriler 0,8 %iger Kochsalzlösung zu injizieren und nach einigen Stunden das entstandene Exsudat zu aspirieren. Da es ziemlich dick ist und leicht gerinnt, muß es mit etwas physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden.**)

Bei günstigen Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnissen lassen sich auf diese Weise die im Verlauf des phagocytären Prozesses an den

*) Die Herstellung dieses Färbemittels geschieht folgendermaßen: Eine gesättigte Lösung von Thionin in destilliertem Wasser wird mit 10 %iger Sodalösung ausgefällt, der Niederschlag auf dem Filter gesammelt, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und im Verhältnis von 1 g des trockenen Pulvers auf 100 ccm 5 %iger Phenollösung wieder gelöst. Vor dem Gebrauch stets zu filtrieren.

**) Dieses Verfahren ist von SCHLESWICK angegeben worden; siehe Kapitel „Opsonine“.

Bakterien entstehenden Veränderungen stufenweise verfolgen und beobachten.

Im Gegensatz zu diesen höchst demonstrativen Versuchen ist von mehreren Seiten, u. a. von Baumgarten [6]), Petruschky [171]) und Nuttal [162]), die Ansicht ausgesprochen, daß die natürliche Resistenz des Frosches gegen Anthrax nicht auf einem phagocytären Vorgang, sondern auf dem Unvermögen der Milzbrandbazillen beruhe, in der Körperflüssigkeit des Frosches zu wachsen, resp. sich zu vermehren. Metschnikoff und einer seiner Schüler, Trapeznikow [205]), haben diese Auffassung widerlegt: in kleine Säckchen aus Fließpapier wurden Milzbrandsporen eingebracht und so unter die Haut von Fröschen geschoben. Es zeigte sich nun, daß in diesen Säckchen, die zwar Gewebsflüssigkeit, nicht aber Leukocyten durchließen, die Sporen ganz vortrefflich auskeimten. Umgekehrt tun sie dies nicht, wenn sie der phagocytären Arbeit von Leukocyten ausgesetzt sind. Nur erhalten sie sich im Innern derselben längere Zeit in keimfähigem, virulentem Zustande.

Diese Befunde der Metschnikoffschen Schule sind von Lubarsch [121]) bestätigt worden. Lubarsch fand, daß bereits $^3/_4$ Stunde (nicht erst nach 6 Stunden, wie Nuttal angibt) nach der Impfung Phagocytose zu sehen ist. Die eingeschlossenen Bakterien behielten ihre Lebensfähigkeit im Inneru des Froschorganismus recht lange (durchschnittlich 10—12, einmal sogar 27 Tage).

Die Milzbrandimpfungen am Frosch haben ferner über die Vitalität und die Virulenz phagocytierter Bakterien wertvollen Aufschluß gegeben. Es zeigte sich, daß letzere im lebenden Zustande von den Leukocyten aufgenommmen werden und im Innern derselben längere Zeit ihre Virulenz aufrecht erhalten können.

Technik. Man entnimmt dem Lymphsack eines mit Bac. anthracis infizierten Frosches auf der Höhe der Phagocytose einen kleinen Tropfen, bringt ihn auf ein Deckglas, legt dieses mit dem Tropfen nach unten auf die Höhlung eines hohlgeschliffenen Objektträgers und dichtet den Rand sorgfältig ab. In dieser kleinen, feuchten Kammer kann man bei geeigneter Temperatur (30°) beobachten, wie nach dem Absterben der weißen Blutkörperchen, das sich durch reichlichste Vakuolenbildung im Protoplasma ankündigt, die phagocytierten Bazillen lange fadenförmige Ausläufer entsenden, rapide wachsen und schließlich das ganze Präparat überwuchern. Dies beweist, daß sie während und auch einige Zeit nach der Einschließung durch den Leukocyten lebensfähig sind bzw. entwicklungsfähig bleiben, ehe sie der intraprotoplasmatischen Verdauung anheimfallen.*)

Wie verhält sich die Virulenz der Milzbrandbazillen während ihres Verbleibens im Kaltblüterorganismus? Metschnikoff und Nuttal sind der Ansicht, daß die Virulenz unter diesen Bedingungen sich nicht verändert, solange die Bakterien überhaupt noch lebensfähig sind, also erst mit dem Absterben rasch abnimmt. Dagegen nehmen Petruschky [172]) und Voswinkel [218]) an, daß die phagocytierten Stäbchen sehr bald avirulent werden. Uns scheinen hier die einwandfreien Versuche von Lubarsch [118]) entscheidend zu sein. Danach ist eine leichte Herab-

---

*) Bei Versuchen mit beweglichen Bakterien, z. B. Bac. pyocyaneus, konnte Metschnikoff beobachten, daß diese Bakterien ihre Bewegungen im Inneren des Zellprotoplasmas fortsetzen.

setzung des Virulenzgrades oft vorhanden, „durchaus aber nicht in der Regel". Zusammenfassend läßt sich also sagen: Milzbrandbazillen werden von Froschleukocyten im lebenden Zustande eingeschlossen; ihre Virulenz erleidet während der zu ihrer intracellulären Verdauung notwendigen Zeit nur geringe Einbuße.

Als Beispiel für natürliche Immunität bei den Vögeln führen wir die Resistenz des Huhnes gegen Milzbrand und die der Taube gegen menschliche Tuberkulose an.

Das Huhn zeigt, wie übrigens die Vögel im allgemeinen, gegen Infektion mit Milzbrandbazillen eine ausgesprochene, natürliche Widerstandsfähigkeit, die sich jedoch experimentell sehr herabsetzen, ja gänzlich brechen läßt. Pasteur und Joubert[165]) haben in der Jugendzeit der Mikrobiologie durch ihren berühmten Versuch gezeigt, daß man das Huhn empfänglich für die Milzbrandinfektion machen kann, wenn die hohe Eigentemperatur des Tieres (41°) durch längeres Eintauchen der Füße in kaltes Wasser künstlich herabgesetzt wird. Pasteur und Joubert nahmen an, daß die einverleibten Bazillen bei der normalen Temperatur des Huhnes nicht gedeihen, da sie beträchtlich über dem Kulturoptimum für Anthrax liegt, erst die künstliche Abkühlung ermögliche es den Spaltpilzen, zu wuchern. Spätere Arbeiten von Wagner[219]) haben jedoch gezeigt, daß diese Erklärung unzutreffend und die Herabminderung der beregten Resistenz auf eine Abschwächung des Phagocytierungsvermögens der Hühnerleukocyten bei abnorm niedriger Blutwärme zurückzuführen ist. Unter normalen äußeren Umständen werden beim Huhn subkutan injizierte Milzbrandbazillen (Hess[66])) resp. deren Sporen (Trapeznikow[205])) oder den polynuklearen Leukocyten in sehr energischer Weise phagocytiert; die Sporenformen persistieren im Phagocytenprotoplasma etwas länger als die vegetativen, welche sehr rasch der Zerstörung anheimfallen. Wagner hat nun beobachtet, daß bei den künstlich abgekühlten Tieren die Phagocytose minimal resp. gleich Null ist. Dasselbe gilt von Tieren, deren Blutwärme durch Chloral oder Antipyrin herabgesetzt ist.

Die Immunität der Taube gegen den Bazillus der menschlichen Tuberkulose ist nach Metschnikoff und dessen Schüler Dembinski[34]) gleichfalls der Effekt von phagocytären Leistungen gewisser Körperzellen der Taube; nur sind es in diesem Fall bemerkenswerter Weise, nicht wie sonst bei bakteriellen Infektionen, die Mikrophagen (polynuklearen Leukocyten), sondern die großen einkernigen Makrophagen, die sich um die injizierten Bazillenhäufchen gruppieren, sie nach und nach einschließen und so am Weiterkeimen verhindern.

Besonders zahlreiche Beispiele für die Rolle der Phagocytose liefern die Fälle angeborener Immunität bei den Säugern.

In erster Linie sei hier die Immunität der weißen Ratte gegen Anthrax genannt. Sie bildet eine von Anhängern und Gegnern der Phagocytentheorie heiß umstrittene Frage.

Löffler[116]) hat gezeigt, daß die genannten Tiere gegen Milzbrand nur relativ immun sind und zwar in dem Sinne, daß ein gewisser Prozentsatz von Versuchstieren eine, selbst zwei Impfungen mit Milzbrand übersteht, eventuellen weiteren Infektionen aber erliegt. Dagegen soll nach v. Behring[14]) und Franck die Immunität der weißen Ratte gegen Anthrax fast absolut sein.

Die große Anzahl übereinstimmender Angaben in der Versuchsliteratur (Charrin und Roger[27])*), Metschnikoff[145]), Lubarsch[119]) usw.) spricht indessen für die Richtigkeit der Löfflerschen Ansicht.

Wie ist nun der Mechanismus dieser zwar nicht absoluten, jedoch unzweifelhaft vorhandenen Immunität zu deuten?

Schon in seinen ältesten Veröffentlichungen über die Phagocytose bei Infektionskrankheiten hatte Metschnikoff[140]) die Ansicht vertreten, daß die Resistenz der Ratte gegen Milzbrand auf Rechnung eines phagocytären Vorgangs zu setzen sei. Metschnikoffs Beobachtung hat durch Hess[66]) ihre Bestätigung gefunden, ist jedoch später von Franck[51]) und besonders durch Christmas[29]) angezweifelt worden, die beide sich von einer Aufnahme von Milzbrandstäbchen durch Rattenleukocyten nicht überzeugen konnten.

Andererseits hat v. Behring[14]) den entwicklungshemmenden Einfluß von Rattenserum auf Milzbrand in vitro festgestellt und daraus auf die ursächliche Bedeutung dieser Bakterizidie für die Immunität bei der weißen Ratte geschlossen; wobei zu bemerken ist, daß nach Sawtchenko[194]) Rattenserum seiner bakteriziden Eigenschaften, die v. Behring auf hohe Alkaleszenz zurückführt, auch nach Erwärmung auf 61° nicht verlustig geht.

Technik: Man entblutet eine weiße Ratte aus der Karotis, verteilt das gewonnene Serum in eine Anzahl kleiner Reagenzgläschen (etwa 1 ccm in jedes), impft mit je einem Tropfen einer stark verdünnten Bouillonkultur von Milzbrand und bringt diese Kulturen im Brutschrank auf 38°. In regelmäßigen Zeitabschnitten werden nun aus dem ganzen Inhalt jedes Röhrchens Agarplatten angelegt und die angehenden Kolonien gezählt. Einen Teil des Serums kann man in kleinen Röhrchen einschmelzen und im Wasserbad auf 60° bringen. Sie werden nach völliger Abkühlung geimpft und dann wie oben weiterbehandelt.

Metschnikoff und seine Schüler haben gegenüber diesen Einwänden wiederholt nachgewiesen, daß erstens Phagocytose bei der mit Milzbrand infizierten Ratte unzweifelhaft auftritt, zweitens die Bakterizidie des Serums die Erscheinungen der natürlichen Immunität dieser Tiere zu erklären nicht imstande ist. Es läßt sich in der Tat ohne Schwierigkeit zeigen, daß sich Milzbrandbazillen, ungeachtet dieser bakteriziden Eigenschaft des Serums im Rattenorganismus, sehr wohl entwickeln können. So erliegen unter Umständen der Infektion Tiere, deren Serum in vitro sehr stark entwicklungshemmend wirkt, und die Einzelheiten dieser Entwicklung lassen sich dabei ganz unmittelbar verfolgen.

Technik: a) Impfung in die vordere Kammer. Man sticht mit der Nadel einer Pravazschen Spritze seitlich in die vordere Kammer einer weißen Ratte, läßt das Kammerwasser abtropfen, setzt, während die Nadel liegen bleibt, die mit verdünnter Bouillonkultur von Bac. anthracis gefüllte Spritze an und injiziert langsam ungefähr so viel davon, daß die vordere Kammer wieder hergestellt ist. Durch kleine Einstiche mit einer ganz fein ausgezogenen Glaskapillare werden dann Stichproben wieder entnommen und untersucht.

b) Die von Metschnikoff angegebene Seidenfadenmethode gestattet die Entwicklung von subkutan eingebrachten Virus bequem zu

---

*) Diese Autoren haben nachgewiesen, daß starke Ermüdung (durch ununterbrochenes Herumlaufen in einer Art Tretrad) die Infektion mit Milzbrand begünstigt.

verfolgen. Sterilisierte nicht zu dünne Seidenfäden von entsprechender Länge werden mit sporenhaltiger Milzbrandbouillon gut durchtränkt und mit einer Nadel, so unter die Rückenhaut einer Ratte gefädelt, daß eines oder beide Enden ein Stück herausragen. Von Zeit zu Zeit wird ein solcher Faden herausgezogen und die ihn durchtränkende Flüssigkeit mikroskopiert. Man sieht dann, daß die Sporen zu vegetativen Formen auskeimen und diese selbst mehr oder weniger aktiv sich vermehren.

Weiterhin ist bemerkenswert, daß das Serum einer an Milzbrand eingegangenen Ratte, andere normale Ratten, ebenso wie Mäuse, vor der Infektion mit diesem Virus zu schützen vermag, welcher Umstand deutlich beweist, daß Resistenz und antiseptische Eigenschaften des Blutserums — wenigstens in diesem Fall — zwei verschiedene Dinge sind (Metschnikoff und Roux). Die Körpersäfte können sich also — dies geht aus dem eben Gesagten hervor — im Reagenzglase gänzlich anders verhalten, als im lebenden Organismus selbst, eine Auffassung, die durch Metschnikoff und seine Schule von jeher lebhaft verteidigt worden ist.

Die Phagocytierung von Milzbrandbakterien durch die Leukocyten der Ratte kann auf zweierlei Art sichtbar gemacht werden: erstens durch Untersuchung des lokalen Ödems an der Infektionspforte in der Haut respektive den serösen Häuten, oder im Humor aquaeus bei Impfungen in die vordere Kammer; zweitens in den Geweben und Organen von an Milzbrand gefallenen Ratten (Hess). Die erstere Untersuchungsart ist schon besprochen worden; für die zweite empfiehlt sich folgende

Technik: Fixieren der Organstückchen in 4 %igem Formol oder gesättigter Eisessig-Sublimatlösung; Einbetten in Paraffin. Die nicht zu dünnen Schnitte (5—10 μ) werden mit Pikrokarmin vor- und dann nach Gram durchgefärbt und in der üblichen Weise in Balsam eingeschlossen.

Man sieht bei diesem Verfahren in den Kupfferschen Sternzellen der Leber (Makrophagen Metschnikoffs) prachtvolle phagocytäre Einschlüsse von Milzbrandbazillen in allen Stadien der endoprotoplasmatischen Verdauung.

Konserviert man frische von milzbrandsüchtigen Tieren herrührende Leukocytenexsudate mit reichlichen Bakterieneinschlüsse einige Zeit bei 38° und beobachtet im hängenden Tropfen, so sieht man, daß die Leukocyten nach und nach absterben, sich auflösen, die Milzbrandstäbchen dadurch wieder frei werden und sich rapide zu vermehren beginnen — ein Beweis dafür, daß sie auch im lebenden Zustande von den weißen Blutkörperchen aufgenommen werden können.

Das Schicksal von Bazillen der menschlichen Tuberkulose im Organismus der Maus ist von Kisskalt [82]) näher untersucht worden; er bediente sich dabei folgender Versuchsanordnung:

Technik: Die Rückenhaut einer Maus wird möglichst glatt geschoren bzw. vorsichtig rasiert. Mit einem in eine Tuberkelbazillenkultur auf Blutserum eingetauchten Skalpell macht man längs der Wirbelsäule des Tieres, nach dem kaudalen Ende hin und zwar auf beiden Seiten, mehrere parallel laufende und mehr oder minder tiefe Einschnitte in die Haut. Nach Ablauf einer gewissen Zeit, die zwischen einigen Stunden und mehreren Tagen variiert, wird das Tier getötet, die skarifizierte Haut in Formol fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten (15 μ) und die Präparate mit Karbolfuchsin-Hämatoxylin, Anilinwasser-Gentianaviolett-Hämatoxylin oder Karbolfuchsin-Bismarckbraun gefärbt.

Mit dieser Methode hat Kisskalt nachgewiesen, daß schon vier Stunden nach der Impfung, die Tuberkelbazillen im Inneren der Gewebe liegen und von Häufchen polynuklearer Leukocyten umgeben sind; die Mehrzahl der Bazillen liegt intracellulär, wobei ein Mikrophage gleichzeitig mehrere Bazillenindividuen beherbergen kann. Bei relativ langer Versuchsdauer (14 Tage) wird das Gewebe von großkernigen Makrophagen infiltriert, die ihrerseits massenhaft Tuberkelbazilleneinschlüsse aufweisen. Hieraus erhellt, daß die Vernichtung von Tuberkelbazillen bei der Maus durch Phagocytose erfolgt; daß also zwischen der natürlichen Resistenz dieser Tierart gegen den Bazillus der Menschentuberkulose und die Fähigkeit der Mäuseleukocyten zu phagocytieren ein intimer Zusammenhang besteht. Kisskalt hat analoge Beobachtungen an Mäusen auch mit anderen Infektionserregern gemacht, u. a. mit Milzbrand, Pneumokokken, Schweinerotlauf, Heubazillen usw. usw.

Am fruchtbarsten und überzeugendsten haben sich aber für die hier erörterte Frage die Untersuchungen über den Mechanismus der Streptokokkenimmunität bei normalerweise resistenten Tieren erwiesen.

Zu den letzteren zählt von den gebräuchlichen Laboratoriumstieren in erster Linie das Meerschweinchen, das nur unverhältnißmäßig hohen Virusdosen (intraperitoneal) erliegt. Bordet[16—17]) hat diese relarelative Immunität des Meerschweinchens gegen Streptococcus pyogenes eingehend untersucht und gefunden, daß unmittelbar nach der Injektion einer Kulturemulsion in die Peritonealhöhle ein lebhafter Zustrom von polymorphkernigen Leukocyten (Mikrophagen) dorthin stattfindet, die sich der Kokken bemächtigen, sie einschließen und so vernichten. Bei genügender Virulenz der Kultur, oder bei Injektion großer Mengen gelingt ihnen dies nicht vollständig; ein gewisser Prozentsatz der Streptokokken bleibt extracellulär, und nach kurzer Zeit beginnen diese nicht phagocytierten Kokken sich lebhaft zu vermehren. Zwar ruft dies einen erneuten Zustrom von Leukocyten hervor, aber die zweite Kokkengeneration wird nicht mehr phagocytiert; die einzelnen Individuen bilden Kapseln unter deren Schutze sie ohne Rücksicht auf die kreisenden Leukocyten sich rasch im Körper verbreiten und den Tod des Tieres herbeiführen.

In etwas abweichender Weise hat Marchand[122]) die vorliegenden Fragen erörtert. Er ging von einem Streptokokkenstamm von mittlerer Virulenz aus (D. L. = 0,5 ccm. Bouillonkultur). Durch wiederholte Kaninchenpassagen gelangte er schließlich zu einer höchstvirulenten Kultur desselben Stammes (D. L. = 0,000002 ccm) und versuchte nun die Ursachen dieses enormen Virulenzunterschiedes klarzulegen. Bakterizide Stoffe des Serums schieden als maßgebende Faktoren hierfür aus, denn es zeigte sich, daß beide Varietäten auf Kaninchenserum gleich gut fortkamen.

Marchand untersuchte nun in systematischer Weise sowohl in vitro wie im Tierversuch das Verhalten seiner beiden Stämme gegenüber Kaninchen-, Meerschweinchen- und Hundeleukocyten und fand, daß während die Streptokokken des abgeschwächten Stammes jedesmal in lebhaftester Weise phagocytiert wurden und charakteristische Veränderungen im Sinne einer Zerstörung (tinktorielle Merkmale, Eosinophilie [Bordet]),

erlitten, die hochvirulenten Streptokokken überhaupt nicht phagocytiert wurden. Ja, aus einem Gemisch beider Varietäten phagocytierten hinzugesetzte Meerschweinchen- und Kaninchenleukocyten in elektiver Weise immer nur die avirulenten Kokken.

Technik: Phagocytose in vitro. Man erzeugt bei einem Meerschweinchen durch intraperitoneale Injektion von 10 ccm Bouillon (oder Bouillon—0,8 %ige Kochsalzlösung āā) ein Exsudat*), das 6—10 Stunden durch Punktion mit einer fein ausgezogenen Kugelpipette entleert wird, ohne daß man das Tier zu opfern braucht. Die reichlichsten Exsudatmengen findet man in abhängigen Partien der fossae iliacae.

Will man mit Kaninchenleukocyten arbeiten, so empfiehlt es sich die Injektion (5 ccm) in die Pleura zu machen. Die hierzu benutzte Kanüle darf nicht ganz scharf sein, da man sonst leicht die Lunge verletzt. Man sticht am besten an der seitlichen Thoraxwand in mittlerer Höhe ein. Nach 12 Stunden wird das Tier getötet und das Exsudat sorgfältig abgesaugt. Besonders zahlreiche Exsudate lassen sich mit Aufschwemmungen von Aleuronatmehl in Bouillon erzeugen, die aber vor der Injektion durch 2—3maliges Erwärmen auf 70° sterilisiert werden müssen.

Für den weiteren Verlauf der Untersuchung auf Phagocytose gilt das auf S. 28 unter b gesagte, mit dem Unterschiede, daß die Reaktion nicht bei gewöhnlicher Temperatur erfolgt, die Röhrchen mit dem Bakterienleukocytengemisch vielmehr bei 38° gehalten werden müssen.

Man kann die Leukocyten entweder so verwenden, wie sie frisch im Exsudat vorhanden sind oder sie vorher waschen. Letzteres geschieht indem man sie mit physiologischer Kochsalzlösung (0,8 %) aufschwemmt, dann zentrifugiert, daß Wasser abgießt, frische Kochsalzlösung auffüllt, gut durchschüttelt, abermals zentrifugiert usw.; gewöhnlich genügen aber 2—3 Wiederholungen. Zur Färbung benutzt Marchand Karbol-Methylenblau (2 Teile Methylenblau, 5 Teile Acid. carbol., 100 Teile Wasser).

Da Experimente in vitro (Injektion eines Gemisches von virulenten und avirulenten Streptokokken in die Bauchhöhle von Meerschweinchen resp. in die Kaninchenpleura) zu ganz analogen Ergebnissen führten, wie die Reagenzglasversuche, zog Marchand aus seinen Untersuchungen den Schluß, daß ein bestimmter Streptokokkus virulent sei, weil er nicht phagocytiert wird. Umgekehrt beruht also die Immunität von Kaninchen und Meerschweinchen gegen schwach- oder avirulente Streptokokkenrassen auf der Aufnahme solcher Kokken durch die Leukocyten der betreffenden Tierart.

Als letztes Beispiel für phagocytäre Immunität sei die angeborene Resistenz des Kaninchens gegen Infektion mit Tetanussporen angeführt. Bekanntlich sind Kaninchen ebenso wie Meerschweinchen gegen das Toxin der Tetanusbazillen äußerst empfindlich; unendlich kleine Dosen dieses Toxins genügen, um bei den genannten Tieren tödlichen Starrkrampf zu erzeugen. Im Gegensatz zu dieser ausgesprochenen Sensibilität gegen das Toxin, und natürlich auch gegen Infektion mit Gesamtkulturen (Bazillen + Sporen + Toxin), vertragen die Tiere merkwürdigerweise größere Mengen gewaschener (also toxinfreier) Sporen ohne besondere Beschwerden.

---

*) Von Jssajew[72]) empfohlen.

So haben Vaillard, Vincent und Rouget[210]) gefunden, daß Tetanuskulturen, deren Toxinanteil sie durch Erwärmen auf entsprechende Temperaturen vorher zerstört hatten, für Kaninchen ganz unwirksam wurden. Im einzelnen wurde hierbei festgestellt, daß die Sporen, wenn wirklich alles Toxin sorglältig entfernt worden war, sogleich von mehrkernigen Leukocyten aufgenommen und so am Auskeimen verhindert wurden. Alles was die Phagocytose irgendwie zu beeinträchtigen vermag, erwies sich als begünstigend für die Entwicklung vegetativer Formen, Toxinbildung und den Ausbruch eines finalen Starrkrampfes: z. B. gleichzeitiges Einführen von kleinen Mengen sterilisierter Erde, anderer Infektionserreger, Injektion von Chininpräparaten[211]).

Technik: Durch Erhitzen auf 60° befreit man eine Bouillonkultur von Bac. tetani von ihrem Toxin, injiziert kleine Mengen Kaninchen subkutan und punktiert nach einiger Zeit das an der Injektionsstelle entstehende Ödem mit einer feinen, sterilen Pipette, macht Ausstrichpräparate und färbt mit Karbolfuchsin. Differenzieren in 30%iger Salpetersäure, Gegenfärbung mit Methylenblau. Die Sporen erscheinen leuchtend rot, alles übrige blau.

Analoge Resultate erhielten Leclainche und Vallée[96]) bei ihren ähnlich angeordneten Versuchen mit Rauschbrandbazillen.

Die Phagocyten bei erworbener Immunität.

Bei der Jennerschen Schutzimpfung wird dauernde Immunität gegen eine Infektionskrankheit durch eine leichte Infektion mit abgeschwächtem Virus erzeugt. Seinerzeit war das das erste sichere Beispiel von erworbener Immunität. In der bakteriologischen Aera ist später gezeigt worden, daß es verhältnismäßig leicht und auf den verschiedenen Wegen möglich ist, gewisse Tiere gegen sonst tödliche Infektionen unempfindlich zu machen. Das kann erreicht werden entweder durch Injektionen untertödlicher Dosen des Virus oder mit abgeschwächtem Virus in verhältnismäßig großer Menge (z. B. bei der Pasteurschen Schutzimpfung gegen Milzbrand, Hühnercholera und Rotlauf); schließlich durch Injektion von vorher durch Erwärmung abgetöteten Bakterien (z. B. bei Cholera, Typhus). Es hat sich nun herausgestellt, daß zur Erzielung einer antibakteriellen Immunität gar nicht die Injektion der Mikroben selbst nötig ist. Vielmehr genügt es schon (wie das Salmon und Smith für die Hogcholera, Charrin für die Pyocyaneusinfektion und Roux und Chamberland für den Rauschbrand erwiesen haben), die subkutane oder intravenöse Einverleibung ihrer Sekretionsprodukte, nachdem man sie durch Erhitzung oder Filtration von lebenden Bazillen befreit hat.

So behandelte Tiere erwerben eine dauernde Immunität, die man nach Ehrlich als aktive bezeichnet. Nun hat es sich als ein Umstand von größter Tragweite erwiesen, daß das Blutserum aktiv immunisierter Tiere in vielen Fällen die Fähigkeit hat, anderen nicht vorbehandelten und also empfänglichen Tieren einen gewissen Grad von spezifischer Immunität zu verleihen (Fränkel und Sobernheim[52])). Meist genügen hierfür schon minimalste Serummengen. Aber die so erworbene Immunität ist keine dauernde, sie verschwindet nach einiger Zeit vollständig. Man bezeichnet eine derartige durch Injektion von spezifischem Serum vorübergehend erzeugte spezifische Resistenz als passive Immunität.

Eine große Anzahl von Forschern, vor allem die Gegner der Phagocytentheorie der Immunität glaubten, angesichts der Tatsache, daß bei der erworbenen Immunität die immunisierenden wie die bakteriziden Qualitäten offenbar vor allem auf das Blutserum übergehen, daß zwischen natürlicher und künstlicher Immunität ein prinzipieller Gegensatz bestände, indem im zweiten Fall der Sieg des Organismus über das infizierende Agens nicht auf der Einwirkung von Phagocyten, sondern auf der der Körpersäfte beruhe.

Es ist danach ohne weiteres verständlich, warum sich der wissenschaftliche Kampf zwischen METSCHNIKOFF und seiner Schule einerseits und den Vertretern der humoralen Immunitätstheorien andererseits gerade auf dem Gebiet der erworbenen Immunität abgespielt hat.

Bevor wir aber auf die mannigfaltigen Erscheinungen der Phagocytose bei Immuntieren näher eingehen, erscheint es zweckmäßig, Eigenschaften und Wirkungsweise des Blutserums und sonstiger Gewebsflüssigkeiten von solchen Tieren kurz zu rekapitulieren.

v. BEHRING und NISSEN[15]) haben (1890) nachgewiesen, daß das Blutserum von Tieren, die gegen Vibrio METSCHNIKOFF aktiv immunisiert waren, gegen diesen Vibrio stärker bakterizid war, als das Serum von Normaltieren. Dann haben FRÄNKEL und SOBERNHEIM[52]) gezeigt, daß das Blutserum gegen Cholera immunisierter Meerschweinchen nicht vorbehandelten Tieren vorübergehende spezifische Immunität verleiht. Die Bacterizidie in vivo hat zuerst PFEIFFER[167]) und seine Schule, vor allem JSAJEFF, beim Meerschweinchen demonstriert*).

Aus PFEIFFERS Experimenten geht hervor, daß das aktiv oder passiv gegen Cholera immunisierte Meerschweinchen die Fähigkeit besitzt, die Bazillen nach vorheriger Umwandlung in Körnchen ohne jegliche Mitwirkung von Phagocyten völlig aufzulösen.

METSCHNIKOFF[146]) fand, daß das PFEIFFERsche Phänomen auch im Reagenzglasversuche eintritt, wenn man zu dem Immunserum (d. h. Serum aktiv gegen Cholera immunisierter Tiere) etwas Peritonealexsudat eines Normaltieres hinzufügt. Andererseits hat BORDET[17, 18]), gezeigt, daß es auch durch Einwirkenlassen einer Mischung von Immunserum und Normalserum von Meerschweinchen auf Cholerabazillen hervorgerufen werden kann. Eine Reihe ingeniös ausgedachter Versuche führten BORDET zu folgender Auffassung des Anticholeraserums und der spezifischen bakteriziden Sera überhaupt:

Im Verlaufe der aktiven Immunisierung von Tieren entsteht in ihrem Serum eine besondere Substanz, die BORDET „Substance sensibilatrice", EHRLICH und MORGENROTH „Ambozeptor" und METSCHNIKOFF „Fixateur" nennt. Diese Substanz ist thermostabil; sie geht bei einstündiger Erwärmung des Serums auf 55° nicht zugrunde, sondern erst bei 68—70°. Sie ist streng spezifisch, d. h. sie wirkt nur auf die Bakterienart, mit der das Tier vorbehandelt worden ist. Ferner haben EHRLICH und MORGENROTH für die cytotoxischen und insbesondere das hämolytische Serum gezeigt, daß der Ambozeptor die Fähigkeit besitzt, sich mit den Körpern der Bakterien, auf die er wirkt, zu verbinden, sich auf ihnen zu fixieren; wenn man nämlich Bakterien mit einer bestimmten Menge vorher auf 55° erwärmten Immunserums

*) Technik s. A. BÖHME, Über Bakteriolysine dieses Handb.

zusammenbringt, dann zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit für sich untersucht, so sind die Ambozeptoren daraus verschwunden; sie sind von den Bakterien absorbiert worden.

Ferner hat Bordet nachgewiesen, daß der Ambozeptor für sich allein nicht imstande ist, den körnigen Zerfall beispielsweise von Cholerabazillen herbeizuführen; vielmehr ist dazu noch eine zweite Substanz nötig. Das ist das „Alexin" Buchners und Bordets, das „Komplement" Ehlichs und Morgenroths, die „Cytase" Metschnikoffs. Diese zweite Substanz ist thermolabil; sie wird durch $1/2$ stündiges Erwärmen auf 55° zerstört. Sie ist nicht spezifisch und findet sich stets auch in dem Serum nicht vorbehandelter Tiere.

Man muß also, um das Pfeiffersche Phänomen in vitro hervorzurufen, zu den Cholerabazillen erstens eine gewisse Menge Ambozeptor, und zweitens eine Spur Komplement (Normalserum) hinzufügen. In dem erwähnten Versuch Metschnikoffs spielt aber das normale Peritonealexsudat die Rolle eines Komplements, das das Anticholeraimmunserum reaktiviert. Nach den Untersuchungen Bordets, die v. Dungern[44]) auch für die Cytolysine bestätigt hat, wächst nur die Menge des Ambozeptors im Serum der geimpften Tiere; die Komplementmenge bleibt auch nach der Vaccination bei demselben Tiere konstant.

Alle die in diesem kurzen Überblick über die Konstitution der bakteriolytischen Sera angeführten Tatsachen haben natürlich der phagocytären Auffassung der Immunität einen argen Stoß versetzt. Aus dem Vorhandensein bakterizider Fähigkeiten im Normalserum, ihrer starken Zunahme im Immunserum, ferner aus der Tatsache, daß solch ein zellfreies Serum ungeheuere Bakterienmengen zum Zerfall bringen kann, liegt für den Gegner dieser Auffassung nahe, anzunehmen, daß die Bakterizidie allein, völlig ohne Mitwirkung der Phagocyten, eine Immunität gewährleiste. Wir werden sehen, wie weit diese Auffassung den Tatsachen entspricht.

Metschnikoff[136]) hat für die experimentelle Cholera bewiesen, daß aktiv immunisierte Meerschweinchen bei völligem Fehlen des extrazellulären körnigen Zerfalls eine intraperitoneale Infektion durchaus überstehen können. Von der Beobachtung ausgehend, daß gleichzeitig mit der intraperitonealen Injektion der Choleravibrionen (oder anderer Substanzen) die Leukocyten so schnell verschwinden, glaubte er eine Abhängigkeit des körnigen Zerfalls im Pfeifferschen Versuche von dieser Zerstörung der Leukocyten (Phagolyse) annehmen zu können. Tatsächlich konnten Metschnikoff und Garnier[54]) zeigen, daß der körnige Zerfall der Bazillen bei intraperitonealer Injektion völlig oder fast ganz ausbleibt, wenn man durch einen Kunstgriff die Phagolyse verhindert. Man sieht dann, wie die Vibrionen von den Mikrophagen aufgenommen werden, und im Innern ihres Protoplasmas Körnchen bilden; es treten dabei innerhalb der polynukleären Leukocyten alle Übergänge von völlig erhaltenen Stäbchen bis zur Körnchenbildung und völligen Bakterienauflösung auf.

Technik: **Das PFEIFFERsche Phänomen und die Phagolyse.** Der Grund für die Phagolyse ist die große Empfindlichkeit der Leukocyten des Peritoneums gegen eine plötzliche Injektion jeder Art von Flüssigkeit (Bouillon, Kulturfiltrat, ja sogar physiologische Kochsalzlösung (Picrallini[174])). Zur Verhinderung der Phagolyse muß man deshalb die Leukocyten in der Bauchhöhlenflüssigkeit durch eine vorherige Injektion phagolytischer Substanzen kräftigen. Metschnikoff verhinderte unter Berücksichtigung der Versuche Isaeefs[72]) die Phagolyse, indem er den Meer-

schweinchen zunächst einige Kubikzentimeter Bouillon oder physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal einspritzte. Eine Stunde nachher ist das Peritonealexsudat außerordentlich leukocytenreich, so daß es dick, rahmartig aussieht. Jetzt wird eine Mischung von Cholerakultur und Anticholeraserum intraperitoneal injiziert. Im Gegensatz zu den nicht vorbehandelten Kontrolltieren ist dann der extracelluläre körnige Zerfall der Vibrionen ganz gering; vielmehr werden sie fast alle von Phagocyten aufgenommen, und in deren Inneren in Granula verwandelt. Dies Experiment gelingt nun, wie auch METSCHNIKOFF angibt, nicht immer. Sein Gelingen hängt von dem Resistenzgrade der Phagocyten gegen die Phagolyse ab; vor allem ist dafür der Zustand des Exsudates wichtig, das dick und sehr leukocytenreich sein muß. So erklären sich auch die entgegengesetzten Resultate PFEIFFERS und ABELS[1]). Daher hat BAIL[7]) eine Modifikation des METSCHNIKOFFschen Verfahrens angegeben.

BAIL geht zur Vermeidung der Phagolyse folgendermaßen vor: er injiziert einem frischen Meerschweinchen 5 ccm Aleuronatemulsion intraperitoneal, und wiederholt diese Injektion am nächsten Tage gleichzeitig mit einer subkutanen Injektion von 0,01 ccm Anticholeraserum vom Pferde. Am dritten Tage erhält das Tier 1 Öse einer Choleraagarkultur intraperitoneal. Es wird dann sofort, sowie nach 5, 10, 15, 20, 35, 43, 50 und 60 Minuten untersucht. Als Kontrolltier dient ein frisches, am Tage vor der intraperitonealen Injektion der Kultur mit 0,01 ccm Anticholeraserum subkutan gespritztes Meerschweinchen.

Bei dieser Anordnung tritt die Phagolyse völlig zurück, und es tritt dafür die Phagocytose und der intracelluläre körnige Zerfall der Bakterien in den Vordergrund.

Es folgt aus diesen Versuchen, daß bei aufgehobener Phagolyse auch das PFEIFFERsche Phänomen nicht mehr zustandekommt. Da nun die Tiere trotz des Fehlens der extrazellulären Auflösung weiterleben, ganz genau so gut, wie die, bei denen das PFEIFFERsche Phänomen eintritt, während die nicht immunisierten Kontrolltiere sterben, so dürfen wir folgenden Schluß ziehen: Der extrazelluläre körnige Zerfall der Bakterien ist keineswegs die conditio sine qua non der antibakteriellen Immunität.

Weiterhin konnten METSCHNIKOFF und BORDET zeigen, daß ein Antiserum in vitro niemals die Choleravibrionen völlig auflösen kann. Daraus folgt, daß unter besonderen Bedingungen die körnig zerfallenen Vibrionen PFEIFFERS sich erholen, sich sogar weiterentwickeln können.

Was ist nun das Schicksal subkutan oder in die vordere Augenkammer einverleibter Bakterien im Körper von Immuntieren? Für die vordere Augenkammer hat METSCHNIKOFF das Fehlen eines körnigen Zerfalls auch dann nachweisen können, wenn das Serum am betreffenden Tiere stark bakteriolytisch war.

Ebenso ist es bei subkutaner Injektion. SALIMBENI[185]) hat, ebenso wie METSCHNIKOFF, CANTACUZÈNE und MESNIL dargetan, daß bei aktiv immunisierten Pferden in der Flüssigkeit des Ödems, das durch subkutane Einverleibung von Vibrionen (Prusse orientale) entsteht, kein körniger Zerfall stattfindet. Zuerst werden die Bakterien unbeweglich und sind nach 10—12 Stunden in Mikrophagen eingeschlossen, innerhalb deren sich dann der Zerfall in Körnchen einstellt. Im Gegensatz dazu werden die von Makrophagen (mononukleären Leukocyten) aufgenommenen Mikroben ceteris paribus nicht zerstört.

Technik: SALIMBENI benutzt ein im Verlauf von 14 Monaten 37mal mit im ganzen 189 lebenden Agarkulturen von Choleravibrionen vorbehandeltes Pferd. Das Serum dieses Tieres schützte im Augenblicke des Versuches in einer Dose von $^1/_{20}$ mg ein 250 g schweres Meerschweinchen von der doppelten tödlichen Dosis lebender Vibrionen.

Ein so vorbehandeltes Pferd erhält unter sorgfältiger Vermeidung jeglicher Blutung eine gewisse Menge in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmter Choleravibrionen subkutan. Von Zeit zu Zeit wird mittels einer starken Glaskapillare oder auch mit der Pravazspitze die Flüssigkeit des Unterhautzellgewebes frisch und im gefärbten Präparat untersucht.

Ebenso leicht ist übrigens zu beweisen, daß auch das passive Ödem, erhalten durch venöse Stauung bei aktiv gegen Cholera immunisierten Meerschweinchen oder Kaninchen, sich durch kaum nennenswerte oder sogar gänzlich fehlende bakteriolytische Fähigkeiten auszeichnet, wenn diese Ödemflüssigkeit leukocytenarm ist (BORDET[17]).

Technik: Bakterizidie in der Ödemflüssigkeit von Immuntieren. Immunisierung von Kaninchen oder Meerschweinchen mit wiederholten subkutanen Injektionen durch Wärme abgetöteter Cholerakulturen. Zuerst Feststellung, wieviel Serum dieser Tiere zum Schutze gegen die mehrfach tödliche Dosis Cholerabazillen nötig ist. Das Ödem am Kaninchenohr oder Vorderfuß des Meerschweinchens wird durch kräftige Unterbindung mit einem Gummischlauch hervorgerufen. Mit der ausgezogenen Glaspipette wird etwas Ödemflüssigkeit entnommen; sie ist meist leicht rötlich, und enthält vereinzelte Leukocyten und auch Erythrocyten, weil sich kleinste Blutungen nicht vermeiden lassen. Es erfolgt nun in vitro die Bestimmung des bakteriziden Titers 1. der Ödemflüssigkeit; 2. des Serums des vorbehandelten Tieres und 3. des Serums eines Normaltieres. Hierzu wird in etwa 1 ccm von jeder dieser Flüssigkeiten 1 Öse einer vorher in 5 ccm 0,6$^0/_0$igen Kochsalzlösung aufgeschwemmten Cholerakultur eingeimpft. Die Flüssigkeiten werden bei 38^0 gehalten und mittels Plattenmethode nach bestimmten Zeitabschnitten die Zahl der Keime in den drei Flüssigkeiten bestimmt.

Alle diese Tatsachen haben METSCHNIKOFF und seine Schule zu einer abweichenden Auffassung des PFEIFFERschen Phänomens bewegt. Wir wissen nun, daß die bakterizide Fähigkeit jedes Immunserums auf der Anwesenheit zweier Substanzen beruht, des Komplementes (Cytase) und des Ambozeptors (Fixateur). Welche von diesen beiden normalerweise in den Leukocyten eingeschlossenen Substanzen wird nun bei der Phagolyse frei.

Nach METSCHNIKOFF zirkuliert bei stark aktiv immunen Tieren der spezifische Ambozeptor frei im Blutplasma; gleicherweise ist er im Ödem dieser Tiere leicht nachweisbar; an sich unwirksam, wird er bei Zusatz auch nur einer Spur Komplementes (frischen Normalserums) stark aktiv (BORDET). Im Gegensatz dazu ist das Komplement, darin dem Fibrinferment sehr ähnlich, in den Leukocyten eingeschlossen, und wird erst aus ihnen durch mehr oder minder große Schädigungen ihrer Vitalität in Freiheit gesetzt. Solche Schädigung braucht nicht gleich in völliger Auflösung des Leukocyten zu bestehen; es genügt schon dazu eine geringe Verminderung seiner Resistenz, eine vorübergehende Lähmung.

Wenn nun in einem aktiv immunisierten Organismus eine Leukocytenschädigung eintritt, tritt Komplement aus; es vereinigt sich mit dem freien Ambozeptor, und kann so den körnigen Zerfall der Cholerabazillen bewirken. Das ist der Vorgang in der Bauchhöhle beim PFEIFERschen Versuch. Man kann ein Eintreten hindern, wenn man durch vorhergehende Injektion von physiologischer Kochsalzlösung oder Bouillon die Leukocyten des Peritoneums kräftigt.

METSCHNIKOFFS Auffassung beruht außer den genannten noch auf einer Reihe anderer Tatsachen: auf dem leukocytären Ursprung der Komplemente, dem Fehlen des Komplementes im Blutplasma und dem Schicksale der in den allgemeinen Blutkreislauf immunisierter Tiere eingebrachten Bakterien.

HANKIN[63]) hat zuerst, allerdings ohne den strengen Beweis dafür zu erbringen, die Hypothese aufgestellt, daß die Leukocyten, insbesondere die eosinophilen, die bakteriziden Substanzen des Serums erzeugen. Dann haben DENYS und HAVET[37]) HANKINS Theorie nachgeprüft. Sie kamen zum Schlusse, daß in der Tat die Leukocyten bei der Entstehung des Alexins beteiligt sind. Sie fanden das Gesamtblut bakterizider als das Serum allein, und konstatierten eine Verminderung des bakteriziden Vermögens, wenn man durch Filtration das Blut leukocytenärmer macht. Ferner erzeugten sie leukocytenreiche Exsudate durch subkutane oder intraperitoneale Einverleibung von abgetöteten Staphylokokken- oder Cholerakulturen. Diese Exsudate waren stark bakterizid, büßten aber an dieser Fähigkeit nach der Filtration deutlich ein. Ferner wies VAN DE VELDE*)[212]) nach, daß ein durch intrapleurale Injektion von abgetöteten Staphylokokken beim Kaninchen gewonnenes leukocytenreiches Exsudat bakterizider ist, als das Serum desselben Tieres; aus der Tatsache nun, daß die meisten Leukocyten in solchen Exsudaten lebensfrisch sind, schließt VAN DE VELDE auf eine Sekretion des bakteriolytischen Prinzipes durch die Leukocyten.

Dann nahm H. BUCHNER[21]) 1894 die Frage in einer grundlegenden Arbeit von neuem auf. Er hält die Untersuchungen von DENYS und HAVET nicht für absolut beweiskräftig. Wenn es auch richtig ist, daß das die Leukocyten enthaltende Zentrifugat eines Exsudates bakterizider wirkt als die überstehende Flüssigkeit und die Bakterizidie der Flüssigkeit durch Zufügen des Zentrifugates wieder hergestellt wird, so beruht dies nach BUCHNER möglicherweise darauf, daß DENYS und HAVET mit lebenden Leukocyten arbeiteten, die also durch Phagocytose einen Teil der Versuchsbakterien vernichtet haben konnten, ohne daß deswegen von Bakterizidie die Rede zu sein brauchte. BUCHNER und seine Schüler, KOLB und SCHUSTER haben deshalb neue Versuche an durch Einfrieren abgetöteten Leukocyten angestellt, und die erwähnte Fehlerquelle auf diese Weise ausgeschlossen.

BUCHNERS Methode zur Herstellung bakterizider Leukocytenextrakte.

Man injiziert Hunden oder Kaninchen intrapleural 2—5 ccm eines Gemisches von Aleuronat mit etwas Stärke. Nach 24—48 Stunden tötet man die Tiere, und entnimmt mit steriler Pipette das zellreiche Exsudat oder die an der Pleurawand anhaftenden weißlichen Leukocytenhäufchen. Dieses Material wird dann zum Abtöten der Leukocyten in einem Kältegemisch zum Einfrieren gebracht, was den bakteriziden Titre nicht beein-

*) Siehe auch DENYS[36]).

flußt, und bei 38° wieder aufgetaut. Es folgt die Auswertung des bakteriolytischen Titers mit der Plattenmethode.

Mit dieser Methode wies Buchner nach, daß die abgetöteten Leukocyten baterizid wirkende, mit denen des Blutserums identische, Substanzen in Freiheit setzen. Ihre bakteriolytische Wirkung wird durch Erhitzen zerstört. Man kann, nach Buchners Untersuchungen, durch Zufügen von gefrorenen und wieder aufgetauten Leukocyten zu frischem Serum seine bakterizide Fähigkeit so erhöhen, daß sie deutlich die des reinen Serums übertrifft.

Auf einem andern Wege hat M. Hahn[62]), ein Schüler Buchners, die Identität der bakteriziden Substanz innerhalb der Leukocyten und derjenigen des Serums gezeigt. Er versenkt sterilisierte, mit einer Lösung von zimmtsaurem Natron oder Papayotin getränkte Wattetampons Meerschweinchen in die Bauchhöhle. Nach 13 Stunden werden die Tiere getötet, die Tampons entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, wodurch man einen Extrakt der reichlich in den Tampon eingewanderten Leukocyten erhält. Dieser wirkt stark bakterizid gegen Staphylokokken, Typhusbazillen und Choleravibrionen, gegen die beiden letzteren sogar stärker als das Blutserum. Hahn gelang es nicht, durch Zusatz von Leukocyten aus dem Peritonealexsudat bei 60° inaktivierten Serum eine Reaktivierung zu erzielen. Er nimmt an, daß die weißen Blutkörperchen in lebendem Zustande bakterizide Stoffe sezernieren.

Schattenfrohs Methode. Schattenfrohs[187]) Methode ist eine interessante Modifikation der Buchnerschen Technik. Meerschweinchen erhalten intraperitoneal 5 ccm Aleuronaufschwemmung, und 15—18 Stunden darauf 5—10 ccm 0,6 %ige Kochsalzlösung. Gleich derauf werden die Tiere aus der Karotis entblutet, das leukocytenreiche Peritonealexsudat wird steril entnommen, in zwei verschieden zu behandelnde Teile a) und b) geteilt. Beide Portionen werden zentrifugiert.

a) Man gießt die Hälfte der überstehenden Flüssigkeit in ein Röhrchen a^1), schüttelt dann gut a und a^1, läßt beide im Verlaufe mehrerer Stunden mehrfach gefrieren und wieder bei 35° auftauen.

b) Alle überstehende Flüssigkeit wird abgegossen und bei 55—60° inaktiviert, dann die Hälfte davon auf das aus Leukocyten bestehende Zentrifugat gegossen, mit ihnen vermischt und eingefroren; die andere Hälfte b^1 dient als Kontrolle.

Darauf wird die bakterizide Kraft der verschiedenen Portionen gegen Staphylococcus aureus und Bact. coli ausgewertet. Man findet dann die Leukocyten enthaltenden Portionen stark bakterizid; ebenso wird die inaktivierte Flüssigkeit durch die hinzugefügten Leukocyten reaktiviert.

Leukocytenextrakte nach Schattenfroh[188]). Kaninchenleukocyten aus Pleuraexsudaten werden durch Zentrifugieren sedimentiert, dann in physiologischer NaCl-Lösung suspendiert, mehrfach hintereinander zum Gefrieren gebracht, darauf bei 33° mazeriert. Der dann durch Zentrifugieren geklärte Leukocytenextrakt wirkt stark bakterizid, und verträgt Erwärmung auf 60°, ja auf 80—90°. Diese Thermostabilität erklärt Schattenfroh aus der Gegenwart von Natriumsalzen.

Auch vorher getrocknete Leukocyten aus Brust- oder Bauchhöhlenexsudat können zur Herstellung von stark bakterizid wirkenden, relativ thermostabilen Leukocytenextrakten dienen (Schattenfroh). Das Trocknen erfolgt im Vakuum über Phosphorpentoxyd, worauf das Material im Achatmörser verrieben, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, bei 37° mazeriert und schließlich zentrifugiert wird.

Gegenüber diesen mit physikalischen Methoden (Frierenlassen, Trocknen) gewonnenen Leukocytenextrakten haben andere Autoren versucht, durch elektiv auf die weißen Blutkörperchen wirkende Mittel diese zur Auflösung zu bringen. Dazu gehören folgende Methoden:

Bails Methode zur Herstellung bakterizider Leukocytenextrakte. Bail[8]) zerstört die Leukocyten mit van de Veldes „Leukocidin"*). Er mischt diese Substanz mit den durch Zentrifugieren eines Aleuronatexsudates gewonnenen Leukocyten. Bei 37° sind nun in wenigen Minuten die meisten Leukocyten zerstört. Es wird dann sofort Nährbouillon oder inaktiviertes Serum als Nährboden hinzugefügt, und mit der Plattenmethode die bakterizide Wirkung festgestellt. Als Kontrolle wird in einer zweiten Serie ceteris paribus inaktiviertes Leukocidin mit den Leukocyten vermischt.

Bail fand, daß die so frei gemachte bakterizide Substanz stark wirksam gegen Bac. prodigiosus, Bac. coli und typhi, Vibr. cholerae ist.

Es gelang ihm auch in vivo durch Injektion von Leukocidin in eine Pleura, die leukocytenreiches Exsudat enthielt, die Alexine aus den Leukocyten freimachen.

Eine Erhitzung der so gewonnenen Leukocytenextrakte auf 58 bis 60° blieb unwirksam; bei 65° wurden sie zersört. — So zeigte sich also das leukocytäre Alexin im allgemeinen thermostabiler als das ausnahmslos etwa bei 56° zu inaktivierende Serumalexin. Dieser Umstand findet seine Erklärung in Buchners Beobachtung, daß die Hitzebeständigkeit des Alexins durch Anwesenheit von Natriumsalzen (NaCl) erhöht wird.

Bakterizider Leukocytenextrakt nach van de Velde. Die Methode van de Veldes[213]) beruht auf der Anwendung von destilliertem Wasser und frischem Hundeserum zur Freimachung von Komplement aus Leukocyten. In zwei Röhrchen kommt die gleiche Menge bei 56° inaktivierten Kaninchenserums und in jedes eine Öse Staphylokokkenkultur. Zur Kontrolle der Zahl der geimpften Keime werden nach sorgfältiger Mischung Agarplatten gegossen. Darauf kommen in das erste Röhrchen die entweder durch Hundeserum (dieses wirkt bekanntlich stark lösend auf Kaninchenleukocyten) oder destilliertes Wasser aufgelösten Kaninchenleukocyten. Das andere Röhrchen dient als Kontrolle, und erhält anstatt der Leukocyten entweder inaktiviertes Hundeserum oder destilliertes Wasser. Nach einigen Stunden ist durch das Plattenverfahren eine stark bakterizide Wirkung in den mit Leukocyten beschickten Röhrchen festzustellen.

Resümieren wir das Resultat aller erwähnten Versuche: die bakterizid wirkenden Prinzipien des Serums, speziell das Komplement, werden von und in den Leukocyten erzeugt, durch deren Zerstörung man sie leicht frei machen kann. Durch diese Tatsache gewinnt Metschnikoffs Phagolyse-Theorie eine ausgezeichnete Stütze. Er und seine Schüler gingen aber noch weiter. Sie versuchten klarzustellen, ob das von den verschiedenen Leukocytenarten erzeugte Komplement ein und derselbe Körper ist, oder ob vielleicht von Makrophagen und Mikrophagen verschiedene, für jede dieser Formen weißer Blutkörperchen charakteristische Arten von Komplement stammen.

So hat Metschnikoff mit Tarasséwitsch[203]) dargetan, daß die Makrophagen, die vorwiegend Zellen und deren Trümmer in sich aufnehmen und verdauen, eine besondere Makrocytase (hämolytisches Kom-

*) Die Einzelheiten über das Leukocidin siehe Bd. I, pag. 222.

plement) erzeugten, während das bakteriolytische Komplement (Mikrocytase) von den Mikrophagen stammt. Diese Ansicht wurde von Korschun und Morgenroth[86]) sowie von Donath und Landsteiner[42]) angezweifelt. Sie erklärten die Makrophagenextrakte Tarasséwitchs wegen ihrer Thermostabilität für nicht identisch mit dem hämolytischen Komplement. Die von Levaditi vorgenommene Nachprüfung[106]) zeigte, daß kein zwingender Grund besteht, den leukocytären Ursprung des hämolytischen Komplements abzulehnen. Tatsächlich ist der durch längere Mazeration von Makrophagen (Lymphdrüsen) gewonnene, hämolytisch wirkende Extrakt thermostabil. Aber man kann durch Abkürzung des Mazerationsprozesses bei 38° leicht ein thermolabiles Hämolysin gewinnen. Der so gewonnene „Schnellextrakt" (Extrait rapide) aus Lymphdrüsen wird bei 56° zerstört und ist imstande, ganz wie das hämolytische Komplement des Serums ein inaktiviertes Serum zu aktivieren.

Sind somit die Makrophagen ohne Zweifel als Ursprungstätte eines hämolytischen Komplements zu betrachten, so liefern andererseits die Mikrophagen eine bakteriolytische Substanz*), wie aus den angeführten Untersuchungen von Buchner, Schattenfroh, Bail, van de Velde u. a. hervorgeht, welche Autoren dieses Alexin in den zum größten Teil aus Mikrophagen sich zusammensetzenden Leukocytenmassen in Aleuronatexsudaten nachgewiesen haben. Wassermann[221]) hat übrigens folgenden Versuch als Beweisstück für obige Ansicht beigebracht: er injizierte Kaninchen gewaschene Meerschweinchenleukocyten und fand dann im Serum des Kaninchens ein Antikomplement, das nicht würde haben entstehen können, wenn die injizierten Leukocyten kein Komplement enthalten hätten.

Nachdem so die Ursprungsstätte des Komplements als nachgewiesen erachtet werden kann, bleibt noch die Frage, ob es als vitales Sekretionsprodukt der Leukocyten (Mikrophagen) anzusehen ist, oder ob das aus letzteren erst mit deren Untergang bzw. bei gröberen Störungen der Zelltätigkeit frei wird. Mit anderen Worten, es handelt sich darum, ob es zirkulierende Plasma normaler und gesunder Tiere ebenfalls Komplement enthält, oder ob der Komplementreichtum des Serums lediglich Folge des massenhaften Leukocytenzerfalls ist, mit dem der Gerinnungsvorgang verknüpft ist. Es liegt klar auf der Hand, daß die Richtigkeit der zweiten Annahme die Bedeutung löslicher freizirkulierender bakterizider Schutzstoffe bei Infektionskrankheiten auf ein Minimum reduziert.

Metschnikoff und seine Schüler (Gengou[55]), Bordet[17]), Levaditi[109]) haben die aufgeworfene Frage im verneinenden Sinne beantwortet; d. h. nach ihrer Ansicht enthält das zirkulierende Plasma kein freies

---

*) Nach neueren Untersuchungen von Schneider (Münchener med. Wochenschrift 1908, Nr. 10, pag. 499) und von Korschun (Ann. de l'Inst. Pasteur 1908, Vol. XXII) bestehen zwischen Komplement und den bakteriziden Stoffen in Leukocytenextrakten gewisse Unterschiede. Letztere Substanz ist weniger thermolabil als Komplement und reaktiviert bakteriolytische Ambozeptoren nicht. Im Gegensatz zum Komplement zeigt sie auch keinerlei opsonisierende Eigenschaften. Es handelt sich also um einen spezifischen Leukocytenkörper, den Schneider „Leukin", Petterson (Centralbl. für Bakt. 1908, Bd. XLVI, pag. 405) „Endolysin" nennt. Eigene, von mir und Yamanouchi angestellte Versuche führten zu entsprechenden Befunden; auch konnten wir feststellen, daß dieses „Leukin" von den durch Ehrlich und Landsteiner entdeckten bakteriziden Körpern in alkoholischen Organextrakten durchaus getrennt werden muß (Centralbl. für Bakt. 1908, Bd. XLVI, pag. 246).

Komplement. Sie stützen ihre Ansicht vor allem darauf, daß die leukocytenarme Punktionsflüssigkeit von Ödemen komplementfrei ist; ferner auf das im Verhältnis zum Serum geringe bakteriolytsche Vermögen des Plasmas in vitro.

Gengou hat den erwähnten Unterschied zwischen frischem Plasma und durch Gerinnung hergestelltem Serum an Milzbrand-, Typhus- und Cholerabazillen experimentell nachgewiesen, wobei zur Gewinnung eines nicht gerinnenden Plasmas folgende Technik (Bordet und Gengou [19]) in Anwendung kam:

Verfahren von Freund-Gengou zur Plasmabereitung. Man stellt eine größere Anzahl Glaszylinder von verschiedener Länge und Weite her, deren eines Ende zu einer abgebogenen Spitze ausgezogen ist; das andere wird mit einem Wattebausch tamponiert und die Röhren, deren Kapazität zwischen der eines gewöhnlichen Reagenzglases und etwa dem zehnfachen dieses Volumens variiert, im Trockenofen sterilisiert. Mittels solcher Röhren kann man Tiere leicht und schnell und unter allen aseptischen Kautelen entbluten. (Verfahren von Latapie.)

Im gegebenen Falle muß die Innenfläche eines solchen Entblutungszylinders zur Verhinderung der Blutgerinnung mit einer feinen Paraffinschicht überzogen werden. Man bringt zu diesem Zweck ein steriles Stück Paraffin in das Rohr, schließt den Wattepropf wieder und läßt unter vorsichtigem Erwärmen des Rohres das Paraffin sich möglichst gleichmäßig ausbreiten. Damit die feine Spitze am ausgezogenen Ende des Rohres sich nicht verstopft, tut man gut, in das andere durch die Watte leicht hineinzublasen; etwa austretende Paraffintröpfchen müssen dann sorgfältig entfernt werden. Ist das Rohr in dieser Weise vorbereitet, so wird am aufgespannten Tier (Kaninchen, Meerschweinchen oder Ratte) die Carotis freipräpariert, kopfwärts eine Ligatur angelegt, die Oberfläche mit einem glühenden Glasstäbchen durch ganz sanftes Auftupfen verschorft, jetzt in einiger Entfernung von der Ligatur herzwärts eine Federklemme angelegt und nun in das prall angelaufene Gefäß die Spitze des Entblutungsrohres mit einem kurzen Ruck eingestoßen und die Klemme sofort gelöst. Das Blut schießt jetzt in den Zylinder hinein. Wenn das gewünschte Quantum auf diese Weise gewonnen ist, jedenfalls aber nicht später als wenige Minuten nach Beginn der kleinen Operation, wird das Rohr herausgezogen, das Blut in ein ebenfalls mit Paraffin überzogenes Zentrifugengläschen gegossen und sofort sehr rasch (am besten auf einer elektrischen Hochtourenzentrifuge) zentrifugiert, wobei es sich empfiehlt, das Gläschen in ein Gemisch von feingestampftem Eis und Steinsalz zu stellen und so schon während des Zentrifugierens die Temperatur möglichst niedrig zu halten. Das überstehende Plasma wird mit einer sterilen Kugelpipette abgesaugt und im Eisschrank aufbewahrt. Es gerinnt nur äußerst langsam; erst nach Stunden und Tagen bildet sich ein gelatinöser Klumpen. Mithin entspricht das so präparierte Plasma dem idealen zirkulierenden nicht vollständig, da es immer Spuren von Fibrinferment enthält.

Mit Hilfe dieser Methode konnte Gengou nachweisen, daß der Gehalt des Plasmas an bakteriziden Stoffen bedeutend geringer ist als der des entsprechenden aus demselben Blut stammenden Serum. Die immerhin vorhandenen geringen Mengen solcher Stoffe im Plasma setzt er auf Rechnung der erwähnten mangelhaften Beschaffenheit des letzteren und zieht den Schluß, daß im zirkulierenden Blut kein Komplement enthalten ist.

Diese Anschauung Metschnikoffs und Gengous wird durchaus nicht von allen Seiten geteilt. So gibt Petterson[173]) an, daß zwischen dem bakteriolytischen Vermögen von Plasma und Serum keinerlei quantitative Unterschiede nachweisbar seien, wenn man zur Verhütung der Gerinnung dem Blut Kaliumoxalat im Verhältnis von 1:1000 zusetzt. Zu dem gleichen Ergebnisse gelangte auch Lambotte[92]), der sein Plasma nach der Methode von Frédérick darstellte (Zentrifugieren eines an zwei Stellen unterbundenen und so exzidierten Venenstücks). Demgegenüber ist einzuwenden, daß der Zusatz eines chemisch so differenten Körpers, wie Kaliumoxalat, für die Vitalität resp. Intaktheit der weißen Blutkörperchen sicher noch weniger gleichgültig ist als die vorsichtig durchgeführte Behandlung des Bluts in paraffinierten Gefäßen nach der Gengouschen Methode; daß das so hergestellte Plasma sich also vom zirkulierenden eher noch mehr unterscheidet als das durch Zentrifugieren gewonnene. Auch die Lambotteschen Versuche sind nicht als maßgebend anzusehen: erstens ist auch das nach dem Frédérickschen Verfahren hergestellte Plasma durchaus nicht incoagulabel; zweitens prüfte Lambotte den Komplementgehalt seines Präparates an Choleravibrionen in Gegenwart von Choleraimmunserum, also unter Bedingungen, wo schon Spuren von Komplement unverhältnismäßig große Anschläge geben; drittens hat er nicht quantitativ gearbeitet (also mit der Plattenmethode etwa), sondern sich lediglich auf die Feststellung von Körnchenbildung beschränkt.

Mithin darf, nach Metschnikoff, als experimentell erwiesen gelten, daß das zirkulierende Blut kein Komplement enthält. Daraus geht, im Sinne der Metschnikoffschen Lehre, hervor, daß die Leukocyten das Komplement nicht „sezernieren", sondern daß dieses erst im Gefolge mehr oder weniger tiefgreifender Störungen im Leben der weißen Blutkörperchen (Phagolyse) in das umgebende Blut austritt*).

Diese Schlußfolgerung steht überdies in völligem Einklang mit Versuchsbefunden bei Injektion von Choleravibrionen in den Kreislauf gegen Cholera aktiv immunisierter Tiere.

So hat vor allem J. Bordet[17]) das Schicksal von Choleravibrionen verfolgt, die er immunisierten Meerschweinchen intravenös injiziert hatte. Trotz hohen Gehaltes des Serums solcher Tiere an vibriolytischem Ambozeptor fand Bordet keinen extrazellulären körnigen Zerfall; die Vibrionen wurden sehr rasch (innerhalb von 5′ etwa) von polynuklearen Leukocyten eingeschlossen und hier im Sinne des Pfeifferschen Phänomen intrazellulär zu Körnchen umgewandelt.

Die Phagocytose erfolgt nicht nur in der Peripherie der Zirkulation, sondern in gleichem Maße auch innerhalb der Gewebe, namentlich der Milz und Leber. Parallelkulturen aus Blut und Organpreßsaft zeigten,

---

*) Laschtschenko[94]) und Trommsdorff[206]) glauben den Nachweis erbracht zu haben, daß die Leukocyten auch in vivo Alexin zu sezernieren vermögen. Sie sahen nämlich, daß frisch inaktives oder künstlich inaktiviertes Hunde-, Hammel- und Pferdeserum durch Kontakt mit Kaninchenleukocyten stark bakterizid wurde. Trommsdorff hat die letzteren während der Versuchsdauer mikroskopisch untersucht und dabei feststellen können, daß zwar in manchem seiner Versuche eine nicht unbeträchtliche Leukolyse auftrat, in anderen wiederum die Leukocyten ganz intakt (Beweglichkeit) blieben und das Serum dennoch aktiviert wurde. Die genaue Durchsicht der Trommsdorffschen Protokolle ergibt jedoch, daß auch in den letztgenannten Fällen immer ein Teil der Leukocyten als nicht ganz ungeschädigt angesehen werden muß, woraus sich dann die Versuchsresultate ohne weiteres ergeben.

daß die Vibrionen rascher aus dem Blut, als aus den inneren Organen verschwinden. LEVADITI[109]) hat diese Versuche mit mannigfaltigen Abweichungen von der Anordnung BORDETs nachgeprüft und ist zu den gleichen Resultaten gelangt.

Technik der intravenösen Injektion von Vibrionen beim immunisierten Meerschweinchen.

Man immunisiert ein Meerschweinchen durch wiederholte Injektionen einer (durch Erhitzen auf 60^0) abgetöteten Kultur von Vibrio cholerae, bis nach einiger Zeit das Serum dieses Tieres auch in minimalsten Mengen in vitro körnige Umwandlung von Choleravibrionen bewirkt. Hat das Serum diesen Titer erreicht, so injiziert man dem Tier vor dem eigentlichen Versuch 3—4 ccm isotonischer Kochsalzlösung oder Bouillon, indem man durch einen Medianschnitt die Haut am Halse spaltet, die Fascie scharf und das darunter liegende lockere Gewebe stumpf mit einer Hohlsonde zur Seite präpariert, bis die meist strotzend gefüllte V. jugularis exter. freiliegt, nun die möglichst fein zu wählende Kanüle der Spritze herzwärts durch die Venenwand einsticht und langsam injiziert.

Am nächsten Tage (wenn man in der Zeit beschränkt ist, genügt ein Zwischenraum von einigen Stunden) bekommt das Tier in die Jugularvene 0,5 ccm einer dicken aber feinen Emulsion von Choleravibrionen in isotonischer Kochsalzlösung resp. Bouillon, die man vor der Injektion auf 38^0 erwärmt.

Unmittelbar nach dem Eingriff wird mit einer scharfen Schere die eine äußerste Ohrspitze des Tieres abgekappt und von hier aus in regelmäßigen Zeitabständen ein Deckglasausstrich angelegt. Fixation nach EHRLICH auf der heißen Metallplatte, Färben mit BORRELschem Karbolthionin.

Bei dieser Versuchsanordnung sieht man ohne weiteres, daß die Kommabazillen schon wenige Minuten nach ihrem Eintritt in die Blutbahn von polynuklearen Leukocyten phagocytiert werden und in deren Innerem zu Körnchen zerfallen, wobei es alle möglichen Übergänge zwischen morphologisch intakten und zu einer formlosen körnigen Masse umgewandelten Vibrionen gibt. Dahingegen ist es schlechterdings unmöglich extrazellulär auch nur Andeutungen des PFEIFFERschen Phänomens zu konstatieren: die freien Vibrionen, meist in kleinen Haufen um die BIZZOZEROschen Blutplättchen angeordnet, bleiben völlig unverändert. Kurze Zeit nach der Injektion (ca. $^1/_4$ Stunde) verschwinden sowohl Bazillen wie Leukocyten aus den peripheren Gefäßgebieten in die inneren Organe, namentlich die Lungen.

Auf Schnitten aus diesem Organ (Sublimathärtung, Thionin) sieht man zahlreiche Gefäßthromben, hauptsächlich aus Leukocyten bestehend, die, zum Teil agglutiniert, ganze Häufchen in körniger Umwandlung begriffener Vibrionen einschließen.

Zu gleichen Ergebnissen gelangt man, wenn man, statt die eben angegebene Methode zu befolgen, normalen Tieren Choleravibrionen injiziert, die mit spezifischem Ambozeptor sensibilisiert worden sind.

Alle diese Versuche erweisen aufs klarste, daß der normale Blutstrom kein freies Komplement führt. Wäre es anders, so müßte beim immunisierten Meerschweinchen, dessen Blut ganz außerordentlich große Mengen des spezifischen Zwischenkörpers enthält, extrazelluläre Körnchenbildung sich nachweisen lassen. Beim Versuch mit sensibilisierten Vibrionen und normalen Tieren bedingt die intravenöse Injektion eine geringgradige Leukolyse in den inneren Organen, vornehmlich den Lungen;

daher sehen wir in diesen Bezirken Körnchenbildung auch außerhalb der weißen Blutkörperchen, da eben lokal geringe Komplementmengen zur Verfügung stehen.

Die künstliche Immunität gegen Cholera muß nach diesen Befunden unter den Gesichtspunkten der cellularen Immunität betrachtet werden. Nicht die reichliche Bildung frei zirkulierender Antikörper an sich ist die wesentliche Schutzeinrichtung, sondern die im begünstigenden Sinne lebhafte avide Freßtätigkeit der Wanderzellen. Es ist übrigens bekannt (Metschnikoff), daß Organismen eine Cholerainfektion überstehen können, ohne daß das Pfeiffersche Phänomen dabei überhaupt auftritt resp. eine Rolle spielt (s. Kraus, Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 26).

Auf den Mechanismus der künstlichen Typhusimmunität näher einzugehen, liegt kein besonderer Grund vor, da die Dinge sich hier im wesentlichen ebenso verhalten, wie bei der eben geschilderten Cholerainfektion (Wassermann[222]), Besredka[10])).

Hingegen verlohnt es sich, einen Blick auf die Verhältnisse bei künstlicher Immunität gegen solche Spaltpilze zu werfen, die keine bakteriolytischen Stoffe bilden.

Der Erreger des Schweinerotlaufs ist für Kaninchen äußerst pathogen; es gelingt jedoch bei Anwendung besonderer Vorsichtsmaßregeln diese Tiere gegen Schweinerotlauf für einige Zeit zu immunisieren. Über den Mechanismus dieser Immunität existiert eine ganze Reihe von Arbeiten, die teils vom cellulären, teils vom humoralen Standpunkt ausgehen. Vor allem ist gefunden worden, daß das Serum immuner Tiere nicht immunisierten eine absolute, wenn auch rasch vorübergehende Resistenz verleiht. Dieser Umstand ist von Emmerich und di Mattei, Emmerich und Mastbaum in dem Sinne gedeutet worden, daß die in Frage stehende Immunität eine eventuell humorale sei, daß also die Zerstörung resp. der Untergang der Erreger im Tierkörper das Werk baktericider Substanzen sei. Vor allem stützten die genannten Autoren ihre Ansicht auch auf das völlige Fehlen phagocytärer Prozesse an der Impfstelle, sowie auf die Schnelligkeit mit der die Bazillen aus dem Kreislauf verschwinden. (In seiner ersten Veröffentlichung gab Emmerich die hierfür notwendige Zeit auf wenige Minuten an; später hat er sie verlängert, im Maximum sollen nach 8 Stunden alle Keime verschwunden sein). Eine so rasche Vernichtung durch Phagocytose sei nicht denkbar; also bliebe per exclusionem nur die Annahme übrig, daß die Bazillen durch die Wirkung der Körpersäfte abgetötet und aufgelöst würden.

Metschnikoff[147]) hat das Irrige dieser Auffassung ausführlich begründet. Vor allem beweist das Tempo des Verschwindens der Bakterien aus der Blutbahn gar nichts für den Mechanismus, der ihm zugrunde liegt. Phagocytäre Vorgänge können sich, wie die oben ausführlich zitierten Versuche in vitro und die Injektionsversuche von Bordet und Levaditi zeigen, mit ganz unglaublicher Schnelligkeit abspielen. Andererseits läßt sich mit einfachen Mitteln nachweisen, daß im Gewebe immunisierter Kaninchen eingebrachte Schweinerotlaufbazillen ausschließlich auf dem Wege der Phagocytose eliminiert respektive zerstört werden. Es genügt hierfür einige mit Schweinerotlaufkultur beschickte Zieglersche Kammern unter die Haut eines immunisierten Kaninchens zu bringen und sie in bestimmten Intervallen zu untersuchen.

Methode der Zieglerschen Kammern. Zwei kleine Deckgläschen werden mit Siegellack so aufeinandergekittet, daß zwischen ihnen

ein kapillarer Spalt entsteht, in den man etwas Bouillonkultur von Schweinerotlauf bringt; diese Kammern werden unter die Haut eines Kaninchens eingeführt, nach verschiedenen Zeitabschnitten wieder herausgeholt und untersucht.

Die hierbei zu beobachtenden Vorgänge schildert METSCHNIKOFF[136]) wie folgt: „Bei der Impfung in die vordere Kammer sowohl wie beim Einspritzen unter die Haut riefen die Bazillen die Bildung eines sehr leukocytenreichen Exsudates hervor, in dem die Mikrophagen das Bild beherrschten. Diese Phagocyten begannen sofort, sich der vorhandenen Bazillen zu bemächtigen; letztere zerfielen in der Exsudatflüssigkeit nicht, wohl aber im Innern der Leukocyten. Noch längere Zeit nach dem definitiven Einschluß der Bazillen (24 Stunden nach der Infektion und länger) lieferten Aussaaten des Exsudats auf geeigneten Nährböden häufig noch Kulturen*)."

Ist somit einerseits experimentell erwiesen, daß Schweinerotlaufbazillen im immunisierten Tierkörper der Phagocytose unterliegen, so harrt andererseits das Vorkommen spezifischer bakterizider Stoffe im Serum solcher Tiere noch der endgültigen Sicherstellung. In einer 1896 erschienenen Arbeit hat VOGES[216]) das bakterizide Vermögen von Antiserum gegen Schweinerotlauf in vitro eingehend untersucht, nachdem er sich überzeugt hatte, daß die völlige Abtötung der Schweinerotlaufbazillen im Körperinnern von Tauben, die mit diesem Serum gespritzt worden waren, erst nach einer gewissen Zeit erfolgt. VOGES ging so vor, daß er 1. unverdünntes Immunserum, 2. verschiedene Verdünnungen desselben mit physiologischer Kochsalzlösung resp. Bouillon, 3. zur Kontrolle Normalserum der gleichen Tierart, von der das Immunserum stammte, mit Schweinerotlauf impfte und unter gleichen Verhältnissen beobachtete. Es stellte sich heraus, daß die Verdünnungen keinen Unterschied gegenüber den Kontrollen aufwiesen; die Entwicklung im reinen Immunserum ging etwas langsamer vor sich. Aber da dies gegenüber Kulturen in unverdünntem Normalserum gleichfalls zu keinerlei Unterschieden führte, so schließt VOGES, „daß von einer spezifisch Bakterienentwicklung hemmenden Eigenschaft meiner Immunsera nicht die Rede sein kann, und muß die etwa eintretende Entwicklungshemmung lediglich als im Sinne der Alexineinwirkung gedeutet werden."

Später ist VOGES im Verein mit W. SCHÜTZ[217]) auf die Frage der bakteriziden Eigenschaften des Schweinerotlaufserums nochmals zurückgekommen und zu dem entgegengesetzten Resultat, wie bei seiner ersten Veröffentlichung gelangt. Die Beweise, die er für seine neue Anschauung ins Feld führt, sind jedoch durchaus nicht überzeugend, wie wir gleich sehen werden. Vor allem macht VOGES darauf aufmerksam, daß man große Mengen von Bazillen überimpfen muß, wenn die Kulturen auf Immunserum angehen sollen, da die ersten ausgesäten Bazillen durch die spezifischen Stoffe des Antiserums abgetötet würden. Immerhin anerkennen VOGES und SCHÜTZ[217]), daß „zu dieser Vernichtung aber mehrere Stunden erforderlich waren, ganz im Gegensatz zu der Wirkung des Cholera- und Typhusserums, welches die Typhus- und Cholerabakterien schon in ganz kurzer Zeit, höchstens in einer Stunde, vernichtet**)". Ganz abgesehen davon, daß die Autoren nicht angeben, wie sich Kontrollkulturen auf Normalserum verhalten, ist es an sich schon sehr fraglich,

*) l. c. pag. 249.
**) l. c. pag. 93.

ob es sich, angesichts der äußerst langsam erfolgenden Abtötung der Bazillen, überhaupt um eine spezifische, eine Funktion des Immunserums darstellende Wirkung handeln kann.

Ebensowenig einleuchtend wie der eben angeführte ist ein weiterer von Voges und Schütz versuchter Beweis für die Existenz eines bakteriziden Antikörpers gegen Schweinerotlauf: sie bringen in ein abgemessenes Quantum von Schweinerotlaufserum, dessen Präventivtiter für Mäuse = 0,03 ccm bestimmt wurde, Schweinerotlaufbazillen, töten nach einiger Zeit die letzteren durch Erhitzen ab und bestimmen aufs neue den Titer des so behandelten Serums. Es zeigt sich, daß er nicht mehr 0,03 sondern 0,05 ccm beträgt, woraus Voges und Schütz schließen: „dieser Verlust kann nur dadurch bedingt gewesen sein, daß Antikörper zur Abtötung der ausgesäeten Rotlaufbazillen verbraucht waren*)". Dieser Schluß erscheint durchaus unbegründet. Der Verlust des Schutzvermögens ist einfach auf die Fixierung von Ambozeptoren oder des von Bordet und Gengou[20]) in derartigen Immunseris nachgewiesenen spezifischen Schutzkörpers durch die Bazillenleiber zurückzuführen.

Überdies haben Untersuchungen von Mesnil[135]) aus dem Metschnikoffschen Laboratorium ergeben, daß Immunserum gegen Schweinerotlauf auf die gleichnamigen Bazillen lediglich agglutinierend wirkt; von einer spezifisch bakteriziden Einwirkung ist nicht die Rede. Befreit man solche Bazillen, die auf Immunserum gewachsen sind, durch Zentrifugieren oder Filtrieren von ihrem Kulturmilieu, so erweisen sie sich im Tierversuch als genau ebenso virulent, wie Kontrollkulturen auf den üblichen Nährböden.

Die künstliche Immunität gegen Rotlauf ist also ein weiteres Beispiel dafür, daß Immunität auch dort vorhanden sein kann, wo bakterizide und bakteriolytische Stoffe gänzlich fehlen und also wiederum ein Beispiel für erworbene Resistenz auf rein phagocytärer Grundlage.

Es wäre ein Leichtes, diese Beispiele noch weiter zu vermehren und etwa die erworbene Immunität gegen Milzbrand**) und gegen Bac. pyocyaneus***) zu analysieren. Aber das würde uns aus dem Rahmen des vorliegenden Abschnittes hinausführen, ohne etwas für die Methodik wesentliches dem schon angegebenen neu hinzuzufügen. Nicht ganz das gleiche gilt jedoch für die sehr ausgiebig durchgearbeitete Frage der Streptokokkenimmunität, über die aus diesem Grunde doch noch einiges gesagt werden soll.

Die Immunität empfänglicher Tiere gegen Streptokokken kann auf verschiedene Art und Weise erreicht werden. Man benutzt entweder abgetötete Kulturen (Erhitzen bis 110°, Roger[179]) oder lebende Streptokokken, deren Virulenz für Kaninchen durch viele fortgesetzte Mäusepassagen sehr herabgemindert ist (Knorr[89]), oder endlich die in der Kulturflüssigkeit enthaltenen löslichen Sekretionsprodukte des Streptococcus pyogenes. Van de Velde[214]) empfiehlt für letzteres Verfahren Bouillonkulturen durch Porzellanfilter zu filtrieren; durch Erhitzen auf 120° wird das Antigen nach den Erfahrungen van de Veldes nicht zerstört. Mironow[152]) und v. Lingelsheim[114]) fangen mit Injektionen ab-

*) l. c. pag. 295.

**) Siehe hierfür: Metschnikoff[141]), Marchoux[123]), Sawtschenko[195]), Sobernheim[198]), de Nittis[160]).

***) Vgl. Wassermann[223]), Georgiewski[56]).

getöteter Kulturen an und erhöhen die dadurch angebahnte Immunität durch weitere Behandlung mit untertödlichen Dosen lebender Kultur.

So immunisierte Kaninchen zeigen eine außerordentliche Resistenz gegen Streptokokkenvirus, sei es bei subkutaner, sei es bei intravenöser Applikation. Während bei unbehandelten Kaninchen auf die Impfung mit einem virulenten Streptokokkenstamm, beispielsweise am Ohr, ein ausgedehntes Erysipel mit konsekutiver Nekrose und mitunter tödlichem Ausgang entsteht, vertragen die Immuntiere die Infektion ohne sichtbare Störungen.

Die künstliche aktive Streptokokkenimmunität ist, ebenso wie die durch prophylaktische und therapeutische Anwendung von Seris aktiv immunisierter Pferde und Kaninchen (Denys und Marchand[39]) erzeugte passive Resistenz der Gegenstand sehr ausgedehnter und sorgfältiger Untersuchngen gewesen, die vorwiegend auf die Frage hinausliefen, was an dieser Immunität Effekt der Serumwirkung, wieviel auf Rechnung der Leukocyten zu setzen ist.

Mit der Plattenmethode (Auszählen der aufgegangenen Kolonien) haben Denys und Leclef[38]) zu entscheiden gesucht, ob das Serum aktiv gegen Streptokokken immunisierter Tiere überhaupt bakterizide Eigenschaften besitzt. Sie stellen fest, daß, während normales Kaninchenserum ein vorzüglicher Nährboden ist, die Entwicklung der Kokken im Immunserum bis zu einem gewissen Grade gehemmt erscheint. Aus den Versuchsprotokollen geht indes ohne weiteres hervor, daß es sich hier um etwas ganz anderes handelt, als um eine — etwa der des Typhus- oder Choleraserums analoge — bakterizide Wirkung: die Kokken entwickeln sich lediglich etwas langsamer als sonst, im übrigen aber durchaus regelmäßig und in der üblichen Weise. Dieser leichte wachstumhemmende Einfluß des Immunserums ist überdies keine konstante Erscheinung; nach Denys und Marchand[40]) fehlt sie z. B. beim Immunserum von Pferden vollständig.

Roger[197]), der sich ebenfalls mit dieser Frage beschäftigt hat, fand bei Experimenten in vitro, daß es unmöglich ist, auch nur den kleinsten Einfluß von Immunserum auf Streptokokken im Sinne der Bakterizidie oder Bakteriolyse mit Sicherheit nachzuweisen. Da aber Tiere, die Immunserum und Virus in geeigneter Mischung gleichzeitig injiziert bekommen, dennoch der Infektion erfolgreich Widerstand leisten, schließt Roger, daß das Immunserum die Virulenz der Streptokokken herabsetzt. Diese Anschauung ist von Bordet[16]) widerlegt worden. In Übereinstimmung mit voraufgegangenen Erfahrungen Metschnikoffs mit Schweinerotlauf hat Bordet feststellen können, daß es durchaus nicht eine Virulenzschwächung der Kokken durch das Immunserum ist, die die Infektion wirkungslos macht, sondern die Anwesenheit dieses Serums selber und in direkter Weise im Sinne einer Präventivwirkung. Trennt man nämlich durch Zentrifugieren oder über dem Porzellanfilter Bakterien und Serum und injiziert erstere allein, in gleicher Menge wie vorher, so geht das Versuchstier prompt ein — ein Beweis dafür, daß die Virulenz durch den Kontakt mit Immunserum keineswegs gelitten hatte.

Daß die Antistreptokokkensera bakterizid wirken, ist nach allem Gesagten nicht als einwandfrei erwiesen zu betrachten. Die Befunde von Denys und Leclef können als absolut beweiskräftig oder auch nur sehr für die Existenz bakterizider Stoffe im Versuchsserum sprechend nicht herangezogen werden, da die Versuche der belgischen Autoren

möglicherweise Fehlerquellen enthalten. Wie v. Lingelsheim[114])*) ganz richtig eingewendet hat, kann der Umstand, daß Streptokokken auf Serum in mehr oder weniger langen Ketten wachsen, dazu führen, daß relativ weniger Kolonien angehen als im Kontrollversuch. Denn ob die Ketten nun kurz oder lang sind — d. h. ohne Rücksicht auf die als Maßstab für die Entwicklungsenergie anzusehende Zahl der Einzelkokken — liefert jede Kette immer nur eine Kolonie. Das Plattenzählverfahren kann also aus diesem Grunde zu ganz beträchtlichen Irrtümern führen.

v. Lingelsheim schlägt deshalb folgendes Verfahren vor, um die entwicklungshemmende Einwirkung von Antiserum auf Streptokokken in befriedigender Weise quantitativ zu bestimmen.

Methode: Bekanntlich entwickelt der Streptococcus als Stoffwechselprodukt unter anderem ein sehr wirksames Hämolysin. Bei Aussaat auf Kaninchenblut z. B. beginnen die Erythrocyten sehr bald sich aufzulösen, das Hämoglobin wird frei, das Blut als ganzes lackfarben. Der gleiche Vorgang spielt sich auch bei der Infektion in vivo ab und das Blut an Streptokokkensepsis zugrunde gegangener Kaninchen erweist sich bei der Sektion ganz oder nahezu vollständig hämolysiert.

Die Methode von v. Lingelsheim besteht nun darin, daß vergleichende Kulturen von dem gleichen Streptokokkenstamm sowohl auf Blut**) von immunisierten, wie auch von normalen Tieren angelegt werden. Der Grad der Hemmung der Hämolyse ist von zwei Faktoren abhängig: erstens vom Grade der Immunität des Tieres von dem das Blut in dem betreffenden Röhrchen stammt; zweitens von der Virulenz des ausgesäten Stammes. Während so im Normalblutröhrchen nach einiger Zeit die Hämolyse komplett ist, bleibt das Immunblut entweder ganz oder teilweise ungelöst.

v. Lingelsheim schließt aus seinen Versuchen, daß das Serum aktiv gegen Streptokokkus immunisierter Tiere in der Tat entwicklungshemmend auf diese Kokkenart wirkt.

Seine Beweisführung ist jedoch aus einem sehr gewichtigen Grunde durchaus nicht überzeugend. Die hämolytisch wirkenden löslichen Stoffwechselprodukte verschiedener Mikroorganismen, auf welchen deren Wirkung auf die roten Blutkörperchen in der großen Mehrzahl aller bekannten Fälle beruht (Bakterienhämolysine: Vibriolysin, Staphylolysin usw.), bilden bei Injektion in geeignete Organismen spezifische Antikörper, nach Analogie mit den Antitoxinen. Dies ist in gleicher Weise der Fall bei den mit Streptokokkenkulturen gespritzten Tieren: auf der Höhe der Immunisierung enthält ihr Serum neben anderen Antikörpern auch einen gegen das in der Kultur vorhanden gewesene Hämolysin. Die Hemmung der Hämolyse in den Röhrchen mit Immunblut erklärt sich somit einleuchtend aus einer spezifischen Bindung der hämolytischen Gruppen der Kultur durch das Antihämolysin des Immunblutes.

Damit ist die Reihe der vermeintlichen Beweise für die Existenz bakterizider Körper im Streptokokkenantiserum erschöpft: wir sehen, daß sie alle einer sorgfältigen Kritik nicht standhalten. Fehlen aber dem Serum resp. dem Blute der Immuntiere bakterizide und entwicklungshemmende Eigenschaften, so muß der Grund für die Immunität anderswo gesucht werden und in erster Linie steht wieder die Frage, welche Rolle die Wanderzellen dabei spielen.

---

* v. Lingelsheim[114]) pag. 74. Bekanntlich kann durch gleichzeitige Agglutininwirkung das Plattenverfahren insofern zu Irrtümern Anlaß geben, als dann natürlich sehr viel weniger Kolonien aufgehen als ohne jenen Umstand.

**) Das Blut wird durch Zusatz von Natriumcitrat flüssig erhalten.

Die ersten vergleichenden Untersuchungen über das Verhalten von Leukocyten gegenüber Streptokokken bei immunisierten und normalen Tieren sind von DENYS und LECLEF[38]) veröffentlicht worden. Sie impften Normal- und Immunkaninchen unter die Haut des Ohres und kontrollierten die Reaktion an der Injektionspforte durch wiederholtes Punktieren des sich bildenden Ödems. Sie fanden dabei, daß beim normalen Tier die Kokken sich rapide vermehren, ohne daß die vorhandenen Leukocyten sich ihrer bemächtigen. Beim Immuntiere dagegen fehlt die Vermehrung vollständig: die meist zu den multinuklearen gehörenden Leukocyten stürzen sich mit großer Avidität auf die Streptokokken, phagocytieren und vernichten sie in kurzer Zeit, so daß das Virus sehr bald gänzlich verschwindet, während beim Kontrolltiere alles davon überwuchert ist. Die Gewebe des immunisierten Tieres befreien sich also von den eingebrachten Streptokokken auf dem Wege der Phagocytose.

Durch Reagenzglasversuche haben DENYS und LECLEF die Bedingungen, die dabei in Frage kommen, etwas näher festzustellen versucht. Es ergab sich aus diesen Untersuchungen, daß sowohl Leukocyten von Immun-, wie solche von Normaltieren in Anwesenheit von Antistreptokokkenserum Streptokokken aufs lebhafteste phagocytieren; während die gleichen Leukocyten in Normalserum dies nur in sehr geringem Grade tun. In bezug auf phagocytäre Kapazität existiert somit kein Unterschied zwischen den Leukocyten immunisierter und normaler Organismen. Das entschiedenste ist vielmehr, wie aus der Versuchsanordnung von DENYS und LECLEF hervorgeht, die gleichzeitige Anwesenheit des spezifischen Antiserums.

Alles in allem erscheint also die Resistenz immunisierter Tiere gegen Streptokokken als das Resultat ausgesprochener phagocytärer Vorgänge. Der Einwand, daß dies möglicherweise nur für eine Tierart (Kaninchen) gelten könnte, für andere eventuell auch anderweitige Erklärungen zulässig seien, wird durch die Untersuchungen von SALIMBENI[186]) hinfällig, der sich durch Streptokokkenimpfungen an hochimmunen Pferden gleichfalls von der überwiegenden Bedeutung der Leukocyten überzeugen konnte. Die Virulenz des verwendeten Streptokokkenstammes war sehr hoch: $^1/_{100000}$ ccm Bouillonkultur tötete in subkutaner Injektion ein Kaninchen von 2 kg Gewicht innerhalb 20—26 Stunden. Das hochimmunisierte Versuchspferd lieferte ein Serum, von dem schon 1 ccm die 100fach tödliche Dosis des bezeichneten Virus unwirksam machte. SALIMBENI brachte unter die Haut dieses Pferdes 2 ccm seiner Streptokokkenkultur und untersuchte fortlaufend die Vorgänge an der Impfstelle. 6—8 Stunden nach der Injektion war ein Zufluß von mononuklearen Leukocyten (Makrophagen) festzustellen, die sehr bald die eingebrachten Streptokokken zum größten Teil eingeschlossen hatten. Aber auf diese erste Phase folgte rasch eine zweite, in der die Makrophagen zugrunde gingen, so daß die Kokken wieder frei wurden und weiterkeimten. Erst nach 3—4 Tagen stellten sich Mikrophagen (polynukleare Leukocyten) in großer Menge ein; sofort setzte eine lebhafte Phagocytose ein, die erst mit dem Verschwinden sämtlicher Infektionserreger ihren Abschluß fand.

Auf die Langsamkeit dieser Vernichtungsprozesse bei immunisierten Pferden macht SALIMBENI durch Kontrollaussaaten des Exsudats noch besonders aufmerksam: 5—6 Tage nach der Impfung des Tieres gingen aus der Exsudatflüssigkeit noch Streptokokkenkolonien auf.

Auf Grund der nachweisbaren Vernichtung des eingeführten Kokkenmaterials durch Leukocyten einerseits, des Umstandes, daß die nicht

phagocytierten Bakterien nie irgendwelche morphologischen oder tinktoriellen Veränderungen darboten, andererseits, schließt auch Salimbeni, daß die erworbene Immunität gegen Streptococcus pyogenes in erster Linie als phagocytär angesehen werden muß.

Die Aufgabe, einen orientierenden Überblick über die Zusammenhänge zwischen Phagocytose und erworbener Immunität zu geben, darf hiermit als beendet angesehen werden. Die in vorstehendem Abschnitt gewürdigten Beiträge zu diesem Thema ließen sich noch um eine ganze Reihe weiterer Befunde vermehren. Wie es sich aber dabei immer nur um eine auf andersartige Infektionserreger bezügliche Variante schon mehrfach wiederholter Schlußfolgerungen handeln kann, so ergeben sich aus diesen Versuchen keinerlei neue methodische Gesichtspunkte, die als besonders fruchtbar irgendwie in Betracht kämen, so daß hier auf die zahlreichen Arbeiten über Immunität gegen Pneumokokken*), Staphylokokken**), Spirillen u. a. mehr nicht eingegangen werden soll.

Dagegen mögen am Schluß des ganzen Abschnittes einige kurze Bemerkungen über den Mechanismus der Phagocytose von einem allgemeinen Gesichtspunkte aus ihren Platz finden.

Über den Mechanismus der phagocytären Reaktion; Chemotaxis.

Bei jedem als Phagocytose zu bezeichnenden Vorgang lassen sich ohne weiteres drei Phasen unterscheiden: a) die Phase der Annäherung des Leukocyten an den zu phagocytierenden Körper (Bakterien, Zellen oder Zelltrümmer); b) die eigentliche Phagocytose, d. h. die Einschließung des phagocytablen Objekts in das Innere des Leukocyten, die durch Ausstrecken von Pseudopodien, durch eine Art Umfließen des Objekts bewirkt wird; c) die intracelluläre Verdauung des Zelleinschlusses durch die vom Protoplasma sezernierten digestiven Fermente. Da diese letzte Phase schon an anderer Stelle des vorliegenden Werkes besprochen wird, haben wir hier nur die beiden ersten näher ins Auge zu fassen.

Chemotaxis und Phagocytose. Der Umstand, daß in einem geschlossenen Raum Bakterien und andere Fremdkörper von Leukocyten aufgenommen werden, wenn sie in unmittelbare Berührung mit ihnen kommen, hat dem Verständnis keine Schwierigkeiten gesetzt, indem man die Tatsache in einfachster Weise als Ausdruck einer taktilen Sensibilität des Leukocyten erklärte, die ja ihrerseits durch Versuche von Ranvier[177]), später von Massart und Ch. Bordet[127]) und durch Woronin[233]) bekannt geworden ist.

Dank dieser Sensibilität, heften sich die Leukocyten, sobald sie mit einem festen, resistenten Körper in Berührung kommen, an diesen fest, entsenden Protoplasmafortsätze (Pseudopodien) und suchen eine möglichst große Kontaktoberfläche mit dem sie erregenden Fremdkörper herzustellen.

Methode für den Nachweis der taktilen Sensibilität der weißen Blutelemente. Ein Tröpfchen Froschlymphe aus dem Lymphsack oder der Pleuroperitonealhöhle wird auf ein sauberes Deckgläschen

*) Siehe Issajew[73]) und Mennes[131]).

**) Siehe hierüber das Kapitel Leukocidin, Bd. I, pag. 222.

gebracht und letzteres mit Vaseline so auf einen hohlgeschliffenen Objektträger geklebt, daß eine kleine feuchte Kammer entsteht. Im Mikroskop sieht man nun, daß die im Innern des Lymphtropfens schwimmenden Leukocyten ihre gewöhnliche rundliche Form beibehalten; während die am Rande des Tropfens oder an seiner freien Oberfläche befindlichen sich ausbreitend Protoplasmafortsätze entsenden und so die bizarrsten Formen annehmen können.

Die Ausbreitungserscheinungen vonseiten des Leukocytenprotoplasmas an den Rändern des Tropfens sind die Folge ebenderselben Sensibilität der Leukocyten, auf Grund derer sie „eine möglichst große Kontaktfläche mit dem jeweiligen Excitans (in diesem Falle dem Deckglas) herzustellen suchen“ (Massart und Bordet[127]*)); und das gleiche gilt für die freie Oberfläche des Tropfens, wo nach Plateau und v. Mensbrugghe, um unter vielen nur diese zwei Namen herauszugreifen, eine hohe Oberflächenspannung herrscht. Letzteres wird noch durch einen von Massart und Bordet angegebenen Versuch ganz besonders schön verdeutlicht: setzt man die erwähnte Oberflächenspannung künstlich herab, indem man eine Spur Öl auf den Tropfen bringt, so findet ein Ausbreiten des Leukocytenprotoplasmas hier nicht mehr statt.

Wenn somit bei unmittelbarer Nähe des Objektes eine plausible Erklärung für dessen Einschluß durch Phagocyten sich ohne weiteres darbietet, ist es wesentlich schwieriger zu entscheiden, weshalb unter bestimmten Umständen Leukocyten von ganz entfernten Punkten zu einer Infektionspforte gleichsam hingezogen werden, und sich schließlich um die eingedrungenen Fremdkörper — im weitesten Sinne dieses Wortes — in großen Mengen anzuhäufen. Untersuchungen von Leber, sowie von Massart und Bordet machen es in hohem Grade wahrscheinlich, daß hierfür die Chemotaxis in erster Linie verantwortlich gemacht werden muß. Man versteht darunter im weiteren Sinne, mit Pfeffer, eine ausgesprochene Empfindlichkeit des lebenden Protoplasmas gegen die verschiedensten chemischen Körper. In unserem speziellen Fall werden, nach der jetzt allgemein eingebürgerten Theorie, die Leukocyten aus den Gefäßen resp. ihren Bildungsstätten herausgelockt durch bestimmte Stoffwechselprodukte der eingedrungenen Bakterien selber. Es würde demnach den weißen Blutelementen neben der taktilen auch eine ausgeprägte bakteriochemische Sensibilität zukommen.

Ohne an dieser Stelle auf die sehr umfangreiche Literatur über die chemotaktische Sensibilität tierischen und pflanzlichen Protoplasmas näher eingehen zu wollen, sei an den sogenannten „Hydrotropismus“ ([138]) der Myxomycetenplasmodien erinnert. Befindet sich z. B. ein solches Plasmodium an einer vertrockneten Stelle eines Planzenblattes, so verändert es diesen Platz und siedelt sich an einer feuchten Partie desselben oder auf einem anderen Blatte an.

Dieser „positive Hydrotropismus“ macht während der Sporulation des Plasmodiums einem ebenso ausgesprochenen „negativen“ Platz: die Plasmodien trachten dann umgekehrt, an möglichst trockene Stellen zu kommen.

Stahl[199]) und Pfeffer[166]) haben an Myxomyzetenplasmodien und Pflanzenspermatozoiden gezeigt, daß diese Zellen sogar ein weitgehendes

*) l. c. pag. 126.

Unterscheidungsvermögen für gewisse Lösungen haben, so daß sie sich z. B. äußerst energisch in der Richtung eingebrachter Nährflüssigkeit hin bewegen, während sie Rohrzucker und verschiedene Salze vermeiden. Diese beiden entgegengesetzten Verhaltungsarten werden nach Pfefeer als „positive“ und „negative“ Chemotaxis unterscheiden.

In das Gebiet der Entzündung und Phagocytose ist die Chemotaxis durch Leber[95]) eingeführt worden. Er wies als erster nach, daß die jede Entzündung begleitende Diapedese der weißen Blutkörperchen auch durch andere Körper, als Bakterien, hervorgerufen wird, beispielsweise durch lösliche Kupfer- und Quecksilbersalze. Ferner injizierte er abgetötete Staphylokokkenkulturen in die vordere Augenkammer und stellte fest, daß auch unter diesen Umständen große Mengen von Leukocyten sich daselbst anhäuften. Mehr noch: wässerige Extrakte sowie Alkoholausfällungen von Staphylokokkenkulturen rufen nach diesen Untersuchungen ebenfalls Diapedese hervor, womit erwiesen war, daß Bakterienstoffwechselprodukte sehr wohl positiv chemotaktisch auf Leukocyten wirken können.

Eine sehr elegante Versuchsanordnung Lebers besteht darin, daß kleinste Glaskapillaren mit der Flüssigkeit, deren Chemotaxis man zu untersuchen wünscht, in die vordere Kammer eines Kaninchens eingeführt und nach einiger Zeit untersucht werden. Das aus Streptokokkenextrakten gewonnene kristallinische leicht lösliche „Phlogosin“ wirkt bei dieser Versuchsanordnung (in destilliertem Wasser gelöst) so stark chemotaktisch, daß nach kurzer Zeit die ganze Kapillare mit Leukocyten vollgepfropft ist.

Die Befunde Lebers sind von Massart und Bordet nachgeprüft und nach mancher Richtung hin erweitert, namentlich auch für die Immunitätslehre sehr in Betracht gezogen worden.

Methode von Massart und Bordet für Chemotaxisstudien. Von verschiedenen Bakterienarten (z. B. Staphyl. alb., Bac. typhi, Bac. cholerae gallinarum, Bac. anthracis u. a.) werden Kulturen auf folgendem Nährboden angelegt:

Aq. destill.	100,0
NaCl.	0,65
Glukose	1,0
Pepton	2,0
Natr. bicarbon. bis zur leichten Alkaleszenz.	

Wenn die Kulturen üppig entwickelt sind, werden sie in kleine sterile Glaskapillaren aufgesogen, die zur besseren Einstellung im Mikroskop etwas flachgedrückt sein können, und diese Röhrchen Fröschen in den Peritonealsack eingeführt. Nach 24 Stunden wird das Tier getötet und der Inhalt der Kapillaren mikroskopisch untersucht. Will man statt lebender Bakterien, ihre Stoffwechselprodukte auf Chemotaxis untersuchen, so werden die Kulturen durch Erhitzen abgetötet, zentrifugiert und die Röhrchen mit der keimlosen resp. keimarmen Flüssigkeit beschickt.

Mit dieser Methode ist von Massart und Bordet nachgewiesen worden, daß, während die Kulturflüssigkeit als solche keinen anziehenden Einfluß auf die Leukocyten des Versuchstieres ausübte, die verschiedenen Bakterienaussaaten, insbesondere der Staphylococcus albus, dies in hohem Maße taten. Die Leukocyten sammeln sich mehr nach den Enden der Kapillare zu an, in geringer Entfernung von der Mündung, also an einer Stelle, wo noch genügend Sauerstoff aus der Umgebung zur Verfügung steht. Zum großen Teil zeigen diese Leukocyten Einschlüsse

der betreffenden Bakterienart. Die gleichen Bilder entstehen (bis auf die zuletzt erwähnten Phagocytosefiguren), wenn statt lebender Kulturen nur deren lösliche Bestandteile oder schließlich Abbauprodukte der Proteinkörper, z. B. Leucin, untersucht werden.

Massart und Bordet haben ferner gezeigt, daß man die Chemotaxis paralysieren, also das Eindringen von Leukocyten in die Kapillaren verhindern kann, wenn man das Versuchstier (Frosch) in fünffach verdünntes Chloroformwasser oder in 0,25—0,5 % Paraldehydlösung bringt und dadurch die Leukocyten anästhetisch macht.

Aus den Versuchen von Massart und Bobdet geht hervor, daß die Stoffwechselprodukte mancher Bakterien positiv chemotaktisch wirken, die anderer negativ, so daß letztere die weißen Blutkörperchen abstoßen und auf diese Weise der Gefahr, phagocytiert zu werden, entgehen. Daraus folgern die genannten Autoren in Übereinstimmung mit Metschnikoff, daß die Empfänglichkeit tierischer Organismen für Infektionen sich nach der Art der chemotaktischen Reizbarkeit ihrer Leukocyten richtet.

Virulente Mikroorganismen, solche also, die unter Umständen tödliche Infektionen setzen, verhalten sich negativ chemotaktisch gegen die Leukocyten der betreffenden Tierart; während andere, die kraft der natürlichen oder erworbenen Immunität des Organismus für diesen unschädlich sind, umgekehrt eine positive Chemotaxis ausüben (Metschnikoff). Woraus folgt, daß im ersteren Falle keine oder höchstens schwache Phagocytose stattfindet, im zweiten dagegen die Einschließungs- und die intrazellulären Verdauungsprozesse mit größter Intensität ablaufen. Nach Metschnikoff geht bei der aktiven Immunisierung die negative Chemotaxis in eine positive über.

Die aus solcher Anschauung resultierende „chemotaktische Theorie der Immunität" ist von vielen Seiten angegriffen werden, namentlich von Werigo[226]), dessen Versuchsanordnung darin bestand, daß er bei normalen und immunisierten Kaninchen größere Mengen Hühnercholera- und Milzbrandkultur direkt in den Kreislauf einbrachte, die Tiere nach wenigen Minuten tötete und die inneren Organe untersuchte. Er stellte auf diese Weise fest, daß auch bei Normaltieren, die einer derartigen Infektion unbedingt erliegen, in Leber und Milz und besonders in den Lungen Phagocytose stattfindet, woraus er den Schluß zieht, daß danach von einer negativen Chemotaxis nicht die Rede sein kann, weil auch bei diesen tödlichen Infektionen ein Teil der Infektionserreger dennoch von Freßzellen eingeschlossen wird.

Die Schlußfolgerung Werigos hält indessen der Kritik nicht stand. Erstens ist nach seinen eigenen Angaben die Phagocytose in den inneren Organen, sowie die Menge der dort (Leber und Milz) aufgespeicherten Leukocyten bei den Immuntieren ungleich bedeutender als bei den Normaltieren. Zweitens aber erklärt sich die vorhandene schwache Phagocytose bei den letzteren sehr einfach aus dem Umstande, daß natürlich nicht alle Individuen der injizierten Kultur gleich virulent sind: die wenig lebensfähigen, wenig oder gar nicht mehr virulenten werden dann eben, da sie unter diesen Umständen auch nicht mehr negativ chemotaktisch wirken können, eine Beute der Organleukocyten, wie dies auch für andere Infektionen, z. B. Schweinerotlauf (Löffler und Schütz[117]), Koch[83]), die phatogenen Spirillosen [(Cantacuzène[24]), Levaditi[105]), Levaditi und Manouélian[111])] gezeigt worden ist. Das,

was die Infektion zu einer tödlichen macht, sind vielmehr die Nachkommen jener primären Keime der Kultur, die vermöge ihres ausgesprochenen negativ chemotaktischen Einflusses den weißen Blutkörperchen und damit der Phagocytose entrinnen. Injiziert man z. B. nach Silberberg und Zéliony Hühnercholera nicht in Form von Kulturen e vitro, sondern Peritonealexsudat von Kaninchen, die an Hühnercholeraseptikämie zugrunde gegangen sind, also ein Material, das nicht wie das erstgenannte neben hochvirulenten auch schwachvirulente Keime enthält, sondern aus lauter virulenten Individuen besteht, so fehlt jede Phagocytose vollständig. Daß dies nicht etwa an den Leukocyten liegt, davon kann man sich leicht überzeugen, indem man von mit Hühnercholera infizierten Tieren während des Versuchs eine avirulente Bakterienart, z. B. nicht pathogene Staphylokokken, injiziert: letztere werden von den Leukocyten ohne weiteres phagocytiert und eliminiert (Silberberg und Zéliony).

Ferner hat Bordet[17]) in einem klassischen Versuch die negative Chemotaxis beim Entstehen einer tödlichen Septikopyämie direkt nachweisen können. Injiziert man bei Meerschweinchen eine virulente Streptokokkenkultur ins Peritoneum, so tritt am Anfang etwas Phagocytose auf, die sich aber sehr bald erschöpft: die als Antwort auf die Infektion im Peritoneum sich ansammelnden Leukocyten phagocytieren nicht mehr; man sieht sie im Präparat direkt neben Kokkenketten liegen, ohne daß auch nur Andeutungen von Einschließungsvorgängen wahrnehmbar wären.

Die Bakterien gewinnen somit die Möglichkeit, sich ungestört zu vermehren, und so entwickelt sich schließlich eine allgemeine Sepsis. Dabei sind die Leukocyten an sich durchaus imstande, ihre phagocytäre Funktion auszuüben: injiziert man dem Versuchstier gleichzeitig mit den Streptokokken oder etwas später ein Virus, das positiv chemotaktisch ist, z. B. Proteus vulgaris, so erfolgt nach Bordet prompt Phagocytose dieser letzteren Bakterien, während die Streptokokken nach wie vor verschont bleiben.

Die Art der chemotaktischen Reizbarkeit weißer Blutzellen spielt demnach, wie aus allem Angeführten hervorgeht, die erste Rolle im Kampfe jener gegen eindringende Infektionserreger. Sie erscheint als das *primum movens* für die Phagocytose und folglich als eine der Grundursachen natürlicher und erworbener Immunität. Künstliche antibakterielle Immunität bedeutet nach Metschnikoffs Auffassung im letzten Grunde nichts anderes, als Umstimmung negativer chemotaktischer Reizbarkeit der Körperleukocyten in positive.

Eine eingehende Erörterung der möglichen Ursachen dieser Umstimmung liegt nicht im Rahmen vorliegender Ausführungen. Im Laufe der letzten Jahre hat man verschiedentlich versucht, zur Erklärung einen disponierenden Einfluß von spezifischen Ambozeptoren, oder sogar von besonderen Substanzen (sog. Opsoninen) heranzuziehen, die sich an die Bakterien verankern und sie damit „phagocytabler" machen sollen, mit anderen Worten negative Chemotaxis in positive überzuführen hätten. In einem besonderen Abschnitt über Opsonine wird diese Frage des genaueren erörtert, so daß hier nicht weiter darauf eingegangen zu werden braucht (s. Bd. II, pag. 342).

Literatur.

1) Abel, Centralbl. für Bakt. 1896, Bd. XX, pag. 761.
2) Almkvist, Virchows Archiv, Bd. CLXIX, 1. Lieferung.
3) Altmann, Über die Elementarorganismen und ihre Beziehung zu den Zellen. Leipzig 1894.
4) Babes, Untersuchung über den Leprabacillus. Berlin 1898.
5) Balfour, Lancet 1904, Nr. 4189.
6) Baumgarten, Zentralbl. für klin. Med. 1888, pag. 516.
7) Bail, Archiv für Hygiene, Bd. LII, pag. 272.
8) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1897, Nr. 41, pag. 887; Archiv für Hygiene, Bd. XXX, 348.
9) Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Vol. XII, pag. 305.
10) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Vol. XV, pag. 209.
11) Bizzozzero und Torre, Archiv für med. Wissenschaft 1880.
12) Dies., Virchows Archiv 1884, Bd. XCV.
13) Bieganski, Deutsches Archiv für klin. Med. 1894, Bd. LIII.
14) v. Behring, Centralbl. für klin. Med. 1888, Nr. 38, pag. 681.
15) v. Behring und Nissen, Zeitschr. für Hygiene 1890, Bd. VIII, pag. 412.
16) Bordet, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897, Bd. XI, pag. 177.
17) Ders., Contribution à l'étude du sérum chez les animaux vaccinés. Bruxelles 1895. Lamertin.
18) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, Tome IX, pag. 462.
19) Bordet und Gengou, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Bd. XV, pag. 129.
20) Dies., Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Bd. XV, pag. 295.
21) Buchner, Münchener med. Wochenschr. 1894, Nr. 37, pag. 717.
22) Burian und Schur, Wiener klin. Wochenschr. 1897, Nr. 6.
23) Brandenburg, Münchener med. Wochenschr. 1900, pag. 183.
24) Cantacuzène, Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Nr. 7, pag. 529.
25) Ders., Recherches sur le mode de destruction du vibrion cholérique. Paris 1894. Steinheil.
26) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Vol. XIII, pag. 529.
27) Charrin und Roger, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1890, Nr. 3, pag. 35.
28) Chantemesse und Rey, Presse med. 1899. Juillet.
29) Christmas, Nord med. Arkiv 1887, Bd. XIX, Nr. 4 (zitiert nach Metschnikoff).
30) Chetaguron, Virchows Archiv 1891, Bd. CXXVI, 1. Lieferung.
31) Couch und Lews, G., Sea-Side Studies. Edinburg und London 1853 (zitiert nach Metschnikoff).
32) Courmont und Montagnard, Journal de Physiol. et de Pathol. générales 1900, pag. 557. Juillet.
33) Courmont und Barbaroux, Journal de Physiol. et de Pathol. générales 1900, pag. 577. Juillet.
34) Dembinski, Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Bd. XIII, pag. 426.
35) Denys, Rapport sur l'adénie et la leucémie. Congr. de méd. de Lille 1899.
36) Ders., Compt. rend. du Congrès d'Hygiène et Démographie de Budapest 1894.
37) Denys und Havet, La Cellule 1894, Tome X, pag. 5.
38) Denys und Leclef, La Cellule, Tome XI. pag. 177, 1. Lieferung.
39) Denys und Marchand, Bull. de l'Académie royale de Belgique 1898. Janvier.
40) Dies., Bull. de l'Académie royale de Belgique 1896.
41) Dobrovici, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1904, Nr. 21, pag. 975.
42) Donath und Landsteiner, Wiener klin. Rundschau 1902, Nr. 40.
43) Dominici, Arch. de Méd. expérimentale 1900, Tome XII.
44) v. Dungern, Münchener med. Wochenschr. 1900, Nr. 20—28.
45) Ehrlich, Zur Geschichte der Granula. Berlin. Schumacher.
46) Ders., Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbanalytische Studie. Berlin 1885. Hirschwald.
47) Ehrlich und Lazarus, Die Anämie. Spezielle Pathologie und Therapie von Nothnagel, Wien 1898, Bd. VIII, I. Teil, 1. Lieferung. Hölder.
48) Ehrlich und Morgenroth, Berliner klin. Wochenschr. 1899, Nr. 1, pag. 6.
49) Ernst, Zieglers Beiträge 1890, Bd. VIII, pag. 203.
50) Fahr, Vichows Archiv 1905, Bd. LXXIX, 3. Lieferung.
51) Frank, Centralbl. für Bakt. 1888, Bd. IV.
52) Fränkel und Sobernheim, Hygienische Rundschau 1894.

53) Freiberg, Inaug.-Dissert. Dorpat 1902.
54) Garnier, Ann. l'Inst. Pasteur 1897, Tome XI, pag. 767.
55) Gengou, Ann. l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV, pag. 232.
56) Ghiorghiewsky, Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII, pag. 308.
57) Giemsa, Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVII, pag. 308.
58) Giorgiewics und Löwy, Monatsschr. für Chemie 1895, Bd. XVI.
59) Golovine, Zeitschr. für wissenschaftl. Mikroskopie 1902, Bd. XIX, pag. 176.
60) Gregor, Archiv für Verdauungskrankheiten 1898, Bd. III.
61) Halla, Zeitschr. für Heilkunde 1883.
62) Hahn, Archiv für Hygiene 1896, Bd. XXV, pag. 105.
63) Hankin, Centralbl. für Bakt. 1892, Bd. XII, Nr. 22—23.
64) Helly, Centralbl. für allgem. Pathol. 1906, Bd. XVII, pag. 566.
65) Hess, Virchows Archiv, Bd. CXX, pag. 890.
66) Ders., Virchows Archiv 1887, Bd. CIX, pag. 365.
67) Himmel, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV.
68) Hirschfeld, Berliner klin. Wochenschr. 1901, Nr. 40.
69) Houston, British med. Journal 1904, pag. 2282.
70) Horwitz, Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 33—35.
71) Hoek und Schlesinger, Hämat. Studien zur Kinderheilkunde. Ref. Kassowitz. Leipzig 1892.
71a) Huber, Charité Annalen, Bd. XXV.
72) Isajeff, Zeitschr. für Hygiene 1894, Bd. XVI, pag. 287.
73) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1893, Tome VII, pag. 260.
74) Israel, O., Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 18, pag. 529.
75) Ito, Allg. med. Zentralzeitung 1901.
76) Japha, Jahrbuch für Kinderheilkunde, Bd. II; Kongreß für innere Med. 1897.
77) Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1903, März.
78) Jolly, C. R., Soc. de Biologie 1898; Arch. de Méd. expérimentale 1898, pag. 621.
79) Ders., C. R. Soc. de Biologie 1900.
80) Ders., Gazette hébdomadaire de med. et de chirurg. October 1900.
81) Josué, Gazette des Hopitaux, Dezember 1900, Nr. 143.
82) Kisskalt, Zeitschr. für Hygiene 1903, Bd. XLV, pag. 1.
83) Koch, Ätiologie der Wundinfektionskrankheiten 1878.
84) Koch, Virchows Arch. 1881, Bd. LXXXVI.
85) Ders., Cohns Beitr. zur Biologie der Pflanzen 1876, Bd. II, pag. 300 (nach Metchnikoff).
86) Korschun und Morgenroth, Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 37.
87) Knecht und Appleyard, Ber. der deutschen chem. Gesellsch. 1889, Bd. XXI.
88) Knecht, Löwenthal und Rawson, Handb. der Färb. Berlin 1895.
89) Knorr, Berliner klin. Wochenschr. 1893, Nr. 29.
90) Kupffer, Arch. für mikr. Anatomie 1899, Bd. LIV, pag. 254.
91) Kurloff, Wratsch 1889, Nr. 23; 1892, Nr. 13. Siehe: Ehrlich und Lazarus[47]), pag. 58.
92) Lambotte, Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV, pag. 453.
93) Laurent, Centralbl. für allgem. Path., Bd. XI, Nr. 3—4, pag. 86.
94) Laschtchenko, Arch. für Hygiene 1900, Bd. XXXVII, pag. 290.
95) Leber, Fortschritte der Med. 1888, Bd. VI, Nr. 12, pag. 460.
96) Leclainche und Vallée, Ann. de l'Inst. Pasteur 1895, Tome IX, pag. 179.
97) Leishmann, Britisch med. Journ. 1901, Sept.
98) Leichtenstern, Wiener klin. Rundschau, 1898, Nr. 23—27.
99) Levaditi, Journ. de Physiol. et de Pathol. générales 1901, Mai, Nr. 3.
100) Ders., Congrès intern. d'Hygiène et Démographie, Bruxelles 1903.
101) Ders., Contrib. à l'étude de Mastzellen et de la Mastzellenleucocytose 1902. Paris. Naud.
102) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1906, Januar, Nr. 1.
103) Ders., Écho med. du Nord. 1906, Tome X, Nr. 26, pag. 273.
104) Levaditi, Le leucocyte et ses granulations, Collect. „Scientia“, Nr. 15—16; pag. 71. Paris 1902. Naud.
105) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1904, Tome XVIII, pag. 129.
106) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1903, Tome XVII, pag. 187.
107) Ders., Virchows Arch. 1905, Bd. CLXXX, pag. 436.
108) Ders., Bull. de l'Institut Pasteur 1905, Tome III, Nr. 19—22.
109) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV, pag. 894.
110) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Tome XVI, pag. 233.
111) Levaditi und Manouélian, Ann. de l'Inst. Pasteur 1906, Tome XX, pag. 593.
112) Lierembberger, Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 14, pag. 387.

113) v. LIMBECK, Zeitschr. für Heilk. 1890, Bd. X.
114) v. LINGELSHEIM, Arch. de Pharmacodynamie 1899, Tome VI, 1. u. 2. Lief., pag. 33.
115) LOEPER, Arch. de Méd. expérimentale 1899, pag. 724.
116) LOEFFLER, Mitt. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte 1881, Bd. I, pag. 162.
117) LOEFFLER und SCHÜTZ, Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte 1886, Bd. I, pag. 46.
118) LUBARSCH, Untersuchungen über die Ursachen der angeb. und erworb. Immunität. Berlin 1891. Hirschwald.
119) Ders., Centralbl. für Bakt. 1889, Bd. VI, pag. 481.
120) Ders., Fortschr. der Med. 1888, Nr. 4.
121) Ders., Fortschr. der Med. 1890, Februar, Nr. 3; 1890, Nr. 17.
122) MARCHAND, Arch. de Méd. expérimentale 1898, Nr. 2.
123) MARCHOUX, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897, Tome IX, pag. 805.
124) Ders. u. SALIMBENI, Ann. de l'Inst. Pasteur 1903, Tome XVII, Nr. 9, pag. 569.
125) MARINO, Ann. de l'Inst. Pasteur 1904, Tome XVIII, pag. 761.
126) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1903, Tome XVII, pag. 358.
127) MASSART et BORDET, CH., Société royale des sciences méd. et naturelles de Bruxelles 1890, Februar.
128) MAY und GRÜNWALD, Centralbl. für innere Med. 1902, Nr. 11, pag. 265.
129) MAYER, E., Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 35.
130) MAXIMOW, Zieglers Beitr. 1902.
131) MENNES, Zeitschr. f. Hyg. 1897, Bd. XXV, pag. 416.
132) MESNIL, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, pag. 352.
133) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1895, Tome IX, pag. 301.
134) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1896, Tome X, pag. 369, Juni.
135) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, Tome XII, pag. 481.
136) METCHNIKOFF, L'immunité dans les maladis infectieuses. Paris 1901. Masson.
137) Ders., Ergebnisse der allg. Pathol. LUBARSCH und OSTERTAG.
138) Ders., Die Lehre von dem Phagocyten und deren experimentelle Grundlagen. Handbuch der pathog. Mikroorg. KOLLE und WASSERMANN 1904, 18.—20. Lief., pag. 332. Jena. Fischer.
139) Ders., Zoolog. Anzeiger 1880, pag. 260; 1882, pag. 310.
140) Ders., Virchows Arch. 1884, Bd. XCVII, pag. 516.
141) Ders., Virchows Arch. 1888, Bd. CXIV, pag. 465.
142) Ders., Beitr. zur vergleichenden Pathol. der Entzündung. Internat. Beitr. für wissenschaftl. Med., Bd. II. RUDOLPH VIRCHOW gewidmet.
143) Ders., Biolog. Centralbl. 1883.
144) Ders., Virchows Arch. 1884, Bd. XCVI, pag. 177.
145) Ders., Etudes sur l'immunité; 3. Mémoire. Ann. de l'Inst. Pasteur, pag. 1.
146) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, Tome IX, pag. 433.
147) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1889, Tome III, pag. 289.
148) Ders. und SUDAKEWITCH, Ann. de l'Inst. Pasteur 1891, Tome V, pag. 1.
149) MICHAELIS, L., Deutsche med. Wochenschr. 1899, Nr. 30, pag. 490.
150) Ders., Centralbl. für Bakteriologie 1901, Bd. XXIX, Nr. 19.
151) Ders. und WOLFF, Virchows Arch., Bd. CLXVII, pag. 151—161.
152) MIRONOFF, Arch. de Méd. expérimentale 1893, Tome V.
153) MOLESCHOTT, Wiener med. Wochenschr. 1854, Nr. 8.
154) MÜLLER, H. F., Arch. für exper. Pathol., Bd. XXIX.
155) MÜLLER und RIEDER, Deutsches Arch. f. klin. Med., Bd. XLVIII.
156) NAEGELI, Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 18.
157) NAKANISHI, Münchner med. Wochenschr. 1900, Nr. 6.
158) NIETZKI, Chimie de matières colorantes. Paris 1901. Naud.
159) NIKIFOROFF, Ziegler Beitr., Bd. VIII, pag. 400.
160) DE NITTIS, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV.
161) NOCHT, Centralbl. für Bakt. 1899, Bd. XXV, Nr. 21—22.
162) NUTTAL, Virchows Arch. 1888, Bd. CXIV, pag. 466.
163) PANUM, Virchows Arch. 1874, Bd. XL, pag. 347.
164) PAPPENHEIM, Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 46.
165) PASTEUR et JOUBERT, Bull. Acad. de méd. de Paris 1878, pag. 440.
166) PFEFFER, Abhandlungen der mathem.-physikal. Klasse der k. sächsischen Gesellsch. der Wissensch. 1900, Bd. XVI, pag. 161.
167) PFEIFFER, Deutsche med. Wochenschr. 1896, Nr. 7 und 8, pag. 97 und 119.
168) PLATO, Arch. für mikr. Anat. 1900, Bd. LXI, pag. 862.
169) Ders., Münchner med. Wochenschr. 1900, Nr. 36.
170) PRÖSCHER, Virchows Arch. 1905, Bd. CLXXIX, pag. 28; Folia Haematologica 1904, Tome I, Nr. 11, pag. 638.

171) Petruschky, Untersuchungen über die Immunität des Frosches. Jena 1888.
172) Petruschky, Zieglers Beitr., Bd. III, 1888; Zeitschr. f. Hyg., Bd. VII, pag. 75.
173) Pettersson, Arch. f. Hyg. 1902, Bd. XLIII, pag. 49.
174) Pierallini, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897, Tome XI, pag. 308.
175) Podwissotsky (Mme), zitiert nach Metchnikoff (136), pag. 83.
176) Pohl, Arch. für experim. Pathol. 1889, Bd. XXV.
177) Ranvier, Traité technique d'histologie 1889, pag. 132—139.
178) Rieder, Münchner med. Wochenschr. 1892, Nr. 29.
179) Roger, C. R., Soc. de Biolog. 1891, pag. 538; 1895, pag. 124.
180) Romanowski, Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. St. Petersburg 1891; St. Petersburger med. Wochenschr. 1891.
181) Roser, Beiträge zur Biologie der niedersten Organismen. Marburg 1881.
182) Ders., Entzündung und Heilung. Leipzig 1886.
183) Rosin und Bibergeil, Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 3—4.
184) Sacharoff, Ann. de l'Inst. Pasteur 1891, Tome V, pag. 564.
185) Salimbeni, Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, Tome XII, pag. 199.
186) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, Tome XII, pag. 192.
187) Schattenfroh, Münchener med. Wochenschr. 1897, Nr. 1, pag. 4.
188) Ders., Münchener med. Wochenschr. 1897, Nr. 16, pag. 114.
189) Schleip, Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 17, pag. 635; Deutsches Archiv für klin. Med. 1904, Bd. LXXX, 1.—2. Lieferung.
190) Schmauch, Virchows Archiv 1899, Bd. CLVII, 2. Lieferung.
191) Schwarz, G., Wiener klin. Wochenschr. 1904, pag. 1173.
192) Schridde, Centralbl. für allgem. Pathologie 1905. Bd. XVI, pag. 789.
193) Sawtschenko, Arch. russes de pathol. 1900, Tome IX, pag. 578.
194) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1891, Tome V, pag. 479.
195) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1897, Tome XI, pag. 881.
196) Sawtschenko und Melkich, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV, pag. 502.
197) Sisley, Rev. générale des mat. colorantes 1900, Tome IV.
198) Sobernheim, Zeitschr. für Hygiene 1899, Bd. XXXI, pag. 110.
199) Stahl, Botanische Zeitung 1884, pag. 163.
200) Stäubli, Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 17, pag. 694.
201) Stiénon, Bull. de l'Acad. royale de Belgique 1896.
202) Sudakewitch, Zieglers Beiträge, Bd. II, pag. 129.
203) Tarassévitsch, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Tome XVI, pag. 127.
204) Tchistowitsch, Ann. de l'Inst. Pasteur 1889, Tome III, pag. 337.
205) Trapeznikoff, Ann. de l'Inst. Pasteur 1891, Tome V, pag. 362.
206) Trommsdorff, Archiv für Hygiene 1901, Bd. XL, pag. 382.
207) Türk, Vorlesungen über klinische Hämatologie. I. Teil. Wien 1904. Braumüller.
208) Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 28—29.
209) Ders., Klinische Untersuchungen über das Verhalten des Blutes bei akuten Infektionskrankheiten. Leipzig 1898.
210) Vaillard, Vincent und Rouget, Ann. de l'Inst. Pasteur 1891, Tome V, pag. 1; 1892, Tome VI, pag. 385; 1893, Tome VII, pag. 755.
211) Vaillard und Vincent, Ann. de l'Inst. Pasteur 1891, Tome V, pag. 1.
212) van de Velde, La cellule 1894, Tome X, pag. 403.
213) Ders., Centralbl. für Bakt. 1898, Bd. XXIII, pag. 692.
214) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1896, Tome X, pag. 580.
215) Versé, Medizinische Klinik 1906, Nr. 24—26.
216) Voges, Zeitschr. für Hygiene 1896, Bd. XXII, pag. 531.
217) Voges und Schütz, Zeitschr. für Hygiene 1898, Bd. XXVIII, pag. 93.
218) Voswinkel, Fortschritte der Medizin, Bd. VIII, pag. 7.
219) Wagner, Ann. de l'Inst. Pasteur 1890, Tome IX, pag. 570.
220) Wauters, Arch. de Méd. expérim. 1898, Tome X, Nr. 6.
221) Wassermann, Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVII, pag. 173.
221) Ders. Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 18; 1901, Nr. 1.
222) Ders., Zeitschr. für Hygiene 1896, Bd. XXII, pag. 263.
224) Wlassow und Sepp, Virchows Archiv 1904.
225) Weil, Compt. rend. Soc. de Biol. 1900, pag. 615—616. Juni.
226) Werigo, Ann. de l'Inst. Pasteur 1894, pag. 1; Arch. de Méd. expérim. 1898, Bd. X, Nr. 6, pag. 725; Arch. russes de Pathologie 1894.
227) Werner, Virchows Archiv 1886, Bd. CVI.
228) v. Willebrand, Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 4, pag. 57.
229) Witt, Färber. Zeitung 1890.
230) Wolff, Berliner klin. Wochenschr. 1901, Nr. 52.

Fig. 1. *Fig. 2.* *Fig. 3.* *Fig. 4.* *Fig. 5.*

Fig. 6. *Fig. 7.* *Fig. 8.* *Fig. 9.* *Fig. 10.*

Fig. 11. g

Fig. 12. g g

Fig. 13.

Fig. 14. s

Fig. 15. p g

Fig. 16. m cv cs gp cv p m m s

Fig. 17. p n g p

Levaditi del.

Verl. v. Gustav Fischer, Jena.

Lith. Anst. Julius Klinkhardt, Leipzig.

231) Ders., Zeitschr. für klin. Med. 1902, Bd. XLV, pag. 385; ebenda, Bd. LII, 3. u. 4. Lieferung.
232) Wolff und v. Torday, Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 49, pag. 1273.
233) Woronin, Centralbl. für Bakt. 1894, Bd. XVI, pag. 999.
234) Zappert, Wiener klin. Wochenschr. 1892, Nr. 34.
235) Zieler, Centralbl. für allgem. Pathol. 1906, Bd. XVII, pag. 433.
236) Ziemann, Über Malaria- und andere Blutparasiten. Jena 1898, Fischer. Centralbl. für Bakt. 1898, Nr. 25.
237) Zollikofer, Zeitschr. für wissensch. Mikroskopie 1900 (nach Türk).

Figurenerklärung zu Tafel I:

Fig. 1. Polymorphkerniger neutrophiler Leukocyt.
Fig. 2—3. Kleiner Lymphocyt.
Fig. 4. Großer Lymphocyt mit gekörntem Protoplasma (Azurgranula).
Fig. 5. Übergangsform.
Fig. 6. Eosinophiler Leukocyt (Giemsa).
Fig. 7. Neutrophiler Leukocyt (Giemsa).
Fig. 8. Mastzelle (Eosin-Methylenblau).
Fig. 9. Eosinophiler Leukocyt (Vitale Färbung mit Brillantkresylblau).
Fig. 10. Mastzelle (Färbung wie 9).

Fig. 11. Makrophage aus der Peritonealhöhle eines Meerschweinchens; Einschluß mit hämolytischem Ambozeptor beladener Meerschweinchen-Erythrocyten.

Fig. 12. Polynukleare pseudo-eosinophile Zelle aus dem Meerschweinchenperitoneum mit eingeschlossenen Erythrocyten.

Fig. 13. Makrophage der gleichen Provenienz.

Fig. 14. Polynuklearer neutrophiler Leukocyt (Mikrophage mit phagocytierten Staphylokokken).

Fig. 15. Großer Makrophage aus dem Meerschweinchenperitoneum mit eingeschlossenen Erythrocyten und neutrophilen Leukocyten.

Fig. 16. Schnitt durch die Milz eines mit Taubenblut intravenös injizierten Meerschweinchens.

m Makrophage mit phagocytierten Taubenerythrocyten; *cv* Vakuolenzellen (Kurloff); *cs* Milzzellen; *p* polynukleare neutrophile Leukocyten; *gp* Taubenerythrocyten.

Fig. 17. Myeloplaxe Zelle aus dem Knochenmark eines Meerschweinchens; intracellulär gelagerte pseudoeosinophile Leukocyten.

XVIII.

Opsonine.

Von

Dr. C. Levaditi und **Dr. A. C. Inmann**

in Paris. in London.

Einleitung.

Seit einigen Jahren hat sich das Studiengebiet der Immunitätslehre in einem, wie es scheint sehr wesentlichen Punkt erweitert: neben den vielen schon bekannten Wirkungen des Immunserums kennen wir jetzt neue, sogar spezifische Eigenschaften, die für den Prozeß der Phagocytose von großer Bedeutung sind. Streng genommen stammt ihre Kenntnis nicht so ganz aus jüngster Zeit. Die Schule von Louvain, mit Denys an der Spitze, hat bereits vor längeren Jahren darauf aufmerksam gemacht, daß die Einverleibung von Mikroorganismen durch Phagocyten bedeutend erleichtert und unterstützt wird, wenn man in die Reaktion Serum von Tieren einführt, die gegen das betreffende Virus aktiv immunisiert sind. Nachdem Bordets Untersuchungen die Konstitution der antibakteriellen und anticellulären Immunsera klargestellt hatten, versuchte Sawtschenko die Beziehungen der einzelnen Komponenten dieser Sera zur Phagocytose zu fixieren. Er arbeitete mit Rekurrensspirillen und Erythrocyten und fand*), daß der Ambozeptor (sensibiliatrice, fixateur) des Immunserums einerseits an die betreffende Mikrobenart resp. die roten Blutkörperchen, andererseits an die Leukocyten verankert wird und dergestalt zur Aufnahme jener durch diese beiträgt. Zu ähnlichen Resultaten gelangten Tarassévitsch und Levaditi. Andererseits hatte weit früher Metschnikoff den Gedanken geäußert, daß die spezifischen Sera stimulierend auf die Phagocyten wirken müßten (Stimuline).

So lagen die Dinge, als eine Reihe von Arbeiten von Wright und Douglas erschien, die sich mit dem Studium eines bis dahin unbekannten spezifischen Körpers im frischen Blutserum befaßten. Diese neue Substanz, für die der Name „Opsonine"**) vorgeschlagen wurde, sollte der ausschlaggebende Faktor für das Zustandekommen der Phagocytose sein: ohne Opsonine keine Phagocytose.

---

*) Im Verein mit Melkich.

**) Von οψωνειν = zubereiten.

Diese nahen Beziehungen zu den phagocytären Vorgängen, die sowohl in der Lehre von der angeborenen (natürlichen), als auch der erworbenen (künstlichen) Immunität einen so breiten Raum einnehmen, würden schon allein das nähere Eingehen auf die Opsonine rechtfertigen. Aber es kommt noch hinzu, daß Wright und seine Schüler das aus ihrer Lehre resultierende Prinzip praktisch angewendet haben, und zwar zur aktiven Impfung von Menschen gegen die verschiedensten Infektionskrankheiten. Ihre Methoden haben, namentlich in England so rasch Verbreitung gefunden, die damit erzielten Erfolge sollen so ausgezeichnete sein, daß sie der Nachuntersuchung und Würdigung durchaus wert erscheinen*).

Im ersten Abschnitt haben wir die Bedeutung der Opsonine, insbesondere ihre Rolle in der Immunitätslehre behandelt; der zweite enthält die von Wright und Douglas angegebene Technik.

Die vorliegende Zusammenfassung geht über den Rahmen des bloßen Referates hinaus, insofern als wir die unveröffentlichten Resultate gemeinsamen Arbeitens auf diesem Gebiete mit berücksichtigt haben und außerdem in der Lage waren, in technischer Beziehung eine ganze Reihe nützlicher und praktischer Kunstgriffe einzuflechten, die der eine von uns (Inmann) Gelegenheit hatte im Laboratorium von Wright zu erlernen.

Bedeutung der Opsonine für die Immunitätslehre.

Denys und Leclef[6]) haben als erste den Einfluß von normalem oder durch aktive Immunisierung gewonnenem Serum auf das phagocytäre Verhalten von Leukocyten gegenüber Streptokokken in vitro untersucht. Durch steigende Injektionen von Bouillonkultur eines durch zahlreiche Tierpassagen höchst virulent gemachten Streptokokkenstammes immunsierten sie eine Anzahl von Versuchstieren (Kaninchen) und untersuchten das so gewonnene Immunserum zuerst auf seine bakteriziden Qualitäten. Dabei stellte sich heraus, daß normales Kaninchenserum die Entwicklung von Streptokokken gar nicht beeinflußt, das Immunserum hingegen einen „deutlich verlangsamenden Einfluß“ auf das kulturelle Wachstum ausübt. Es handelt sich hierbei, wie die genannten Autoren übrigens selber zugegeben haben, nicht eigentlich um einen bakteriolytischen Prozeß; die Hemmung tritt nur im Anfang auf; späterhin ist das Immunserum ein genau ebenso vorzügliches Nähr- und Wachstumsubstrat, wie Normalserum. Eingehender wird diese Frage im Abschnitt Phagocytose behandelt, auf den hier verwiesen werden muß.

Da die Versuche von Denys und Leclef ergeben hatten, daß die Immunität entsprechend vorbehandelter Tiere gegen Streptokokken nicht auf der Bakterizidie ihres Serums resp. ihrer Körpersäfte beruht, wurden in der Folge neben dem Serum auch Leukocyten in die Versuchsanordnung eingeführt. Derartige Versuche ergaben nun eine opsonisierende Wirkung von Körpersäften immuner Tiere auf die phagocytäre Leistung der weißen Blutelemente.

Im einzelnen gingen Denys und Leclef so vor, daß sie in die Pleurahöhle normaler Kaninchen große Mengen abgetöteter Bouillonkulturen von Staphylokokken injizierten, die Tiere am anderen Tage töteten und nun das sehr leukocytenreiche Pleuraexsudat als Ausgangsmaterial benutzten. In einer gegebenen Menge von Immunserum einerseits und

*) Was inzwischen von verschiedensten Seiten geschehen ist.

Normalserum andererseits wurden möglichst gleichgroße Proben des Exsudats aufgeschwemmt, die Röhrchen mit minimalen Spuren einer Streptokokkenkultur beschickt und mittels des Plattenverfahrens die Entwicklung in beiden Serien kontrolliert. Es stellte sich heraus, daß schon die Kombination von Normalserum mit Normalleukocyten*) einen deutlichen hemmenden Einfluß auf die Bakterienentwicklung ausübt und daß die Stärke der Hemmung proportional der Menge der eingeführten Leukocyten ist. Weiter ergab die mikroskopische Betrachtung, daß letztere, wenigstens zu einem Teil, Kokken aufgenommen und stark verändert hatten.

Schließlich stellte sich heraus, daß die Entwicklungshemmung eine unvergleichlich viel intensivere ist, wenn man Normalleukocyten mit Immunserum kombiniert und daß in letzterem Falle nicht nur Einschluß von Mikrokokken, sondern deren völlige Zerstörung im Innern der Freßzellen erfolgt (Fig. 1).

In der weiteren Verfolgung dieses Versuchsweges gelangten die belgischen Forscher zu dem Ergebnis, daß die Steigerung der phagocytären Leistung nicht auf größere Kapazität der Leukocyten zurückgeführt werden muß, sondern — um einen Ausdruck von Wright zu gebrauchen — auf eine Opsonisierung, eine Reizwirkung des Immunserums überhaupt. Denn nicht nur Immunleukocyten, sondern auch Normalleukocyten entfalten unter dem Einfluß von Immunserum eine regere Tätigkeit, während umgekehrt beim Zusatz von Normalserum beide Arten von Zellen ganz gleich verhalten.

Fig. 1. Phagocytose von Strept. pyog. durch menschliche neutrophile Leukocyten.

Was den Mechanismus dieser eigenartigen Wirkung von Immunserum auf Phagocyten gegenüber pathogenen Mikroorganismen anlangt, kamen Denys und Leclef zu keiner ganz präzisen Auffassung, begnügten sich vielmehr mit der Aufstellung von Hypothesen. Nach Metschnikoff[23]) wirken spezifische Stoffe des Immunserums direkt stimulierend auf die Leukocyten („Stimuline"). Denys und Leclef treten, unter Bezugnahme auf eine Arbeit von Gabritschewski[8]), der diese stimulierende Wirkung von Diphtherieserum auf die phagocytären Leistungen der Leukocyten diphtherieimmuner Tiere untersuchte, dieser Anschauung entgegen und werfen die Frage auf, ob nicht spezifische Komponenten des Immunserums auf die Bakterien selbst in der Weise einwirken, daß sie die von diesen produzierten Exo- und Endotoxine neutralisieren und sie damit des Kampfverteidigungsmittels gegen die Freßlust der Leukocyten berauben.

Kurz nach den Veröffentlichungen von Denys und Leclef griff Marchand[21]) das Problem der Opsonine**) wieder auf. Er beschränkte sich nicht auf die Untersuchung einer gegebenen Streptokokkenkultur, sondern arbeitete mit zwei verschiedenen Stämmen, einem avirulenten *a* und einem höchstvirulenten *b*, dessen Dosis letalis für Kaninchen sehr

---

*) Wir bezeichnen hier und im folgenden mit Normalleukocyten solche, die aus Exsudaten normaler, d. h. nicht immunisierter Tiere stammen; der Ausdruck Immunleukocyten versteht sich danach von selbst.

**) Wir bezeichnen im folgenden mit diesem Ausdruck die Substanz, resp. die Substanzen in einem Serum, die steigernd auf phagocytäre Vorgänge wirken.

klein war (zwischen 0,000002—0,0005 ccm Bouillonkultur), um auf diese Weise festzustellen, ob und wie ein solcher Virulenzunterschied im Ablauf der Phagocytose zum Ausdruck kommt. Vor allem muß bei allen derartigen Überlegungen die eventuelle direkte bakterizide Wirkung des Serums berücksichtigt werden. Es stellte sich nun bei den Untersuchungen Marchands heraus, daß davon nicht die Rede sein kann: beide Streptokokkenstämme wuchsen ganz prächtig auf Kaninchenserum; also konnte die Avirulenz des Stammes *a* nicht etwa darauf bezogen werden, daß er empfindlicher gegen bakterizide Substanzen des Serums war. Die vollkommene Gleichmäßigkeit des Wachstumsverhaltens von *a* und *b* beweist, nebenbei gesagt, daß im normalen Kaninchenserum keine bakteriziden Stoffe gegen Streptokokken existieren.

Dagegen verhalten sich virulente und avirulente Kettenkokken durchaus verschieden, wenn man sie mit Leukocyten entweder in Normalserum oder in Exudatflüssigkeit aufschwemmt und mikroskopisch und kulturell untersucht. Marchand fand nämlich bei dieser Versuchsanordnung, daß die virulenten Kokken fast gar nicht aufgenommen werden, während die avirulente Rasse in weniger als 15′ vollkommen phagocytiert war. Da analoge Versuche mit Meerschweinchen- und Hundeleukocyten dies gleiche Resultat ergaben, schließt Marchand, „daß ein Streptokokkus dann gefährlich für Kaninchen, Hund resp. Meerschweinchen werden kann, wenn (weil) er von den Leukocyten der betreffenden Tierart nicht aufgenommen wird".

Die Untersuchungen Marchands geben keinerlei Aufschluß darüber, wie sich ein virulenter und ein avirulenter Stamm gegenüber Phagocyten verhalten, wenn die biologische Reaktion nicht im Serum (Exsudatflüssigkeit), sondern in einem indifferenten Medium — isotonischer Kochsalzlösung — erfolgt. Die Arbeiten von Wright und seiner Schule, deren Resultate unsere eigenen Versuche voll und ganz bestätigt haben, zeigen nun, daß bei Abwesenheit von Serum oder sonstiger Körperflüssigkeit selbst ganz avirulente Streptokokken wenig oder gar nicht phagocytiert werden, daß also das verschiedene Verhalten virulenter und avirulenter Kokken in der oben angegebenen Versuchsanordnung auf den Grad ihrer Sensibilität gegenüber den Opsoninen im Serum usw. beruht. Bei weiterer Analyse dieser Vorgänge konnte Marchand sich überzeugen, daß das verschiedene Verhalten der *a*- und *b*-Streptokokken gegenüber der Phagocytose nicht auf ihrer Vitalität beruht. Denn die Resultate blieben genau die gleichen, wenn er beide Versuchsstämme durch Erhitzen auf 60°, 1,8 ‰ HCl, 2,5 ‰ Na_2CO_3, 90 % Alkohol u. a. in ihrer Vitalität stark beeinträchtigte resp. sie abtötete. Ein virulenter Streptokokkus kann also seiner Vitalität ganz beraubt sein und wird trotzdem nicht phagocytiert, wenn er mit opsoninhaltigem Serum und Leukocyten zusammengebracht wird. Außerdem hat Marchand noch festgestellt, daß diese Unempfindlichkeit virulenter Stämme für opsonische Wirkungen nicht etwa auf einer schädigenden Wirkung der Kulturprodukte solcher Stämme auf die Phagocyten beruht. Denn vom Kulturmedium abfiltrierte und gewaschene Kokken erwiesen sich genau so resistent und blieben es auch, wenn er sie in Kulturfiltraten von der avirulenten Spezies (*a*) aufschwemmte. Marchand schließt aus seinen Untersuchungen, daß das verschiedene Verhalten virulenter und avirulenter Stämme gegenüber Phagocyten auf intimen, durch spezifische Stoffe beeinflußbaren physikalischen Beziehungen zwischen Bakterium und Freßzelle beruht.

Versuche die Mennes[25]) mit Pneumokokken anstellte, ergaben mit dem eben Gesagten übereinstimmende Resultate. Mennes arbeitete mit zwei Pneumokokkenstämmen, von denen der eine von einer kroupösen Pneumonie stammte, der andere aus dem Speichel. Durch häufige Tierpassagen gelang es Mennes, die Virulenz dieser Stämme so zu steigern, daß schließlich $^1/_{100000000}$ ccm infektiösen Blutes intravenös injiziert genügte, um ein Kaninchen zu töten. Die Immunisierung geschah in der Weise, daß Kaninchen zuerst „Pneumokokkentoxine", id est filtriertes infekt. Blut resp. Bouillonkulturen, die durch Erwärmen auf 60—70° während 20 Minuten sterilisiert wurden, eingespritzt bekamen; später lebende Kulturen.

Im Gegensatz zu den Erfahrungen von Denys und Leclef mit Streptokokken machte Mennes vor allem die wichtige Beobachtung, daß das Immunserum gegen Pneumokokken keinerlei bakterizide Qualitäten aufweist. Impft man dagegen Pneumokokken auf Immunserum, das mit Leukocyten (Pleuraexsudat) eines Normalkaninchens beschickt ist, dann tritt nicht nur Wachstumshemmung, sondern eine numerische Abnahme der Kokken auf. Dies ist aber nicht der Fall, wenn statt Immunserum normales Kaninchenserum verwendet wird.

Der Grund dieses Unterschiedes, der übrigens schon früher von van Bockstaele bei Versuchen mit *Bact. diphtheriae*, von Denys und van den Bergh für *Bact. coli comm.* festgestellt worden war, liegt in folgenden bei mikroskopischer Untersuchung sich darbietenden Verhältnissen: handelt es sich um eine Versuchsanordnung mit Normalleukocyten und Normalserum, dann sieht man im frischen Präparat die weißen Blutzellen amoeboide Bewegungen ausführen, mit den Pneumokokkenketten in Berührung kommen, mitunter sie förmlich zerreißen usw. Nie oder nur ganz äußerst selten werden Kokken dabei ins Innere der Zelle aufgenommen. Phagocytose findet hier also so gut wie gar nicht statt. Bei Anwesenheit von Immunserum hingegen senden die Normalleukocyten in der bekannten Weise ihre Fortsätze aus und bemächtigen sich der Mikroben in kurzer Zeit. Unter dem Einfluß des Immunserums gegen Pneumokokken entfalten demnach die normalen Leukocyten des Kaninchens neue Eigenschaften, die in größerer Intensität ihrer phagocytären Leistung gegenüber dem Pneumococcus lanceolatus zum Ausdruck gelangen. Die Übereinstimmung dieser Befunde mit denen Denys und Leclefs erhellt hieraus ohne weiteres.

Nennen wir noch die Untersuchungen in vitro von Bordet[1]) über die Phagocytierbarkeit verschiedener Mikroben (Cholera, Typhus, Hog-Cholera, Diphtherie, Proteus vulgaris, Streptococcus usw.) durch normale Kaninchenleukocyten — Untersuchungen, die sich aber mit dem Einfluß von Serum usw. auf jene Prozesse nicht befassen — und diejenigen von Markl über Phagocytierbarkeit der Pestbazillen, so ist die Reihe der Vorarbeiten über die opsonischen Stoffe erschöpft. Wie man sieht, liegt der Schwerpunkt aller dieser Arbeiten auf der Wirkung spezifischer antibakterieller Sera auf den Ablauf des phagocytären Prozesses. Zwei sehr interessante und wichtige Fragestellungen sind unberücksichtigt geblieben: 1. Wie verhält es sich mit der Phagocytose pathogener Bakterien durch Leukocyten, wenn der Faktor „Serum" gänzlich aus der Versuchsanordnung ausgeschlossen wird (spontane Phagocytose von Wright, Löhlein, Baecher); 2. Einfluß von Normalserum auf die Phagocytose.

In der Tat taucht angesichts der Befunde von Denys und seinen Mitarbeitern die Frage auf, ob denn zur Aufnahme von Bakterien ins Innere der Leukocyten die Mitwirkung irgendwelcher spezifischer Stoffe des Blutserums überhaupt eine conditio sine qua non ist; mit anderen Worten, ob die weiße Blutzelle in ihren Funktionen an ihr normales Milieu absolut gebunden ist oder nicht. Diese Frage ist von ganz hervorragender Bedeutung: im Bejahungsfalle sinkt der Leukocyt zu einem Faktor zweiter Ordnung innerhalb des Verteidigungsapparates des Organismus gegen bakterielle Noxen herab. Nicht minder wichtig erscheint in prinzipieller Hinsicht die zweite Frage — nach der Wirkung des Normalserums auf die phagocytäre Tätigkeit. Muß man dem Normalserum auch nur Spuren eines opsonisch wirkenden Körpers vindizieren, dann wird der Unterschied zwischen Normalserum und Immunserum ein rein quantitativer.

Um das Wichtigste gleich vorwegzunehmen: es hat sich bei den von diesen Gesichtspunkten ausgehenden Untersuchungen tatsächlich herausgestellt, daß die lebhafte und ausgiebige Phagocytose, die wir bei aktiv immunisierten Organismen fast ausnahmslos beobachten können, sich unter den bestimmenden Einfluß aktiver Serumstoffe stellt. Andererseits haben sich derartige im Reagenzglase angestellten Versuche als sehr geeignet erwiesen, größere — und nicht die unwichtigsten — Immunitätsprobleme hier schärfer zu fassen, dort einer befriedigenden Lösung zuzuführen.

In den Jahren der großen theoretischen Umwälzungen in der Immunitätslehre, die wir in erster Linie den Arbeiten von Bordet, Ehrlich und dessen Schule verdanken, scheint sich das Forscherinteresse von den „Opsoninen“ abgewandt zu haben; denn die nach den zuletzt zitierten nächste hierher gehörende Arbeit fällt ins Jahr 1901. Es sind dies Untersuchungen von Sawtschenko und Melkich[30]) über die Immunität bei Febris recurrens.

Es darf als bekannt vorausgesetzt werden, daß diese Krankheit beim Menschen sowohl wie beim Affen in typischen Fieberanfällen sich äußert, während deren der Erreger der Krankheit, das Spirochaeta Obermeyeri in ungeheurer Anzahl im Kreislauf erscheint, um mit der Krise, unter heftigem Fieberabsturz plötzlich vollständig aus dem Blute zu verschwinden. Den dabei in Betracht kommenden Mechanismus hatte man versucht auf zweierlei entgegengesetzte Weisen zu erklären: nach Metschnikoff[22]) findet bei der Krise eine überaus lebhafte Phagocytose der pathogenen Spirillen hauptsächlich durch die multinuklearen Zellen in der Milz statt; er schreibt also der Phagocytose den Hauptanteil an der Vernichtung des Virus zu. Gabritschewski[9]), dem es gelungen war im Serum von Menschen, die Rekurrens durchgemacht haben, bakterizide Substanzen nachzuweisen, die in vitro die Obermeyersche Spirochäte immobilisieren und destruieren, sieht die Ursache des kritischen rapiden Verschwindens des Virus aus der Blutbahn im verstärkten Auftreten eben jener spirilliziden Stoffe im Serum der Patienten.

Sawtschenko und Melkich unternahmen es, diese einander widersprechenden Annahmen in Einklang zu bringen: sie erblicken in den bei resp. während der Erkrankung im Blute auftretenden Antikörpern ein die Phagocytose stark begünstigendes Agens.

Ihre Versuche führten sie an immunisierten*) Meerschweinchen aus und fanden, daß bei solchen hochimmunen Tieren die intraperitoneale Phagocytose von dorthin eingebrachten Spirochäten viel rascher und intensiver verläuft als bei Normaltieren. Sie schlossen hieraus, daß die die Immunität charakterisierenden Schutzstoffe eben die Rolle von Opsoninen (nach unserer heutigen Nomenklatur) erfüllen. Soweit unterscheiden sich die Ergebnisse der russischen Autoren in nichts von den früheren der Schule von Louvain. Das Neue und prinzipiell Wichtige liegt aber darin, daß sie die opsonische Wirkung lediglich der einen Komponente des Immunstoffes zuschreiben, nämlich dem Ambozeptor im Sinne Ehrlichs**). Den Mechanismus dieser Wirkung erklären sich Sawtschenko und Melkich auf doppelte Weise: einmal halten sie es für unzweifelhaft, daß der Ambozeptor von den Leukocyten aufgenommen wird und sie dadurch zu ihrer phagocytären Tätigkeit angeregt werden. Andererseits erscheint es durchaus möglich, ja sogar höchst wahrscheinlich, daß die Spirochäten ihrerseits den Ambozeptor fixieren und dadurch zur Aufnahme geeigneter werden. Jedenfalls handelt es sich um eine Umänderung der „negativen“ chemotaktischen Beziehungen zwischen Spirochäte und Leukocyt in eine Art „positive“ Chemotaxis.

Diese Untersuchungen Melkichs und Sawtschenkos sind zwar sehr interessant, nicht aber eigentlich überzeugend. So sucht man vergeblich den Nachweis, daß Ambozeptor von Leukocyten und Spirochäten tatsächlich absorbiert werden. An sich entspricht ja die gemachte Annahme durchaus den Tatsachen; aber dies ist erst später, teils von Sawtschenko selbst, teils von einem von uns (Levaditi) bewiesen worden.

Die Experimente Sawtschenkos[29]) bestehen kurz in folgendem: Injiziert man Meerschweinchen Blut der gleichen Tierart intraperitoneal, nachdem man künstliche lokale Leukocytose hervorgerufen hat, so findet keine Phagocytose der injizierten Erythrocyten statt. Wohl aber ist dies in ausgesprochener Weise der Fall, wenn gleichzeitig mit den roten Meerschweinchenblutkörperchen etwas hämolytischer Ambozeptor (Serum von Kaninchen, die mit Meerschweinchenblut vorbehandelt waren, durch Erhitzen auf 55—56° inaktiviert) eingespritzt wird: dann phagocytieren nämlich nicht nur die Makrophagen des Peritoneums, sondern auch die polymorphkernigen Leukocyten bemächtigen sich der Erythrocyten und zerstören sie langsam, so daß nach einiger Zeit das artgleiche Blut völlig aus dem Bauchfellraum verschwindet. Das gleiche geschieht, wenn man die zur Injektion bestimmten Erythrocyten in vitro mit Ambozeptor vorbehandelt, durch Waschen und Zentrifugieren den Überschuß desselben entfernt und nun injiziert. Und schließlich kann man mit demselben Erfolge den ganzen Versuch außerhalb des Organismus, im Reagenzglase anstellen (bei 37—38°). Daraus kann man unter Berücksichtigung der analogen Verhältnisse für Bakterien den allgemeinen Schluß ziehen, daß die Anwesenheit von Ambozeptor die Phagocytose von korrespondierenden geformten Antigenen***) erleichtert resp. hervorruft.

---

*) Z. T. Aktive Immunität durch Injektionen von virulentem Blut, z. T. passive — durch Einverleibung von Serum von Rekurrensrekonvaleszenten.

**) Die für das Verständnis der folgenden in Frage kommenden Tatsachen der Immunitätslehre dürfen als bekannt vorausgesetzt oder müssen an anderer Stelle dieses Werkes nachgelesen werden.

***) D. h. derselben Zellart, die zur Herstellung dieses Ambozeptors gedient hatte.

Mithin ergibt sich aus den Untersuchungen SAWTSCHENKOs in durchaus einwandfreier Weise, daß das opsonische Prinzip des Immunserums entweder identisch, oder zum mindesten aufs engste verknüpft mit dem Ambozeptor ist (Fig. 2).

Welches sind nun die Wege, auf denen die Begünstigung der Phagocytose erfolgt? Einerseits zeigt der oben angeführte Versuch mit den vorbehandelten Blutkörperchen, daß diese zweifellos imstande sind, Ambozeptor zu fixieren und daß sie dadurch gewissermaßen begehrenswerter für den Phagocyten werden. SAWTSCHENKO nimmt also an, daß zum größten Teil der opsonisierende Vorgang sich am Erythrocyten resp. Bakterium, am Objekt der Phagocytose abspielt. Indeß fand SAWTSCHENKO andererseits, daß auch die Leukocyten selbst Zwischenkörper zu fixieren vermögen; er brachte Leukocyten mit inaktiviertem Serum zusammen, wusch sie durch mehrmaliges Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung und stellte fest, daß sie dann Erythrocyten in der prächtigsten Weise phagocytierten. Außerdem gelang es ihm, so vorbehandelten Leukocyten einen Teil des Ambozeptors wieder zu entziehen. Wenn diese Versuche auch sehr zugunsten der Annahme SAWTSCHENKOS sprechen, so haben sie doch nicht den demonstrativen Wert einer anderen Anordnung, die darin besteht, daß man Leukocyten mit einem abgemessenen Quantum Ambozeptor in Mischung bringt und nun sieht, ob sie de facto eine gewisse Menge davon an sich reißen. Dieser von LEVADITI[17]) angestellte Versuch zeigt in strikter Weise, daß weiße Blutkörperchen vom Meerschweinchen eine deutlich nachweisbare Affinität zu meerschweinchenhämolytischem Kaninchenambozeptor besitzen, die sich durch Fixieren desselben dokumentiert*).

Fig. 2. Komplement und Ambozeptor nach EHRLICH. *a* Komplement, *b* Ambozeptor, *c* Rezeptor.

Alle diese zahlreichen Versuchsreihen führten dazu (SAWTSCHENKO, TARASSÉWITSCH[32]), LEVADITI) die intensive Phagocytose bei aktiv oder passiv immunen Tieren als Resultante dreier Faktoren aufzufassen: 1. Leukocyten, 2. Ambozeptor, 3. phagocytables Objekt. Von diesen dreien ist der Ambozeptor das *primum movens*: indem er einerseits die zu phagocytierende Zelle (oder Bakterium) zu präparieren, andererseits auch an den Leukocyten sich zu verankern imstande ist, stellt er das reelle Bindeglied zwischen jenen beiden dar. Seine opsonische Wirkung ist spezifisch in dem Sinne, daß er sie nur derjenigen Zell- oder Bakterienart gegenüber entfaltet, der er seine Entsehung verdankt.

Dergestalt lag die Frage, als im Jahre 1903 Arbeiten von WRIGHT und DOUGLAS die Aufmerksamkeit aufs neue nach dieser Richtung hinlenkten, ohne indessen an die bisher erwähnten Feststellungen irgendwie direkt anzuknüpfen. Es mag dies daran liegen, daß WRIGHT und DOUGLAS ihre Untersuchungen am Serum gesunder und kranker Menschen anstellten, während man früher vorwiegend spezifsche Immunsera untersucht hatte. Wie sich gleich herausstellen wird, existieren in der Tat nicht un-

*) Es muß ausdrücklich betont werden, daß dieser Versuch keine Gültigkeit für bakteriolytische Ambozeptoren involviert (L.).

beträchtliche Unterschiede zwischen beiden Arten von Sera mit Bezug auf ihre „opsonisierende“ Wirkung, so daß die englischen Forscher sich sehr wohl veranlaßt sehen konnten, die von ihnen beschriebenen Substanzen als etwas Neues, bisher Unbekanntes aufzufassen. Wenn dies nun auch nicht ganz richtig ist, gebührt Wright und Douglas doch das Verdienst, die Opsoninfrage ordentlich in Fluß gebracht zu haben: nicht nur hat Wright den Namen „Opsonine“ gegeben und in Gemeinschaft mit seinen Mitarbeitern eine Methodik der Opsoninuntersuchung geschaffen, er hat auch die praktische Anwendung der opsonischen Reaktion für die Beurteilung präventiver und kurativer Wirkungen gewisser Bakterienvaccine in die Klinik eingeführt.

Wright und Douglas[38]) untersuchten in ihren ersten Arbeiten die Phagocytose von *Staphylococcus aureus* durch normale menschliche Leukocyten unter dem Einfluß von Blutserum gesunder Menschen. Es zeigte sich, daß ohne das letztere Phagocytose fast gar nicht stattfand, nach Zusatz sehr lebhaft wurde. Daraus schlossen Wright und Douglas auf das Vorhandensein einer besonderen Substanz im Blutserum, die sie Opsonine nannten. Sie ist nicht nur im Serum, sondern auch im frischen Blutplasma nachweisbar und zeichnet sich vor allem durch große Unbeständigkeit aus. Sogar im Dunklen büßt Serum nach 5—6 Tagen etwa 50% seines Opsoningehalts ein; Erwärmen auf 60° durch 10′ zerstört sie vollkommen. Wright und Douglas stellen folgende Tabelle auf:

	Durchschnittl. Zahl der phagocytierten Bakterien pro Leukocyt:
vor Erhitzung	12,7
10 Minuten bis 45° . .	13,1
10 „ „ 50° . .	10,2
10 „ „ 55° . .	5,7

Das Opsonin des Normalserums ist demnach thermolabil, im Gegensatz zu der von Sawtschenko festgestellten Thermostabilität der opsonischen Substanzen in Immunseris, welche bekanntlich auch nach der üblichen Komplementinaktivierung die Phagocytose ausdrücklich begünstigen.

Dieser Unterschied hat vor allem Veranlassung zur Abtrennung der Opsonine als spezifischer Körper von den als Ambozeptor und Komplement bekannten gegeben. Ebenso unterscheiden sie Wright und Douglas von den bakteriolytischen resp. bakteriziden Substanzen, da es Sera gibt, die exzessiv opsonisch wirken, ohne eine Spur von Auflösung oder Abtötung von Bakterien zu veranlassen (z. B. menschliches Blutserum gegenüber *Staphylococcus aureus*).*)

Nach Wright und Douglas wirken die Opsonine in der Weise, daß sie die Bakterien für die Phagocytose gewissermaßen präparieren; jedenfalls läßt sich eine direkte Beeinflussung der Leukocyten experimentell nicht nachweisen. Ihrer Konstitution nach scheinen die Opsonine einfachere Körper zu sein: eine Anreicherung an Opsonin wird nicht erreicht, wenn man einem bestimmten Normalserum inaktiviertes gleichartiges Serum zusetzt.

In zwei späteren Arbeiten[39, 40]) haben Wright und Douglas die Veränderungen des Opsoningehalts menschlicher Sera im Verlaufe ver-

*) Wright hat gezeigt, daß das Serum von Patienten mit Staphylokokkeninfektion nicht bakteriolytisch auf diese Spezies wirkt.

schiedener Krankheiten ebenso wie unter dem Einfluß aktiv immunisatorischer Maßnahmen zum Objekt ihrer Untersuchungen gemacht.

Vor allem stellten sie fest, daß der „opsonische Index"*) im Laufe von Staphylokokkeninfektionen unter die Norm absinkt, was nach WRIGHT und DOUGLAS im gegebenen Falle auf eine Prädisposition des Organismus für Infektion mit Staphylococcus aureus hinweist. Wir erfahren ferner, daß die Opsonine durch die Muttermilch übertragen werden (opsonischer Index der Mutter für Staphylococcus aureus 15,1, des Kindes 16,5). Das größte Interesse nehmen indes die immunisatorischen Versuche der englischen Gelehrten in Anspruch.

WRIGHT und DOUGLAS behandeln mit Furunkulose, Acne vulgaris, Sykosis usw. behaftete Menschen durch Injektionen abgetöteter Kulturen von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus albus* und kontrollieren regelmäßig den Opsoningehalt des Blutes (Fig. 3). Es erweist sich, daß dieser letztere am Tage nach der Injektion abfällt (negative Phase); später dagegen wieder ansteigt und das Ausgangsniveau deutlich überschreitet (positive Phase). Letztere entspricht der Heilung der Infektion, resp. dem Auftreten einer Immunität gegen die Erreger. Wir geben zur Orientierung folgende von WRIGHT und DOUGLAS stammende Kurve wieder, die die Schwankungen des Opsoningehaltes im Serum eines seit 4 Jahren an Furunkulose leidenden und mit Staphylokokkenvaccine behandelten Patienten darstellt. Sie zeigt, daß der opsonische Index, der im Moment der Injektion des Vaccins (welches einer Menge von 2 Milliarden Staphylokokken entsprach) 1,1 betrug, am nächsten Tage auf 0,75 gesunken

Fig. 3. Phagocytose d. Staphylococcus aur. durch menschliche neutrophile Leukocyten.

Fig. 4. Opsonischer Index während der Staphylokokkenvaccination (nach WRIGHT und DOUGLAS.

ist, um 8 Tage p. injekt. 1,4 zu erreichen. Eine zweite Injektion treibt ihn bis auf 2,0 (Fig. 4).

*) Näheres über diesen Begriff siehe unten.

Hieraus ergibt sich ohne weiteres die prinzipielle Möglichkeit, diejenigen Substanzen des Blutes, die die Phagocytose steigern, anzureichern; ebenso erklärt sich auch bis zu einem gewissen Grade die erhöhte Phagocytose bei bestehender Immunität.

Außer Staphylococcus aureus und albus haben Wright und Douglas[39]) noch einige andere für den Menschen pathogene Bakterien in den Bereich ihrer Untersuchungen gezogen. Sie fanden, daß menschliches Serum Opsonine gegen folgende Arten enthält: Bacillus pestis, Micrococcus melitensis, Diplococcus pneumoniae, Bacterium coli, Bacillus dysenteriae-Shiga (Fig. 5), Bacillus anthracis, Bacillus typhi (Fig. 6) und Vibrio cholerae.

Später haben Wright[34, 41]) und Bulloch[2]) darauf hingewiesen, daß außer den genannten auch der Tuberkelbazillus empfindlich gegen die opsonisierende Wirkung des menschlichen Serums sich erweist (Fig. 7). Refraktär in diesem Sinne verhalten sich nur der Diphteriebazillus und der Bacillus Xerosis. Diese letzteren beiden werden ebenso, wenn nicht besser, als in Anwesenheit frischen Serums, dann phagocytiert, wenn man den Prozeß in inaktiviertem Normalserum (also nach Zerstörung der thermolabilen Opsonine) vor sich gehen läßt (s. Tab. 1).

Fig. 5. Phagocytose des Bac. dysenter. Shiga durch menschliche neutrophile Leukocyten.

Fig. 6. Phagocytose des Typhusbazillus durch menschliche neutrophile Leukocyten.

Fig. 7. Phagocytose des Tuberkelbazillus durch menschliche neutrophile Leukocyten (nach einem Präparat von Dr. Freeman).

Tabelle 1.

		Aktives Serum	Inaktives Serum
Serum Gewaschene Leukocyten Diphtheriebazillenaufschwemmung	3 Teile „ „		
Opsonische Index		0,7	4,1

Für den Xerosebazillus ist der opsonische Index des frischen Serums 0,3, der des inaktivierten 6,0.

Die Tatsache, daß das menschliche Blutserum nachweisbare Opsonine gegen fast alle wichtigen Krankheitserreger enthält, und daß dieser Gehalt sich unter gewissen Bedingungen steigern läßt, brachte Wright und seine Mitarbeiter auf die Idee, jenes Prinzip therapeutisch zu verwerten. Es wurden die geeigneten Methoden ausgearbeitet, ihre Brauchbarkeit und der erzielte Erfolg am opsonischen Index kontrolliert und so eine ganz stattliche Reihe anscheinend günstiger Resultate gewonnen.

Wir gehen indessen nicht näher darauf ein, da diese rein praktischen Fragen noch nicht definitiv gelöst sind. Wir beschränken uns, auf die betreffenden Originalarbeiten hinzuweisen*).

Die opsonischen Eigenschaften des frischen Normalserums, auf die Wright und Douglas zuerst aufmerksam gemacht haben, sind von einer Reihe von Autoren nachgeprüft worden, von denen außer den Schülern Wrights, Bulloch und Atkin, die Amerikaner Hektoen und Ruediger[14]) und die Deutschen Gruber, Löhlein und Baecher zu nennen sind. Alle diese Forscher sind darin einig, daß das frische Serum die Phagocytose einer großen Anzahl von Bakterienarten zweifellos fördernd beeinflußt. So fanden Gruber und Futaki[11]), daß ein für Meerschweinchen virulenter Typhusstamm in ganz verschiedener Weise von Meerschweinchenleukocyten phagocytiert wird, je nachdem man frisches oder inaktiviertes Serum zusetzt. Die Münchener Forscher stellen drei Kategorien von Bakterien auf: 1. sehr empfindliche, 2. wenig empfindliche, 3. unempfindliche — alles mit Bezug auf opsonische Wirkung von frischem Normalserum.

I. Gruppe.

Bakterien, die mit frischem Serum gut, mit inaktiviertem gar nicht phagocytiert werden	Staphylococcus pyogenes aur. Streptococcus pyogenes. Diplococcus pneumon. Bact. coli. Bac. prodigiosus. Bac. subtilis. Bac. erysipel. suum. Vibrio proteus. Bac. diphtheriae**).

II. Gruppe.

Bakterien, die mit frischem Serum gut, mit inaktiviertem nur in geringem Maße phagocytiert werden	Bac. pyocyaneus. Bac. sui pestifer. Bac. sui septicum.

III. Gruppe.

Bakterien, die unempfindlich gegen Opsonine sind und in beiden Fällen gleichmäßig phagocytiert werden	Virulente cholera gallinarum. Virulente cholera asiatica.

Gruber und Futaki neigen nach den Resultaten ihrer Untersuchungen zu der Ansicht, daß „die Phagocytose nicht die primäre, sondern eine sekundäre Schutzeinrichtung des normalen tierischen Organismus gegen Infektion ist. Die primäre Schutzwirkung geht von gelösten thermolabilen Stoffen aus." Wir werden gleich sehen, daß dieser Schluß viel zu allgemein ist. Er setzt erstens voraus, daß die im Reagenzglase beobachteten Vorgänge mit den im Körper stattfindenden völlig identisch sind, was sicherlich doch nur zum Teil der Fall ist; zweitens ist jetzt kein Zweifel mehr, daß „Opsonine" zum Zustandekommen der Phagocytose nicht unbedingt nötig sind, da Löhlein und eigene Untersuchungen (Levaditi und Inmann) das Vorkommen von „spontaner Phagocytose" erwiesen haben.

Die Arbeit von Löhlein[19]), der mit Streptokokkus, Bacterium coli und Choleravibrio experimentierte, bringt in erster Linie eine

*) Wright[33, 35, 36, 37]); Bulloch[3]).

**) Man beachte die von den Wrightschen Befunden abweichenden Resultate von Gruber und Futaki mit Diphtheriebazillen.

Bestätigung schon bekannter Tatsachen auf gesicherter experimenteller Basis. Seine Resultate sind nur abweichend, soweit es sich um Choleravibrionen handelt, die nach Löhlein auch bei völliger Abwesenheit von Opsonin gut phagocytiert werden.

Aus dem bisher besprochenen Tatsachenmaterial schält sich bei etwas genauerer Betrachtung ein dreifaches Problem heraus, dessen Bedeutung für die gesamte Immunitätslehre ohne Rücksicht auf den speziellen Standpunkt ohne weiteres einleuchtet:

1. spontane Phagocytose,
2. die Beziehungen zwischen Normalopsoninen, Immunopsoninen und Ambozeptoren,
3. die Konstitution des Opsonins und seine Wirkungsweise.

Wir besprechen diese drei Punkte nachstehend im Einzelnen.

a) Spontane Phagocytose. Die Frage, ob die farblosen Blutelemente als solche, ohne Mitwirkung irgendwelcher gelöster Körperbestandteile imstande sind eine phagocytäre Tätigkeit auszuüben, ist von essentieller Bedeutung. Wenn es gelingt nachzuweisen, daß nicht nur im Reagenzglase, sondern ebenso und vor allem im lebenden Organismus, Leukocyten ohne jene Beihilfe oder Anregung oder wie man es sonst etwa nennen will, nicht „phagocytieren", so werden sie damit zu sekundären Faktoren in der Verteidigung des Organismus herabgedrückt, wie dies Gruber und Futaki in der oben besprochenen Arbeit tun und wie Anhänger der rein humoralen Richtung in der Immunitätslehre a priori annehmen würden. Dies allein erklärt schon, weshalb Metschnikoff und Löhlein ihre ganze Aufmerksamkeit dem Studium der spontanen Phagocytose zugewandt haben.

Die Resultate dieser Untersuchungen widersprechen in vielen Punkten der Auffassung von Wright und Douglas einerseits, andererseits den Ansichten von Gruber und Futaki. So hat Metschnikoff[24]) beobachtet, daß Leukocyten, welche er in vorher abgekochtem und daher keinerlei aktiven Stoffe mehr enthaltendem Urin aufgeschwemmt hatte, Bakterien phagocytierten. Löhlein[20]) hat in seinen Untersuchungen jede Mitwirkung auch kleinster Opsoninmengen dadurch zu verhüten gesucht, daß er seine Leukocyten nach mehrfachem Waschen und Zentrifugieren (bis zu 5 mal) in physiologischer Kochsalzlösung oder, was noch besser erscheint, in vorher aufgekochtem humor aqueus von Ochsenaugen aufschwemmte. Er sah, daß unter diesen Bedingungen Meerschweinchenleukocyten *Bact. coli* und *Vibrio cholerae* nicht nur mit einer gewissen Avidität phagocytieren, sondern sie im Innern ihres Protoplasmas in deutlichster Weise körnig umwandeln und schließlich vollkommen verdauen. Wenn auch in einzelnen Versuchen sehr hochvirulente Streptokokken, wie der Stamm T z. B. spontan nicht phagocytiert werden, während dies mit dem avirulenten Stamm Odessa IV der Fall ist, so kann dieser Umstand, nach Löhlein, noch durchaus nicht ohne weiteres zugunsten der Anschauungen Wrights und Grubers gedeutet werden. Denn aus Beobachtungen von Löhlein selbst, ferner von Marchand, Hektoen und Levaditi und Inmann geht hervor, daß gewisse Leukocytenarten, namentlich Kaninchenleukocyten, virulenten Streptokokkenstämmen gegenüber auch dann indifferent bleiben, wenn reichlich normales Opsonin zugesetzt wird.

Wenn WRIGHT und DOUGLAS annehmen, daß die opsoninfreie Phagocytose von Bakterien mit Ausnahme des Diphtherie-, Xerose- und Tuberkelbazillus, eine seltene Erscheinung sei, so liegt dies daran, daß diese Forscher die Dauer des einzelnen Versuches zu kurz bemessen (1/4 Stunde). Bei LÖHLEIN beträgt sie eine Stunde und mehr; dies erklärt seine positiven Resultate. Wir selbst haben uns an Typhusbazillen überzeugen können, daß das Zustandekommen spontaner Phagocytierung mindestens von zwei Faktoren abhängt: der Reaktionszeit und dem **Alter** der Kultur. So werden z. B. von menschlichen Leukocyten 24stündige Agarkulturen von Bac. typhi gar nicht, ebenso alte oder ältere (24—48 Std.) Bouillonkulturen desselben Virus ausgezeichnet phagocytiert; während junge (5—6 St.) Bouillonkulturen der Phagocytose nur in unbedeutendem Maße unterliegen.

Aber selbst wenn gezeigt werden könnte, daß Leukocyten ohne Serum Bakterien nicht oder nur schwach phagocytieren, würde das nichts gegen die essentielle, primäre Bedeutung der Phagocyten beweisen. Denn dazu müßte vor allem angenommen werden, daß die Vorgänge in vitro denen im lebenden Organismus genau entsprechen. Hierfür haben wir aber keinerlei Beweise; eher noch für das Gegenteil, wie folgende Versuche mit Milzbrandbazillen aufs deutlichste zeigen (LÖHLEIN, GRUBER, METSCHNIKOFF): Meerschweinchen sind für die Infektion mit *Bac. anthracis* sehr empfänglich; man sollte erwarten, daß hier ohne Opsonin keine Phagocytose erfolgt. In Wirklichkeit werden Milzbrandbazillen in vitro von Meerschweinchenleukocyten meist ganz prachtvoll gefressen. Umgekehrt sind, nach Untersuchungen von SLEESWIJK*) aus dem PASTEURschen Institut, gewaschene Leukocyten vom Frosch, der gar nicht, oder nur ganz schwach für *Anthrax* empfänglich ist, in vitro nicht imstande ohne das im Froschserum enthaltene Opsonin, Anthraxbazillen aufzunehmen. Im übrigen sind die gegen Parallelismus zwischen Reagenzglasversuch und pathologischem Geschehen im Tierkörper sprechenden Tatsachen auf dem Gebiet der Immunität etwas so alltägliches, daß sich ihre Anführung erübrigt.

Hingegen muß hier noch eines wichtigen Umstandes Erwähnung geschehen, nämlich den Änderungen in der Phagocytierbarkeit verschiedener Mikroorganismen, je nachdem sie den Tierkörper passiert haben oder nicht. Auf diesen Punkt ist von GRUBER und FUTAKI[11]) und namentlich von LÖHLEIN[20]) hingewiesen worden. GRUBER und FUTAKI haben beobachtet, daß virulente Milzbrandstämme von Hunde-, Hühnerleukocyten, welche Tiere von Hause aus immun gegen Anthrax sind, in vitro gut phagocytiert werden, nicht aber von Kaninchen, also Phagocyten von Tieren, die gegen diese Infektion empfänglich sind. Dabei stellten GRUBER und FUTAKI fest, daß die virulenten Stäbchen sich in vivo, wie in vitro mit einer Kapsel umgeben, die sie vor der Phagocytierung schützt.

LÖHLEINS Versuche sind äußerst demonstrativ. Pestbazillen aus höchstvirulenten Kulturen werden, auch wenn die Kulturen noch ganz jung sind (s. o.) in vitro von Meerschweinchen- und Rattenleukocyten lebhaft phagocytiert. Injiziert man das Virus Meerschweinchen ins Peritoneum, so wird eine gewisse Menge der Bazillen sofort phagocytiert; dann verschwinden sowohl Leukocyten wie Bakterien auf einmal aus

*) Siehe SLEESWIJK, Phagocytose en Opsoninen, 1908, Amsterdam, Hübner und Santen.

dem Exsudat (keine extracelluläre Umwandlung in Körnchen usw.). Nach einiger Zeit erscheinen jedoch die Pestbazillen wieder und nun findet trotz Anwesenheit reichlicher Leukocytenmengen fast gar keine Phagocytose mehr statt. Löhlein zeigt nun, daß diese Änderung in der Phagocytierung, die in der gleichen eklatanten Weise auch bei Milzbrandbazillen als Virus auftritt, an die Ausbildung einer Kapsel (Ektoplasma Zettnows) gebunden ist, die den Bakterienleib umhüllt. Diese „Kapselbazillen“, „Bazillen zweiter Ordnung“ (Deutsch) stoßen im lebenden Organismus die Leukocyten ab, und das gleiche ist im Reagenzglase der Fall.

Diese Feststellung ist außergewöhnlich interessant. Sie zeigt, daß Schwankungen in der Phagocytierbarkeit von Bakterien ohne jegliche Mitwirkung von „Opsoninen“ zustande kommen kann; daß, wenn gelösten Substanzen der Körpersäfte ein gewisser Einfluß auf den Verlauf der Phagocytose unbedingt zukommt, letztere doch in weit höherem Maße von Lebensäußerungen, Stoffwechselvorgängen (Kapselbildung, Ausbildung negativer Chemotaxis) der Bakterien selber so abhängig ist, daß sie dadurch unter Umständen glatt annulliert wird. Da die Kapselbildung, wie wir gesehen haben, den entgegengesetzten Effekt hat, wie die Einwirkung opsonischer Sera, so liegt der Gedanke nahe, daß es sich bei letzterer Wirkung eventuell auch um eine Änderung der Oberflächenbeschaffenheit an den Mikroben handeln könnte.

Es sei noch erwähnt, daß die Phagocyten zu einer Zeit, wo sie gekapselte Pest- oder Milzbrandbazillen refüsieren, andere Arten, z. B. Staphylokokken (Löhlein) sehr gut phagocytieren, ganz in Übereinstimmung mit älteren Versuchen von Bordet an Streptokokken.

Nach alledem werden wir sagen können, daß die weißen Blutzellen die Fähigkeit haben gewisse, selbst hochvirulente, Bakterienarten auch ohne die Mitwirkung von Opsoninen zu phagocytieren. Die Rolle der normalen sowohl wie der Immun-Opsonine beschränkt sich demnach auf die Erleichterung resp. Anregung der Phagocytose in den Fällen, wo letztere als spontaner Vorgang zwischen Leukocyten und Bakterien schwach oder überhaupt ungenügend verlaufen würde.

b) Die Beziehungen zwischen Opsoninen und den bereits bekannten Komponenten des Serums (Komplement und Ambozeptor). Hier liegen die Verhältnisse noch recht im Unklaren und gerade an diesem Punkte stoßen die Ansichten hart aufeinander. Da die Frage auch experimentell keineswegs als abgeschlossen gelten kann, müssen wir uns auf ein Referat der verschiedenen Meinungen beschränken, nicht ohne auf offenkundige Lücken in der experimentellen Beweisführung resp. auf unklar gefaßte Beurteilungen jeweilig hinzuweisen.

Für die opsonischen Eigenschaften von Immunseris liegen die Dinge sehr zugunsten engster Beziehungen zwischen jenen Eigenschaften und den spezifischen Ambozeptoren: 1. spezifische Opsonine sowohl wie Ambozeptoren sind thermostabil; 2. beide Substanzen werden von Bakterien elektiv fixiert. Von den Autoren, die diese Punkte, auf die sich, wie wir sahen, schon Sawtschenko stützt, neuerdings nachgeprüft haben, nennen wir Neufeld und Rimpau[27]) und Hektoen[12]).

Neufeld und Rimpau arbeiteten mit Streptokokken und entsprechendem von Kaninchen stammenden Immunserum; die Leukocyten für den Reagenzglasversuch lieferten künstlich erzeugte Exsudate der Kaninchenpleura. Sie fanden, daß 10′ lang auf 59° erhitztes Immun-

serum genau so gut opsoniert, wie nicht inaktiviertes. Die erst mit Immunserum in Kontakt gebrachten, dann sorgfältig gewaschenen und zentrifugierten Bakterien wurden nach wie vor phagocytiert, dasselbe fand statt, wenn abgetötete Kulturen verwendet wurden. NEUFELD und RIMPAU schließen hieraus, daß die opsonisierende Wirkung des Immunserums jedenfalls nicht vom Komplement ausgeht, das ja bei 59° sicher zerstört wird, sondern vom Immunkörper.

HEKTOEN[12]) berichtet, daß das im Serum von Typhusrekonvaleszenten enthaltene spezifische Opsonin einer ½ stündigen Erwärmung auf 70° wenigstens zum Teil widersteht; das gleiche sei mit dem Opsonin der spezifischen hämolytischen Sera der Fall (ref. BARRAT, der hierin SAWTSCHENKO zustimmt).

Nach DEAN[5]), der Pferdeimmunsera gegen *Staphylococcus p. aur.*, *Streptococcus*, *Bac. typhi* und *Bac. dysenteriae* untersuchte, bleibt das in diesen Seris nachweisbare Opsonin bei Erwärmung auf 60° unverändert*).

Thermostabilität und spezifische Absorption sprechen sehr zugunsten der Identität von Opsonin und Ambozeptor; diese Kriterien allein können aber nicht als absolut beweiskräftig angesehen werden, da sie teilweise auch dritten, sicher anderen Stoffen zukommen. So sind beispielsweise die Agglutinine gleichfalls thermostabil, auch sie werden von Bakterien in elektiver Weise fixiert, und dennoch haben sie unserer Überzeugung nach — und ungeachtet der gegenteiligen Behauptung von SMITH[31]) — nicht das geringste mit Opsoninen zu tun (vgl. NEUFELD und RIMPAU). Bei unseren Untersuchungen über die Bildungsstätten von spezifischen Typhusopsoninen bei aktiv immunisierten Kaninchen konnten wir beobachten, daß eine Reihe von Organextrakten (Leber, Niere) stark agglutinierten, dabei aber keinerlei opsonischen Wert hatten. Bleibt somit, bei aller Wahrscheinlichkeit der Voraussetznng, der strikte Identitätsbeweis für Opsonin und Ambozeptor noch zu liefern, so kann andererseits der Umstand, daß manche Sera reichlich thermostabiles Opsonin enthalten, ohne bakterizid zu wirken (Antistreptokokken —, Pneumokokkenserum), nicht als Beweis gegen diese Identität angeführt werden. Wir wissen, dank den Untersuchungen von BORDET und GENGOU, daß auch Sera, die nicht spezifisch bakterizid, aber präventiv wirken, Ambozeptoren enthalten, deren Nachweis durch Komplementablenkung ohne weiteres gelingt.

Während alle anderen Autoren sich über die Frage der Identität der Opsonine mit dem Zwischenkörper sehr zurückhaltend äußern, halten NEUFELD und TÖPFER[28]), sowie HEKTOEN[13]), BAECHER unbedingt daran fest, daß zwischen thermostabilen Opsoninen und den bakteriolytischen und hämolytischen Ambozeptoren keinerlei Beziehungen bestehen; erstere seien Körper sui generis. Die Beweise von NEUFELD und TÖPFER, daß nämlich hämolytisches Kaninchenserum (gegen Meerschweinchenerythrocyten) hämolytische Ambozeptoren enthalten muß, während es sich frei von Opsonin erweist, scheinen uns nicht stichhaltig zu sein. Gewiß gibt es bakterio- und hämolytische Ambozeptoren, die gar nicht opsonisierend wirken; andere wieder, die dies schwach tun; dritte, die ausgesprochen opsonische Eigenschaften haben. Ganz ebenso, wie es spezifische Ambozeptoren gibt, die starke Bakteriolyse hervorrufen, während andere sich

---

*) Auch einzelne Normal-Opsonine (Opsonine aus Normal-Serum) sind relativ thermostabil: Rattenserum—Anthrax, Menschenserum—Typhus. Hektoen l. c.

lediglich an den Bakterienleibern verankern, ohne sie aufzulösen. (Bordet und Gengou.)

Die Frage der Identität von spezifischem Opsonin und Ambozeptor muß deshalb als offen gelten; es spricht aber vieles für eine Antwort im bejahenden Sinne.

Anders liegen die Verhältnisse für die normalen Opsonine. Es war bereits davon die Rede, daß nach der Ansicht von Wright und Douglas die opsonischen Eigenschaften von Normalserum auf der Anwesenheit eines besonderen wirksamen Prinzips beruhen, das mit den schon bekannten aktiven Serumbestandteilen nichts zu tun hat. Das Normalopsonin ist in dieser Auffassung weder mit dem Komplement noch mit dem Ambozeptor identisch; es läßt sich vermöge seines besonderen Eigenschaften von den genannten Substanzen differenzieren.

Gegenwärtig kann diese Anschauung nicht mehr geteilt werden. Eine ganze Reihe deutscher und französischer Publikationen beweist, daß es falsch wäre, das — unzweifelhaft vorhandene — opsonische Vermögen des normalen Serums einem besonderen, vor Wright und Douglas unbekannten, Stoff zuzuschreiben. Baecher[1a]) und namentlich Neufeld und Hühne[23a]), Levaditi und Inmann[17a]) haben fast zu gleicher Zeit und unabhängig von einander gezeigt, daß die opsonische Wirkung eines Normalserums sich aus seinem Komplementgehalt erklärt. Folgende Tatsachen sprechen für diese Auffassung:

Das Komplement ist thermolabil, das Wrightsche Opsonin ebenfalls. Nach Erhitzen von frischem Serum auf 58—60° hören sowohl Komplementwirkung als auch opsonische Wirkung auf. Andererseits lassen sich mit Opsonin alle Bindungsversuche anstellen, die bis jetzt mit Komplement gemacht worden sind. So sahen Muir und Martin, daß Bakterien und Erythrocyten, die mit spezifischem Ambozeptor vorbehandelt waren, gleichzeitig und in gleicher Weise Opsonin und Komplement eines gegebenen Normalserums binden. Behandelt man frisches Serum mit Hefe (Neufeld und Hüne), Zelldetritus oder Bakterien (Levaditi und Inmann) und zentrifugiert dann, so zeigt sich, daß diese sowohl Opsonin, als auch Komplement gleichmäßig stark absorbieren. Außer dem zeigen vergleichende Untersuchungen über die Verbreitung dieser beiden Prinzipien im Organismus (Blutserum, Ödemflüssigkeit, Kammerwasser) einen vollkommenen Parallelismus im Gehalt dieser Flüssigkeit an Komplement und Opsonin (Levaditi und Inmann). Schließlich bewirkt bei gewissen Tieren die Einspritzung von normalem oder inaktiviertem artfremden Serum die Bildung eines Antiopsonins, das von dem unter gleichen Bedingungen entstehenden Antikomplement nicht zu unterscheiden ist (Levaditi und Kössler[17b])). Übrigens läßt sich mit Opsonin das von Bordet und Gengou entdeckte Phänomen der Komplementablenkung demonstrieren (Neufeld und Hüne, Levaditi und Kössler).

Alle diese Daten zeigen, daß bei dem gegenwärtigen Stande unseres Wissens eine Trennung zwischen dem Komplement des Normalserums und dem Wrightschen Opsonin nicht durchführbar ist; wir besitzen keinerlei Anhaltspunkte dafür, daß das letztere ein aktives Prinzip sui generis ist. Man wird also richtigerweise von opsonischen Eigenschaften des frischen Blutserums und nicht von seinem Gehalt an „Opsonin" sprechen müssen und sich dem Mechanismus der Mitwirkung von Normalserum bei phagocytären Vorgängen folgendermaßen vorzustellen haben:

Das Komplement ist ein thermolabiler Körper, der in jedem Normalserum vorhanden ist und seine Wirkung auf zweierlei Weise äußert:

1. reaktiviert er den bakteriolytischen resp. hämolytschen Ambozeptor und bewirkt so das Zustandekommen von Bakterio- und Hämolyse; 2. außerdem spielt dasselbe Komplement vermöge gewisser Eigenschaften, die man als opsonische bezeichnet, eine Rolle bei der Phagocytose, deren Intensität durch die Wirkung des Komplements auf Bakterien gesteigert wird. Möglicherweise hat für den Mechanismus dieser „Opsonisierung“ auch der normale Ambozeptor eine gewisse Bedeutung, indem er die Bindung des Komplements an die der Phagocytose unterworfenen Bakterien begünstigt*).

C. Die Konstitution der Opsonine und ihre Wirkungsweise. Über die Konstitution des Opsonins liegen Untersuchungen von Hektoen und Ruediger[14]) vor. Diese Autoren stellten fest, daß Bakterien, die einmal mit opsoninhaltigem Normalserum behandelt sind, das Opsonin auch nach sorgfältigem Waschen und Zentrifugieren festhalten. Erhitzt man sie dann auf 58—60°, so werden sie nun nicht mehr phagocytiert; lassen sich aber trotzdem durch erneuten Zusatz von frischem Normalserum jetzt nicht mehr opsonisieren. Hektoen und Ruediger schlossen aus diesem Umstande auf eine komplexe Konstitution. Das Opsonin hat danach zwei wirksame Gruppen: eine haptophore, thermostabile und eine opsonophore, die durch Erwärmen über eine gewisse Temperatur zerstört wird. Durch Verlust dieser Gruppe beim Erwärmen der opsonisierten Bakterien wird nach der Ansicht von Hektoen und Ruediger das Opsonin in ein Opsonoid umgewandelt, analog dem Komplementoid. Diese Auffassung der Opsoninkonstitution ist von Bulloch und Atkin lebhaft angegriffen worden und harrt noch der experimentellen Nachprüfung.

Was die Art und Weise der Opsoninwirkung, ihren intimeren Mechanismus, anlangt, so befinden wir uns hier in einem höchst diffusen, an exakter Arbeit armen Vorstadium. Alles was sich zurzeit etwa sagen läßt ist dies, daß die Opsonine die Phagocytose nicht dadurch befördern, daß sie die Vitalität der Bakterien schädigen. Denn erstens findet man Opsonine in Seris, die keine nachweisbaren Mengen irgendwelcher bakterizider Substanzen mehr enthalten; zweitens aber binden tote Bakterien das Opsonin fast eben so gut, wie lebende**).

In Übereinstimmung mit Marchand und mit Hektoen sind wir der Ansicht, daß es sich bei der Opsonisierung um einen physikalisch-chemischen eventuell rein physikalischen Vorgang handelt, der sich an der Bakterienhülle abspielt und der seiner Natur nach höchstwahrscheinlich der Gruppe der proteolytischen Prozesse zugehört. Vielleicht spielen aber auch Änderungen der Salzkonzentration, Veränderung der Oberflächenspannung und dadurch bedingte Änderung der taktilen Bedingungen für den Phagocyten die Hauptrolle. Aber alle diese Vermutungen sind durchaus nur als solche anzusehen und demnach mit größter Reserve zur Deutung alter und neuer Versuchsbefunde heranzuziehen.

---

*) Auszug aus dem Artikel: Les opsonines, Levaditi, La Presse médicale 1907, Nr. 70, pag. 553.

**) In unseren Versuchen mit Bac. typhi, Streptokokken setzte die vorherige Erwärmung einer Kultur auf 60° das Bindungsvermögen der Bakterien herab, ohne es indes aufzuheben.

Technik der Opsoninuntersuchungen nach Wright*).

Jeder Opsoninversuch erfordert drei Faktoren: Leukocyten, Bakterien (oder Erythrocyten) und Serum. Wir zeigen im folgenden wie jeder einzelne in geeigneter Weise herzustellen resp. vorzubereiten ist.

I. Leukocyten:

a) Aus dem freien Kreislauf. Man füllt in ein kleines Reagenzglas einige Kubikzentimeter einer 1,5 $^0/_0$igen Lösung von Natriumzitrat in physiologischer (0,9 $^0/_0$iger) Kochsalzlösung. Mit einer spitzen Nadel, am besten aber mit einer unmittelbar vorher zur feinen Spitze ausgezogenen und deshalb sicher sterilen Glaskapillare sticht man einige Male leicht in die Dorsalfläche der Nagelphalanx eines Fingers; leichtes Umschnüren des letzteren mit einem Gummiband, Taschentuch oder dergl. erleichtert den Blutaustritt wesentlich. Die Blutstropfen läßt man sorgfältig in die Natriumzitratlösung eintropfen, ohne die Wand des Röhrchens damit zu beflecken, mischt ganz leicht und zentrifugiert mit möglichst wenig Kraftaufwand 10—15 Minuten. Das überstehende Plasma wird vorsichtig abgegossen, die zu Boden gesunkenen geformten Blutelemente mit physiologischer Kochsalzlösung bis zum vorigen Volumen aufgefüllt und wieder geschüttelt, bis die Flüssigkeit homogen erscheint. Dann wird wieder zentrifugiert und von dem entstandenen lockeren Kallus die überstehende Flüssigkeit sorgfältig abpipettiert, ohne daß neue Trübung entsteht. Neigt man jetzt das Röhrchen, so rutscht das Koagulum in toto nach der Öffnung hin, so daß man nun ohne weiteres die seine oberflächliche Schicht bildenden Leukocyten unmittelbar beim Versuch vom übrigen gleichsam abschöpfen kann.

b) Aus Exsudaten. Man verwendet hierzu entweder Peritonealexsudat von Meerschweinchen oder Pleuraexsudat von Kaninchen. Im ersten Falle injiziert man 5—10 ccm einer Mischung von Bouillon und physiologischer Kochsalzlösung zu gleichen Teilen intraperitoneal, tötet die Tiere einige Stunden darauf und saugt mit einer Kugelpipette das Exsudat ab, indem man sich vor allem an die abhängigen Partien, die Nierengegend, das große und kleine Becken usw. hält. Das Exsudat wird mit etwas Natriumcitratlösung (s. o.) verdünnt und dann wie angegeben weiter behandelt. Es empfiehlt sich zur Erzielung besonders zellreicher Exsudate statt Bouillon Emulsionen von Aleuronatbrei in Bouillon oder physiologischer Kochsalzlösung zu injizieren. Diese Emulsion wird vorher durch Erhitzen sterilisiert. Exsudate der Kaninchenpleura erzeugt man durch Injektion von 5—10 ccm der eben erwähnten Aleuronatemulsion oder von abgetöteter (durch Erhitzen auf 120°) Bouillonkultur von *Staphylococcus pyogenes* (alb. oder aur.). Die Injektionsnadel ist lang zu wählen und soll möglichst stumpf sein, damit keine Gefäße angestochen werden und dadurch etwa lästige Blutergüsse in den Pleurasack entstehen können. Nach 20 Stunden findet man in letzterem ein dickes, vorwiegend aus multinuklearen Leukocyten bestehendes Exsudat, das in der gleichen Weise wie Peritonealexsudat weiterbehandelt wird.

II. Herstellung der Bakterienemulsion.

Eine gute Bakterienemulsion für vorliegenden Zweck muß zwei Bedingungen erfüllen: sie darf nicht zu dick, und sie muß homogen

*) Wir geben vorstehend die von Wright und Douglas ausgearbeitete Methodik, als deren Vorläufer Leishmann[16]) angesehen werden muß.

sein; beides aus leicht einzusehenden Gründen. Die richtige Beschaffenheit einer Emulsion erkennt man daran, daß ein gewöhnliches Ausstrichpräparat die Individuen einzeln gelagert und im Gesichtsfeld leicht zählbar zeigt.

Die Emulsion wird in der Weise hergestellt, daß man mit einem Glasstab oder besser mit einer starkkalibrigen Platinöse etwas Material von einer Agarkultur an die trockene Innenwand eines Röhrchens mit physiologischer Kochsalzlösung bringt, jetzt das Röhrchen neigt, bis das Wasser das Viruskrümelchen eben erreicht und nun in dieser feinen Grenzschicht ordentlich verreibt bis ein dickrahmiger Tropfen entsteht, der sich nun in der Gesamtflüssigkeit durch Schütteln ganz gleichmaßig verteilt.

Wichtig ist die Wahl des Kulturmaterials. Am geeignetsten sind junge Agarkulturen unter 24 Stunden, ausgenommen natürlich diejenigen Bakterien, die nur auf Spezialnährböden gedeihen. Alte Kulturen und Bouillonkulturen (letzteres ist wenigstens für Typhus durch unsere Versuche sichergestellt) geben „spontane Phagocytose“, müssen also vermieden werden, wenn man Opsoninwirkungen studieren will. Für den Tuberkelbazillus (Höchst) im speziellen empfiehlt WRIGHT sterile 1,5 $^0/_0$ige Kochsalzlösung zur Emulgierung; der Überschuß an Salz verhindert die spontane Phagocytose.

III. Herstellung des Serums. Zur Gewinnung einer an sich kleinen, zum gewünschten Zweck aber völlig ausreichenden Menge Menschenserums empfiehlt WRIGHT das hier abgebildete kleine Glasinstrument, das man sich bei einiger Übung im Blasen ohne Schwierigkeiten selber herstellen kann (Fig. 8).

Fig. 8. Glasinstrument zur Serumgewinnung.

Unmittelbar vor dem Gebrauch wird das abgebogene Ende *a* an der Spitze abgebrochen; mit dem spitzen Ende *c* sticht man die leicht desinfizierte Haut, am besten des Fingerrückens, an und läßt den austretenden Blutstropfen bei *a* einfließen, was unter dem Einfluß der Kapillarität spontan erfolgt. Erreicht die kleine Blutsäule den Strich *r*, so dreht man das Röhrchen um, nachdem man durch einen leichten Nageldruck die äußerste zum Stechen benutzte Spitze bei *c* abgebrochen hat. Das Blut nimmt jetzt den Raum *b*—*c* ein; man schmilzt nun das eben abgebrochene Ende wieder zu und zentrifugiert das Röhrchen, indem man es mit dem gebogenen Ende bei *a* am Rande eines der gebräuchlichen Zentrifugengläschen einhängt. Die geformten Elemente sammeln sich im ausgezogenen Teil oberhalb *c* an, das darüberstehende klare Serum wird, nach Abbrechen des Röhrchens bei *r*, mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt.

Bei Tieren geschieht die Blutentnahme in der an einer anderen Stelle dieses Werkes beschriebenen gewöhnlichen Art und Weise.

Schließlich benötigt man zur Anstellung eines Opsoninversuchs kleiner Melangeure (Fig. 9), die man sich folgendermaßen herstellt:

Ein Stück Glasrohr von ca. 5 mm Weite und 8—10 cm Länge wird in seinem mittleren Teil im Gebläse bis zur Rotglut erweicht und außerhalb der Flamme zu einer annähernd 0,5 mm weiten Kapillare ausgezogen, was bei einiger Übung leicht gelingt. Man schmilzt in

der Mitte durch und hat nun zwei gleiche Röhrchen, die aus einem ca. 10 cm langen kapillaren Teil und einem kurzen weiten Ansatzstück bestehen. Beim Gebrauch schneidet man mit einem Glassmesser das geschlossene Ende der Kapillare weg, macht $1-1\frac{1}{2}$ cm von der gebildeten freien Öffnung (bei *a*) eine Marke mit dem Fettstift und versieht das dickere Ende (bei *c*) mit einem Gummisaughütchen (*g*).

Hat man so alles für den Versuch notwendige beisammen, kann zu diesem selbst geschritten werden.

g c d b a r

Fig. 9. Kapillarpipette für Opsoninversuche.

Durch leichten Druck auf das Gummihütchen *g* und allmähliches Nachlassen saugt man durch die feine Öffnung *r* der Kapillare nacheinander:

1. eine kleine Schicht von Leukocyten von *a—r*,
2. eine kleine Luftblase von ca. 1 mm Länge,
3. eine Schicht Serum, wieder von *a—r*,
4. ein ähnliches Luftbläschen, wie sub 2,
5. eine Schicht der Bakterienemulsion von *a—r* (Fig. 9).

Sodann werden die drei kleinen angesaugten Flüssigkeitszylinder durch sanften Druck auf *g* Tropfen für Tropfen auf einen sauber geputzten Objektträger entleert, dergestalt, daß ein einziger großer Tropfen entsteht, der durch vorsichtiges Hin- und Hersaugen gut durchgemischt und schließlich in toto wieder in die Kapillare eingesaugt wird, worauf man das Ende derselben in der Flamme schließt. Hat man dabei das Eintreten von Luftblasen vermieden, dann enthält jetzt das Röhrchen eine homogene Mischung von weißen (und roten)*) Blutkörperchen, Bakterien und Serum.

Damit die opsonisierende Wirkung des Serums eintrete, ist es notwendig, das hergestellte Gemisch für etwa $\frac{1}{4}$ Stunde in den Brutschrank (bei 37°) zu bringen. Zu dem Zweck werden kleine Thermostaten mit Metallregulator verwendet; sie enthalten 20 kleine (numerierte) Öffnungen, in die die Mischröhrchen mit der Spitze nach unten hineingestellt werden (Fig. 10).

Nach Ablauf der 15 Minuten wird das Röhrchen herausgenommen, die Spitze *r* abgebrochen und der Inhalt auf einen Objektträger entleert, wo er durch mehrfaches Hin- und Hersaugen, wie oben, abermals gut durchgemischt wird. Nun bringt man ein Tröpfchen davon auf einen anderen, vorher mit Schmirgelpapier tüchtig abgeriebenen Objektträger und verteilt es durch Ausstreichen mit einem schräg gehaltenen Deckgläschen bis zu dem einen Ende des Objektträgers; dabei sollen die Leukocyten in möglichst gleichmäßiger Schicht nach diesem Ende hin zu liegen kommen, weil dies die Zählung sehr erleichtert. Bei einigem Probieren lernt man diesen kleinen Handgriff sehr rasch. Das so her-

*) Trotz größter Vorsicht gelingt es nicht, die Leukocyten ganz frei von roten Blutelementen zu erhalten, was aber die Reaktion durchaus nicht beeinträchtigt.

gestellte Präparat wird an der Luft getrocknet, mit Sublimat oder Methylalkohol fixiert und gefärbt. Letztere Prozedur variiert je nach der vorliegenden Bakterienart. Für Streptokokken, Staphylokokken, Typhus und Coli empfiehlt sich das Borrelsche Karbolthionin (siehe „Phagocytose“ Bd. II des Werkes). Gute Bilder gibt auch die Leishmannsche Färbung: man bringt auf den beschickten Objektträger einige Tropfen einer Lösung von

0,15 Leishmannsches Farbpulver
100,00 Methylalkohol*)

verdünnt auf dem Objektträger mit der gleichen Menge destillierten Wassers und läßt die Farbflüssigkeit sich gleichmäßig ausbreiten.

Fig. 10. Thermostat für Opsoninversuche.

Für Tuberkelbazillen empfiehlt Wright folgendes Verfahren:

1. Fixieren in gesättigter Sublimatlösung 1 Minute,
2. Färben in Karbolfuchsin nach Ziehl-Nielsen,
3. Entfärben in $2\frac{1}{2}$ %iger Schwefelsäure,
4. Zerstören der roten Blutkörperchen durch 4 %ige Essigsäure,
5. Abspülen; Gegenfärben in Kühneschem Methylenblau.

Zählung: Opsonischer Index. Zur Feststellung des opsonischen Wertes eines gegebenen Serums bedient man sich der Methode der

*) Man bringt das abgewogene Pulver in einen Mörser und zerreibt es unter tropfenweisem Zusatz des Methylalkohols möglichst fein.

progressiven Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung. Sie gibt untereinander vergleichbare Resultate und ist von Hektoen und von uns selber mit gutem Gelingen angewendet worden.

Die Intensität der Phagocytose wird beurteilt, indem man die in 100 Leukocyten eingeschlossenen Bakterien zählt und das Mittel pro Leukocyt berechnet. Hat man also in 100 beliebig gewählten Leukocyten 224 Bakterienindividuen gezählt, so ist die für die Intensität der Phagocytose und damit für den opsonischen Wert des untersuchten Serums maßgebende Zahl = 2,24. Für den Vergleich solcher Zahlenwerte untereinander ist natürlich Voraussetzung, daß man stets die gleiche Bakterienemulsion verwendet, da die Stärke der Phagocytose von der absoluten Zahl der reagierenden Bakterien beeinflußt wird.

Um den „opsonischen Index" (Wright) zu finden, stellt man erst die Durchschnittszahl (pro Leukocyt) der phagocytierten Bakterien für frisches Normalserum (Serum eines gesunden Menschen, besser ein Gemisch mehrerer solcher Sera) fest, sodann den entsprechenden Wert für das zu untersuchende Opsoninserum. Der Quotient beider Zahlen ist der gesuchte opsonische Index. Es sei z. B.

2,60 die Durchschnittszahl phagocyt. Bakterien im gesunden,
1,60 „ „ „ „ „ zu bestimmenden Serum,

dann ist der opsonische Index $= \frac{1,60}{2,60} = 0,74.$

Literatur.

1a) Baecher, Zeitschr. für Hygiene 1907, Bd. LVI, pag. 33.
1) Bordet, Société royale des sciences médicales et naturelles de Belgique 1895, Vol. IV.
2) Bulloch, Trans. of the Pathol. Society of London, 1905, Vol. LVI, pag. 334.
3) Ders., The Practitioner. November 1905.
4) Bulloch und Aktin, Proceeding of the Royal Society of London. Vol. LXXIV, pag. 379.
5) Dean, Proceeding of the Royal Society of London 1905, Vol. LXXVI, pag. 506.
6) Denys und Leclef, La Cellule 1895, Vol. XI, pag. 177. Fasc. I.
7) Denys und Mennes, Ann. de l'Acad. de Medecine de Belgique 1897. Juni.
8) Gabritschewsky, Ann. de l'Inst. Pasteur 1894, Vol. X, pag. 673.
9) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1896, Vol. X, pag. 630.
10) Gruber und Futaki, Fr. Verein. für Mikrobiolog. Berlin 1906. Juni. Ref. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XXXVIII, pag. 11 (Beiblatt).
11) Dies., Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 6. pag. 249.
12) Hektoen, Proceedings of the New York Pathol. Society 1906, Vol. VI. Februar.
13) Ders., Journal of Inf. Diseas, 1906, Vol. III, Nr. 3, pag. 434.
14) Hektoen und Ruediger, Journal of Inf. Diseas 1905, Vol. II, pag. 128.
15) Horton, Trans. Chicago Pathol. Society 1905, Vol. VI, pag. 297 (zitiert nach Hektoen).
16) Leishmann, Brit. med. Journal 1902. Januar.
17) Levaditi, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Tome XVI, pag. 233.
17a) Levaditi und Inmann, Compt. rend. de le Soc. de Biologie 1907, Vol. LXII, pag. 683, 725, 817, 869.
17b) Levaditi und Kössler, Compt. rend. de la Soc. de Biologie 1907, Vol. LXII, pag. 685.
18) Löhlein, Ann. de l'Inst. Pasteur 1906, Vol. XX, pag. 939. November.
19) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, Vol. XXI, pag. 647. Oktober.
20) Ders., Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XXXVII, pag. 32. Beiheft.
21) Marchand, Arch. de Méd. expérimentale 1898, Nr. 2, pag. 253. März.

22) Metschnikoff, Virchows Archiv 1887.
23) Ders., L'Immunité dans les maladies infectieuses 1901. Paris, Masson.
24) Ders., Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann, pag. 375.
25) Mennes, Zeitschr. für Hygiene 1897, Bd. XXV, pag. 413.
26) Muir, British med. Journ. 1906, Nr. 2399. Dezember.
27) Neufeld und Rimpau, Deutsche med. Wochenschr. 1904, Bd. XXX, pag. 1458, Nr. 28. Zeitschr. für Hygiene, Bd. LI, pag. 283.
28) Neufeld und Töpfer, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII, Fasc. 4, pag. 456. Originale.
28a) Neufeld und Hühne, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. XXV, Fasc. 1.
29) Sawtschenko, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Vol. XVI, pag. 106. Nr. 2.
30) Sawtschenko und Melkich, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Vol. XV, pag. 497, Nr. 7.
31) Smith, Proceedings Linnean Soc. of New South Wales 1905, IV. Teil. November. (Nach Bull. de l'Inst. Pasteur 1906. pag. 687.)
32) Tarassééwitch, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Vol. XVI, pag. 137.
33) Wright, The Lancet 1902. 29. März.
34) Ders., Clin. Journal 1904. November.
35) Ders., Brit. med. Journal 1903. Mai.
36) Ders., Brit. med. Journal 1904. Mai.
37) Ders., Kurze Abhandlung über Antityphusinokulationen. Jena 1904. Fischer.
38) Wright und Douglas, Proceedings of the Royal Society, Tome LXXII, pag. 352.
39) Dies., Proceedings of the Royal Society 1904, Tome LXXIII, pag. 128.
40) Dies., Proceedings of the Royal Society 1904, Tome LXXIV, pag. 147.
41) Wright und Reid, Proceedings of the Royal Society 1906, Tome LXXVII, pag. 194.

XIX.

Bakteriolytische Sera*).

Von

Dr. A. Böhme

in Frankfurt a. Main.

Einleitung.

Bereits das Serum normaler Tiere besitzt die Fähigkeit, Bakterien aufzulösen und auf die Weise unschädlich zu machen. Diese Fähigkeit kann — wenigstens in vielen Fällen — erheblich gesteigert werden durch vorangehende Immunisierung mit der betreffenden Bakterienart. Man bezeichnet mit dem Namen „bakteriolytischer Immunsera" im engeren Sinne nur solche Sera, deren bakteriolytisches Vermögen gegenüber einer bestimmten Bakterienart im Vergleich zum Normalserum durch die vorangehende Immunisierung gesteigert ist, wie das Cholera-, Typhusserum u. a.

Meist identifiziert man den Begriff des bakteriolytischen und bakteriziden Serums; streng genommen decken sich diese Bezeichnungen nicht. Es ist sehr wohl möglich, daß ein Serum Bakterien abzutöten vermag, ohne daß diese gerade das typische Bild der Bakteriolyse zeigen, es sind andererseits manche bei der Bakteriolyse zu beobachtenden Umwandlungen anscheinend noch mit dem Leben der Bakterien vereinbar.

I. Nachweis der Bakterienabtötung.

Zum Nachweis des Untergangs der Bakterien stehen uns folgende Methoden zur Verfügung:

1. der morphologische Nachweis des Bakterienzerfalls,
2. das kulturelle Verfahren:
   a) die Zählung der eingeführten und der nach einer bestimmten Zeit noch vorhandenen vermehrungsfähigen Bakterien,
   b) der Nachweis, daß während des Lebens der Bakterien sich abspielende chemische Prozesse (z. B. Reduktionen) nachlassen oder aufhören (bioskopisches Verfahren).

---

*) Diesen Abschnitt hatte ursprünglich Herr Prof. M. Neisser übernommen, der ihn in Übereinstimmung mit den Herausgebern dem Verfasser übertragen hat. Ich hatte mich bei der Bearbeitung dauernd der freundlichen Unterstützung des Herrn Professor Neisser zu erfreuen. A. Böhme.

Die Methode 1 führt den Nachweis der Bakteriolyse, die beiden andern zeigen die Bakterizidie an.

Die Bakteriolyse bzw. Bakterizidie kann sowohl im Organismus wie außerhalb desselben gezeigt werden. Der Gang der Untersuchung kann sich je nach dem Einzelfalle verschieden gestalten. Es haben außerdem die entgegengesetzten Anschauungen über das Zustandekommen der Bakteriolyse zur Ausbildung besonderer Methoden geführt.

Es sei vorweg genommen, daß die spezifische Bakteriolyse durch das Zusammenwirken zweier Komponenten zustande kommt, des immunisatorisch erzeugten oder durch die Immunisierung vermehrten Immunkörpers (Ambozeptor, Zwischenkörper) und des bereits im normalen Serum vorhandenen Komplements (Alexin, Addiment, Cytase). Die Methodik zum Nachweis der Bakteriolyse durch Immunserum außerhalb des tierischen Organismus muß diesem Umstand Rechnung tragen.

Im übrigen kommen für die Untersuchung der Bakteriolyse im normalen und im immunisierten Organismus bzw. durch Normalserum und durch Immunserum prinzipiell die gleichen Methoden in Betracht.

A. Morphologischer Nachweis der Bakteriolyse.

Der PFEIFFERsche Versuch.

Das Phänomen der spezifischen Bakteriolyse ist im Jahre 1894 von R. Pfeiffer (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XVIII) entdeckt worden, als er mit dem Studium der Immunität gegen Cholera sich beschäftigte. Bereits im Jahre 1893 hatten Pfeiffer und Wassermann (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XIV) festgestellt, daß in der Bauchhöhle aktiv wie passiv gegen Cholera immunisierter Meerschweinchen die Vibrionen sehr viel rascher zugrunde gehen als bei normalen Tieren. Es war schon damals die bakterizide Wirkung des Serums erkannt worden. In keinem später untersuchten Fall zeigt sich das Bild der raschen Bakterienauflösung klarer, als gerade hier bei der intraperitonealen Infektion von Meerschweinchen, die vorher gegen Cholera aktiv immunisiert sind, oder denen gleichzeitig mit dem Virus Choleraimmunserum eines anderen Tieres in die Bauchhöhle gespritzt wird. Der Besprechung des Versuchs sei deshalb auch das Beispiel zugrunde gelegt, das Pfeiffer in einer Reihe von Arbeiten ausführlich geschildert hat (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XVIII, ebenda Bd. XIX, pag. 75, ebenda Bd. XX, pag. 198): Ein Meerschweinchen von etwa 200 g Gewicht erhält eine intraperitoneale Injektion von 1 Öse virulenter Choleravibrionen und einer kleinen Menge (etwa 1 mg) eines stark wirksamen Anticholeraserums, die zusammen in 1 ccm Bouillon aufgeschwemmt sind. Mit Hilfe von Glaskapillaren werden in Zwischenräumen kleine Mengen des Peritonealinhaltes entnommen und im hängenden Tropfen mikroskopisch untersucht. Die unmittelbar nach der Injektion noch lebhaft umherschwärmenden Vibrionen verlieren in wenigen Minuten ihre Beweglichkeit; bald darauf lassen sie Formveränderungen erkennen, sie quellen auf, werden oval, um schließlich in stark lichtbrechende kuglige Gebilde (Granula) sich umzuwandeln, die gelegentlich noch deutliche Eigenbewegung zeigen. Die Kugelformen werden allmählich blasser, verlieren ihre scharfe Begrenzung sowie die Färbbarkeit mit Anilinfarben, die ihnen bis dahin noch eigen war, und entschwinden schließlich ganz der Beobachtung. Innerhalb 20 Minuten kann sich in typischen Fällen diese ganze Skala der Veränderungen vollziehen, die zu einer vollständigen Auflösung der Bakterien, zur Bakteriolyse, führt. Das infizierte Tier

ist auf diese Weise der Infektion Herr geworden, es kann vorübergehende Vergiftungserscheinungen zeigen, erholt sich aber wieder und lebt am nächsten Tage, während das Kontrolltier, das 1 Öse Cholerakultur in 1 ccm Bouillon ohne Zusatz von Immunserum erhalten hatte, mittlerweile der allgemeinen Infektion erlegen ist. Ganz die gleichen Erscheinungen wie bei der Injektion eines Gemisches von Cholerakultur und Anticholeraserum bieten sich dar, wenn einem aktiv gegen Cholera immunisierten Meerschweinchen 1 Öse virulenter Choleravibrionen ohne Serumzusatz intraperitoneal injiziert wird: rasche Bakteriolyse und Überleben des Versuchstieres.

Auch im gefärbten Ausstrichpräparat läßt sich die Auflösung der Bakterien darstellen. Radziewsky färbt mit Methylenblau Kühne oder mit im Verhältnis 1:30 verdünntem Ziehlschen Karbolfuchsin eine Stunde lang, gelegentlich auch mit Anilinwassergentianaviolett eine Stunde.

Die in Auflösung begriffenen Bakterien verlieren bald ihre Färbbarkeit durch Methylenblau, während sie durch Karbolfuchsien und Anilinwassergentianaviolett noch gefärbt werden. Die Granula sind färberisch immer nur zum Teil darstellbar, das gefärbte Präparat gibt daher nicht ein so klares Bild von der Stärke der Bakteriolyse wie der hängende Tropfen. (Radziewsky, Zeitschr. f. Hyg., Bd. XXXVII und A. Wolff, Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 17—20.)

Die Bakteriolyse in der Bauchhöhle des aktiv oder passiv immunisierten Meerschweinchens ist spezifisch, d. h. es wird bei Innehaltung der von R. Pfiffer angegebenen Versuchsanordnung in der Bauchhöhle eines aktiv immunisierten Tieres nur die Bakterienart aufgelöst, mit der das Tier vorbehandelt ist; bei passiver Immunisierung findet die Bakteriolyse ebenso nur bei Anwendung des gegen die gleiche Bakterienart gerichteten bakteriolytischen Serums statt.

Einfluß der Virulenz und der Menge des zum Versuch verwandten Bakterienstammes.

Auch in der Bauchhöhle normaler Meerschweinchen lassen sich ohne Mitwirkung von Immunserum Auflösungsprozesse an künstlich eingebrachten Choleravibrionen beobachten. Die Prozesse, die sich hier abspielen, sind von R. Pfeiffer und Wassermann (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XIV) und in den spätereren Arbeiten Pfeiffers geschildert worden.

Wenn die Injektionsdosis unterhalb der Dosis let. min. liegt, so werden die Bakterien in der gleichen nur langsameren Weise wie im Pfeifferschen Versuch aufgelöst. Auch bei Injektion größerer Bakterienmengen lassen sich geringe Auflösungserscheinungen feststellen, es überwiegt bei weitem aber die Bakterienvermehrung, die schließlich zum Tode des Tieres führt. Die Bakterienmenge, die noch vollständig aufgelöst wird, ist je nach der Virulenz der verwandten Kultur sehr verschieden. Sie kann bei sehr virulenten Stämmen unter $^1/_{10}$ mg (= $^1/_{20}$ Öse) Agarkultur liegen, von avirulenten Kulturen kann selbst 1 Öse rasch aufgelöst werden.

Die normale Bakteriolyse zeigt sich in dieser Weise nicht nur gegen Choleravibrionen, sondern auch gegen andere Vibrionen und selbst ganz andersartige Bakterien. Auch Coli-, Typhusbazillen u. a. zerfallen unter ähnlichen Erscheinungen in der Bauchhöhle normaler Meerschweinchen, wenn auch noch langsamer.

Im Gegensatz zur Bakteriolyse des normalen Tieres vermag die Bakteriolyse im aktiv oder passiv immunisierten Tier Bakterienmengen aufzulösen, die die Dosis let. min. für das Normaltier erheblich überschreiten. Um die spezifische Bakteriolyse durch ein Immunserum zur Anschauung zu bringen, sind daher Bakterienmengen zu nehmen, die wesentlich oberhalb der einfachen tödlichen Dosis liegen. In der Bauchhöhle eines Normaltieres, das die gleiche Vibrionenmenge ohne Immunserum erhält, wimmelt es nach einiger Zeit von lebhaft beweglichen Vibrionen, während in der Bauchhöhle des immunisierten Tieres die Bakterien zur gleichen Zeit schon völlig aufgelöst sind.

Die Schutzwirkung des Serums erstreckt sich jedoch nicht gegen beliebig große Bakterienmengen. Wenn die Menge von 2,5—5 mg überschritten wird, so erliegt das Tier trotz Anwendung von großen Serummengen, und zwar ist es hier gleichgültig, ob die Vibrionen lebend oder tot sind. Choleravibrionen, die vorsichtig mit Chloroform abgetötet sind, wirken ebenfalls in einer Menge von 2,5—5 mg tödlich, auch bei gleichzeitiger Anwendung hoher Serumdosen (Pfeiffer, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XIV, Pfeiffer und Wassermann, ebenda Bd. XIV, Pfeiffer, ebenda Bd. XVI). Das Tier erliegt also nicht der Infektion, sondern der Giftwirkung der in den Leibern der Choleravibrionen enthaltenen Gifte (Endotoxine). Der Versuch beweist zugleich, daß das bakteriolytische Choleraserum kein antitoxisches Vermögen hat. Es sei erwähnt, daß in analog angestellten Versuchen manche nach besonderen Methoden hergestellten Anticholerasera eine antitoxische Wirkung zeigen. Vgl. Kraus, dieses Handb., Bd. I, pag. 204.

Da die im Pfeifferschen Versuch zu verwendende Bakterienmenge die einfach tödliche Dosis überschreiten, andererseits unterhalb 2,5 mg liegen muß, so folgt daraus, daß (wenigstens für den typischen Versuch) nur Kulturen von erheblicher Virulenz benutzt werden können. Pfeiffer schreibt vor, eine Öse (ca. 2 mg) einer Kultur zu nehmen, deren Dosis let. min. $^1/_5$—$^1/_{10}$ mg beträgt (Normalöse). Die Dosis let. min. definiert Pfeiffer als diejenige kleinste Menge, die ein Meerschweinchen von 200 g innerhalb 24 Stunden noch mit Sicherheit tötet. Marx (Diagnostik, Serumtherapie und Prophylaxe der Infektionskrankheiten, Berlin, Hirschwald) fordert, daß das zehnfache der tödlichen Dosis einer virulenten Kultur injiziert wird. Die erforderliche Virulenz besitzen Stämme, die frisch aus der Leiche oder aus den Dejektionen Cholerakranker herausgezüchtet sind, oder die durch wiederholte Meerschweinchenpassage wieder virulent geworden sind. Neuerdings fordert Pfeiffer, wenn es sich lediglich um die Identifizierung einer Kultur handelt, nur eine geringere Virulenz (s. unten). Auch die Abänderungsvorschläge zur amtlichen Vorschrift begnügen sich jetzt mit einer Virulenz von 1 Öse.

Einfluß der Stärke und der Menge des Immunserums.

Ebenso wie von der Virulenz und der Menge des Bakterienstamms ist der Ausfall des Versuchs auch abhängig von dem Wirkungsgrad und der Menge des angewandten Immunserums. Bereits in der normalen Bauchhöhle findet ohne Serumzusatz, wie betont, eine gewisse Bakteriolyse statt. Zusatz von normalem Serum kann diese noch steigern, zum Teil sogar sehr stark. Die Sera der verschiedenen Tiere verhalten sich in dieser Hinsicht recht verschieden. So wird nach Kolle (Klin. Jahrb. 1903) im Meerschweinchen-Peritoneum eine Öse virulenter Cholera aufgelöst durch

0,005—0,01 ccm	normales	Pferdeserum
0,01 —0,02 ccm	„	Eselserum
0,02 —0,03 ccm	„	Ziegenserum
0,1 —0,3 ccm	„	Kaninchenserum.

Diese Bakteriolyse durch Normalserum ist unspezifisch, d. h. es können durch das Normalserum nicht nur Choleravibrionen, sondern auch andere Vibrionenarten bzw. ganz differente Bakterienarten aufgelöst werden.

Zur Anstellung des Pfeifferschen Versuches bedarf es daher eines hochwertigen spezifischen Immunserums, das in erheblich geringerer Dosis als das Normalserum des betreffenden Tieres die Bakteriolyse herbeiführt. Man wird zur Serumgewinnung zweckmäßig solche Tiere benutzen, deren Normalserum nur geringe lytische Kraft hat. Für Choleravibrionen empfiehlt sich die Wahl von Kaninchen. Der Gehalt eines Serums an bakteriolytischen Immunkörpern, der „bakteriolytische Titer“ des Immunserums, läßt sich genau bestimmen.

Pfeiffer (Deutsche med. Wochenschr. 1894 pag. 898) bezeichnet als Titer eines bakteriolytischen Serums oder als Immunitätseinheit (I.-E.) diejenige geringste Menge, welche gerade ausreicht, 2 mg (= 1 Öse) des Normalvirus (Virulenz $^1/_5$—$^1/_{10}$ mg) innerhalb einer Stunde zur völligen Auflösung zu bringen und das Tier am Leben zu erhalten. Die Stärke des Serums wird häufig auch in der Weise bezeichnet, daß man die Zahl von Immunitätseinheiten angibt, die in 1 ccm enthalten sind. Ein Serum vom Titer 1 mg enthält also 1000 Immunitätseinheiten pro ccm.

Da auch die Größe des Versuchstieres von Bedeutung für dessen Widerstandsfähigkeit ist, so schreibt Pfeiffer vor, junge Meerschweinchen von 200 g Gewicht zu benutzen. Um den Titer eines in seiner Wirksamkeit noch nicht bekannten Serums zu bestimmen, werden mehrere Serumbouillongemische von verschiedenem Serumgehalt auf ihr bakteriolytisches Vermögen geprüft; es werden also etwa folgende Verdünnungen hergestellt:

1.	10 mg	Immunserum	in	1 ccm	Bouillon
2.	1 „	„	„	1 „	„
3.	$^1/_{10}$ „	„	„	1 „	„

Diese Mischungen werden, mit je einer Öse virulenter Kultur versetzt, je einem Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. Wenn Verdünnung 2 völlige Bakteriolyse innerhalb einer Stunde hervorbringt und das Tier vor dem Tode schützt, Verdünnung 3 diese Wirkung nicht mehr hat, so liegt der Titer des Serums zwischen 1 mg und $^1/_{10}$ mg. Durch die Untersuchung von Verdünnungen swischen 1 mg und $^1/_{10}$ mg läßt sich dann der Titer noch genauer bestimmen. Ein Beispiel der Wertbestimmung sei mitgeteilt (aus Pfeiffer, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XVIII).

(Siehe Tabelle pag. 371.)

Das Gesetz der Multipla gilt für bakteriolytische Sera nicht.

Innerhalb gewisser Grenzen — von der Dosis let. min. der lebenden bis zur Dosis let. min. der toten Bakterien — bestehen allerdings Beziehungen zwischen der Injektionsmenge und der zur Auflösung eben erforderlichen Serummenge (Pfeiffer und Wassermann, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XIV, pag. 46). Nähert sich die Infektionsmenge der tödlichen „Giftdosis“, so kann es vorkommen, daß völlige Bakteriolyse eintritt, die Bauchhöhle auch kulturell steril ist, das Tier aber der Vergiftung erliegt (R. Pfeiffer, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XIX). Bei

Bestimmung des Wirkungswertes des Serums choleraimmuner Meerschweinchen nach der Mischungsmethode.

Nr.	Gewicht g	Virusdosis	Serumdosis ccm	Erfolg	Bemerkungen
I	320	1 Öse Cholera = 2 mg + 1 ccm Bouill.	0,05	Tier bleibt gesund	Schon nach 15 Minuten im Bauchhöhlenexsudat nur noch Granula.
II	240	do.	0,02	do.	Nach 20 Minuten in Granula umgewandelt.
III	200	do.	0,006	do.	Nach 35 Minuten Peritonealexsudat steril.
IV	220	do.	0,003	do.	Nach 25 Minuten sehr zahlreiche Granula, vereinzelte unbewegliche Vibrionen. Nach 1 Stunde Vibrionen verschwunden.
V	220	do.	0,001	Starb im Laufe der Nacht	Nach 25 Minuten zahlreiche Körnchen, aber noch viel wohl erhaltene und bewegliche Vibrionen. Nach 50 Minuten derselbe Befund. Nach 100 Minuten nur noch zahlreiche lebhaft bewegliche Vibrionen.
VI	230	do.	0,0005	Starb in der Nacht	Nach 25 Minuten spärliche Granula, reichlich lebhaft bewegliche Vibrionen. Von da ab progressive Vermehrung der Kommabazillen.

Kontrollversuch:

Nr.	Gewicht	Virusdosis	Serumdosis	Erfolg	Bemerkungen
VII	200	1 Öse Cholera	0,2 ccm normales Meerschweinchenserum	Starb in der Nacht	Nach 25 Minuten im Bauchhöhlenexsudat viel wohl erhaltene und bewegliche Vibrionen, spärliche Granula. Sektionsresultat: Eiterflocken auf der Leber, sehr viel Vibrionen, meist frei im Exsudat, daneben Granula frei und in Zellen.

weiterer Steigerung der Impfmenge läßt sich auch durch größere Serummengen nicht mehr eine völlige Bakteriolyse herbeiführen. Neben zerfallenden Vibrionen sind immer zahlreiche intakte vorhanden, die sich rasch vermehren und schließlich das Tier töten.

Sehr virulente Cholerakulturen brauchen bei gleicher Injektionsmenge (1 Öse) mehr Serum zu ihrer Auflösung als weniger virulente. Die Titerprüfung eines Serums muß daher stets mit Stämmen möglichst gleicher Virulenz ($^1/_5$—$^1/_{10}$ Öse) vorgenommen werden.

Injektionstechnik.

Das Versuchstier wird von einem Assistenten gehalten, der es mit zwei Händen fest im Nacken und an den Hinterbeinen faßt und strafft ausspannt, dabei die Bauchseite des Tieres nach oben hält. Das Tier ist auf diese Weise ruhig gestellt und für den Experimentator in eine bequeme Lage gebracht. Will man ohne Assistenz arbeiten, so kann man das Tier auf einen besonderen Halter aufspannen (Lautenschläger u. a. liefern solche).

Klebs (Deutsche med. Wochenschr. 1892) umwickelt die Tiere fest mit einer Flanellbinde, nur der mittlere Teil der Bauchhaut bleibt frei. Hierdurch ist ebenfalls das Tier völlig ruhig gestellt.

Voges (zitiert nach Friedberger, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIX) steckt den Vorderkörper der Meerschweinchen in eine Blechdose mit durchlochtem Boden. Der Durchmesser der Hülse muß der Größe des Tieres möglichst genau entsprechen, um eine genügende Fixierung zu ermöglichen. Es bedarf daher eines ganzen Satzes von Hülsen.

Friedberger (Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIX, pag. 718) fixiert Kopf und Brust des Tieres in einer linksseitigen Tasche des Laboratoriummantels. Das Tier wird kopfüber bis zum Abdomen in die Tasche gesteckt mit der Bauchseite links, dann horizontal gestellt und leicht nach rechts gedreht. Auf diese Weise wird der Vorderkörper in der Tasche fixiert; die Hinterbeine werden zwischen Ring- und Mittelfinger der linken Hand geklemmt, während Daumen und Zeigefinger die Einstichstelle fixieren. — Es gelingt übrigens auch ohne Schwierigkeit, das Tier in folgender einfacher Weise zu fixieren. Es wird mit der linken Hand an den Hinterbeinen gefaßt, der Kopf zwischen Brust und linken Unterarm geklemmt, dann wird durch eine Dorsalbewegung im Handgelenk das Tier über die Handwurzel ausgespannt.

Die Injektion geschieht mit der mit einer stumpfen Kanüle armierten Kochschen Spritze. Zweckmäßig wird die Bauchhaut des Tieres geschoren oder es werden die Haare an der Injektionsstelle ausgerissen, dann wird die Haut an einer kleinen Stelle mit einem Scherenschlage oder auch einem kleinen Messerschnitt durchtrennt, etwas gegen die Muskulatur verschoben und nun die Kanüle stumpf durch die Muskulatur gestoßen. Nach der Injektion und dem Zurückziehen der Spritze verschiebt sich die Haut wieder und schließt so die Einstichstelle dicht ab. Man kann auch mit nicht allzuspitzer Kanüle die intakte Haut durchbohren, indem man sie samt der Muskulatur in einer Falte emporhebt und nun durch beide Schichten direkt in die Bauchhöhle eingeht. Um diese sicher zu treffen, empfiehlt Sobernheim (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XX) die Falte quer zu durchstoßen, so daß die Nadel auf der anderen Seite der Falte heraussieht, und sie dann langsam zurückzuziehen, bis die Spitze in der Peritonealhöhle ist. Ein Anstechen der Därme läßt sich meist vermeiden.

Stephenson und Bruce (Centralbl. für Bact., I. Abt. Bd. IX) benutzen eine gekrümmte Ansatznadel, an deren Konvexität die Ausflußöffnung liegt. Die Nadel wird quer durch eine Hautperitonealfalte gestoßen, so daß die Spitze auf der gegenüberliegenden Seite herausragt, die Öffnung in der Falte liegt; die Falte wird losgelassen und die Injektionsflüssigkeit eingespritzt.

Friedberger (Centralbl. für Bakt., I. Abt. Bd. XXXIX, pag. 718) benutzt eine „Spritze aus einem Stück". Das vordere Ende einer Pravaz-

spritze ist zu einem etwa 2 cm langen dünnen Rohr ausgezogen, das vorn abgeschrägt und stumpf geschliffen ist. Ein seitliches Austreten des infektiösen Spritzeninhalts, wie es bei anderen Spritzen an der Ansatzstelle leicht vorkommt, ist ausgeschlossen. Um den Spritzeninhalt vollständig zu injizieren, empfiehlt es sich, vor dem Aufsaugen der zu injizierenden Flüssigkeitsmenge etwas Luft einzuziehen, und damit nachher den letzten Rest der Flüssigkeit auszudrücken.

Beobachtung der Bakteriolyse.

Die Beobachtung der in der Bauchhöhle sich abspielenden Vorgänge geschieht durch in bestimmten Zwischenräumen wiederholte Entnahme von Peritonealflüssigkeit mit Hilfe kleiner durch die Muskulatur stumpf durchgestoßener Glaskapillaren. (Issaeff, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XVI, pag. 287, 1894.)

Nach 10, 20, 30 Minuten usf. wird je eine kleine Exsudatprobe entnommen und im hängenden Tropfen, daneben eventuell auch im gefärbten Präparat, untersucht. Nach Ablauf einer Stunde dürfen sich Bakterien nicht mehr vorfinden, die Bakteriolyse muß komplett sein, und die Tiere müssen nach 24 Stunden am Leben sein, während Kontrolltiere, die nur Kultur bekommen haben, oder Kultur und die gleiche oder selbst eine größere Menge Normalserum, nach einer Stunde massenhaft bewegliche Vibrionen in ihrer Bauchhöhle beherbergen und nach 24 Stunden der Infektion erlegen sind.

Nicht so selten findet man beim Pfeifferschen Versuch einige mit den injizierten Bakterien beladene Phagocyten. Bei der typischen Anordnung des Pfeifferschen Versuchs Choleravibrionen gegenüber tritt diese Phagocytose nur wenig hervor, die extracelluläre Lyse ist abgelaufen, ehe nennenswerte Leukocytenmengen in die Bauchhöhle übergetreten sind.

Etwas reichlicher tritt die Phagocytose in Erscheinung, wenn die Serummenge so gering bemessen ist, daß Auflösungs- und Vermehrungserscheinungen längere Zeit Hand in Hand gehen. Hier finden die Leukocyten bei ihrem Eindringen in die Bauchhöhle noch genug Vibrionen vor, und es gelangen so auch Phagocytose und intracelluläre Auflösungserscheinungen zur Geltung. (A. Wolff, Berliner klin. Wochenschr. 1903, Heft 17—20.)

Bei Coli-, Typhus- und Paratyphusbazillen, die an sich nur langsam aufgelöst werden, können Phagocytose-Erscheinungen auch im hängenden Tropfen etwas häufiger beobachtet werden.

Gruber hat ferner darauf aufmerksam gemacht (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XV), daß das Verschwinden der Vibrionen aus der freien Bauchhöhle beim Pfeifferschen Versuch zum Teil auch dadurch bedingt sein kann, daß erhebliche Mengen von Vibrionen sich auf dem Peritoneum, besonders dem Netz, niederschlagen und dort zum großen Teil phagocytiert werden. Diese Vorgänge lassen sich genauer erst übersehen, wenn das Tier seziert wird und Ausstrichpräparate von dem dem Netz anhaftenden Exsudat angefertigt werden. An dem Pfeifferschen Phänomen selbst und seiner großen diagnostischen Bedeutung wird durch diese Befunde nichts geändert.

Im Allgemeinen überleben die Tiere, in deren Bauchhöhle sich ausgesprochene Bakteriolyse gezeigt hat, den Versuch, während die Kontrolltiere innerhalb 24 Stunden sterben. Daß bei Verabfolgung zu

großer Bakterienmengen die Tiere trotz völliger Bakteriolyse sterben können — Gifttod — ist bereits früher erwähnt worden. Aber auch bei technisch richtiger Ausführung des Versuches kommt es in einzelnen Fällen dazu, daß ein Meerschweinchen trotz ausgesprochener Bakteriolyse noch später — meist erst nach einigen Tagen — stirbt. (Kolle und Meinicke, Klin. Jahrb. 1905.) Sehr viel häufiger ist ein solcher Spättod bei der Ausführung des Versuches mit Typhus- oder Paratyphuskulturen zu beobachten.

Unter sorgfältiger Beobachtung der von Pfeiffer aufgestellten Regeln fällt der bakteriolytische Versuch ganz eindeutig aus; die gelegentlichen Mißerfolge, die nach Pfeiffers ersten Veröffentlichungen mitgeteilt wurden, beruhten auf Verstößen gegen die Vorschriften; besonders ungenügende Virulenz der benutzten Kultur führt leicht zu Täuschungen.

Gegen die Spezifität des Pfeifferschen Versuchs sind von Klein (Centralbl. für Bakt. 1893, Bd. XIII), Sobernheim (Hyg. Rundschau 1893, pag. 997), C. Fränkel und Sobernheim (ebenda 1894, pag. 97, 145), C. Fränkel (ebenda pag. 577) Versuche ins Feld geführt worden, deren Ergebnis später als „Resistenzphänomen" erklärt worden ist. Tiere, die intraperitoneal mit untertödlichen Dosen von lebenden oder toten Bakterien behandelt werden, vertragen danach Dosen der gleichen und anderer Bakterienarten, die bei unbehandelten Tieren den Tod herbeiführen. Pfeiffer (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XVI, pag. 268) und Issaeff (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XVI, pag. 287) konnten zeigen, daß eine gleiche Erhöhung der Widerstandsfähigkeit, der „Resistenz", auch durch die Injektion von physiologischer Kochsalzlösung, Bouillon, Harn, Blutserum, Nukleinlösung, Tuberkulin hervorgerufen wird. Durch eine solche Injektion wird ein mit seröser Exsudation und Leukocytenansammlung einhergehender Reizzustand hervorgerufen, der eine größere Widerstandsfähigkeit gegen eingebrachte Bakterien bedingt. Diese Resistenzerhöhung ist unspezifisch, unterscheidet sich auch sonst wesentlich von der spezifischen bakteriolytischen Immunität. Sie besteht meist nur gegenüber verhältnismäßig geringen Bakteriendosen. Sie währt nur so lange, als die Peritonitis besteht, ist spätestens nach 10—14 Tagen abgeklungen und geht nicht mit einer Steigerung der Bakteriolyse einher.

Anwendung des Pfeifferschen Versuchs.

Die spezifische Bakteriolyse durch Immunserum ermöglicht eine doppelte diagnostische Verwertung, einmal zur Beurteilung eines Immunserums, zweitens zur Identifizierung einer Bakterienart.

Serumprüfung.

Die genaue Feststellung des Serumtiters ist bereits oben besprochen worden, eine wesentliche Steigerung desselben gegenüber dem bakteriolytischen Titer von normalen Individuen weist immer auf einen vorangegangenen Immunisierungsprozeß mit dem spezifischen Erreger hin, ist daher auch in der menschlichen Pathologie zu diagnostischen Schlüssen zu verwerten (s. unten).

Prüfung eines Bakterienstammes.

Zur Prüfung eines Bakterienstammes ist stets die Anwendung eines hochwertigen Immunserums notwendig, da nur hier die Verwechslung mit der nicht spezifischen Bakteriolyse durch Normalserum sicher zu ver-

meiden ist. Nach PFEIFFERS Vorschrift soll ein diagnostisch brauchbares Choleraserum einen Titer von mindestens 1 mg haben. Tier 1 erhält in 1 ccm Bouillon 1 Öse des zu untersuchenden Stammes und ein Multiplum (das 2—10fache) der Titerdosis des zur Identifizerung dienenden Immunserums. Tier 2 erhält in 1 ccm Bouillon 1 Öse des Stammes allein (Virulenzprüfung). Tier 3 erhält in 1 ccm Bouillon 1 Öse des Stammes und eine gewisse, die Menge des Immunserums überschreitende Menge Normalserum der gleichen Tierart, von der das Immunserum stammt. Da der Gehalt des Normalserums an Immunkörpern schwanken kann, so wird diese Kontrollmenge ziemlich hoch genommen, man nimmt meist mindestens das fünffache der Immunserummenge. Wenn die zu prüfende Bakterienart identisch mit der zur Serumgewinnung benutzten ist, so zeigt Tier 1 typische Bakteriolyse, in der Bauchhöhle von Tier 2 und 3 findet dagegen Bakterienvermehrung statt. Der negative Ausfall des Versuchs beweist nach allen bisherigen Erfahrungen mit Sicherheit, daß die geprüfte Kultur keine Cholerakultur ist.

Der positive Ausfall, d. h. die komplette Bakteriolyse innerhalb einer Stunde in der Meerschweinchenbauchhöhle und das Überleben des Versuchstiers erweist den fraglichen Stamm als Cholerakultur mit Sicherheit nur dann, wenn die Kultur die genügende Virulenz hat und die betreffende Bakterienart nicht bereits vom Normalserum sehr stark beeinflußt wird, wenn also die nur mit Kultur oder mit Kultur und Normalserum geimpften Kontrollen der Injektion erlegen sind. Ist dies nicht der Fall, so kann auch eine avirulente anderweitige Kultur vorliegen. DUNBAR (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXI) erwähnt z. B., daß normales Ziegenserum noch in der geringen Menge von 10—15 mg Leuchtvibrionen in der Meerschweinchenbauchhöhle zur Auflösung brachte. Wenn man also derartige nicht mit den Choleravibrionen identische Vibrionen im PFEIFFERschen Versuch unter Anwendung von Ziegencholeraserum prüft und dabei die Kontrolle mit Normalziegenserum außer acht läßt, so ist sehr wohl eine Verwechslung mit echten Choleravibrionen möglich. Diese Verwechslung ließ sich vermeiden bei Verwendung von Meerschweinchenserum. Normales Meerschweinchenserum löste die fraglichen Vibrionen nicht auf; wenn nun Anticholeraserum vom Meerschweinchen ebenfalls nicht bakteriolytisch im PFEIFFERschen Versuch wirkte, so war daraus zu schließen, daß der geprüfte Stamm nicht eine Cholerakultur war. Ein Stamm von ungenügender Virulenz wird häufig durch Tierpassagen sich doch noch für den Versuch geeignet machen lassen. Nach neueren Ausführungen PFEIFFERS (Klin. Jahrb. 1906, pag. 369) ist auch dann, wenn der Stamm nicht die geforderte starke Virulenz hat, sondern seine Dosis letalis min. über 1 Öse liegt, die sämtlichen Tiere also überleben, noch ein Urteil aus der mikroskopischen Beobachtung möglich. Es genügt zur Stellung der Diagnose „Cholerabazillen“, daß sich wenigstens innerhalb der ersten halben Stunde deutliche Unterschiede zwischen dem Auflösungsprozeß in den mit Immunserum versehenen und den Kontrolltieren beobachten lassen.

Wenn eine direkte Entscheidung durch den PFEIFFERschen Versuch nicht möglich ist, so kann folgender Umweg zum Ziele führen (PFEIFFER, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XIX, pag. 75). Ein Serum, das mit Hilfe der fraglichen Kultur hergestellt ist, muß bakteriolytische Eigenschaften gegenüber virulenten Cholerastämmen haben, wenn die fragliche avirulente Kultur wirklich als Cholera angesehen werden soll. Ebenso müssen aktiv gegen den fraglichen Stamm immunisierte Tiere auch immun gegen

die intraperitoneale Infektion mit einer Öse virulenter Cholera sein und deutlich das Pfeifferscheme Phänomen zeigen.

Bei der Anwendung des bakteriolytischen Versuchs zur Identifizierung eines Bakterienstammes ist weiterhin zu beachten, daß die Spezifität des Prozesses — ebenso wie die aller anderen Immunitätsreaktionen — keine absolute ist. Hochwertige bakteriolytische Cholerasera können gelegentlich auch, aber in sehr viel geringerem Grade, andere Vibrionenarten mit beeinflussen; so erwähnt Pfeeiffer (Deutsche med. Wochenschr. 1896, pag. 232), daß der Vibrio Massauah und der Vibrio Weichselbaum durch Choleraserum gelöst werden, allerdings nur in sehr viel geringerem Maße als Choleravibrionen. Eine solche diagnostisch kaum zu Verwechslungen Anlaß gebende Mitbeeinflussung weist auf eine gewisse Verwandtschaft hin und wird als Gruppenreaktion bezeichnet. Die sehr ausgedehnten Untersuchungen von Kolle, Gotschlich, Hetsch, Otto und Lentz (Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XLIV) über die Spezifität der Pfeifferschen Reaktion haben die Mitbeeinflussung anderer Vibrionenarten überhaupt nicht ergeben. Dagegen eignete sich die bakteriolytische Prüfung sehr dazu, um unter den anderen Vibrionenarten mit Hilfe der entsprechenden Sera Gruppen aufzustellen.

Während die Gruppenreaktionen den Choleravibrionen gegenüber also keine oder höchstens eine ganz geringe Bedeutung haben, können sie sich gelegentlich, wenn auch selten, in der Typhusparatyphusgruppe recht stark bemerkbar machen. Häufiger trifft man bei der Agglutinationsprüfung auf derartige Gruppenreaktionen.

Kraus und Pribram (Centralbl. für Bakt., Bd. XLI) behaupten neuerdings, daß die spezifische Bakteriolyse im Pfeifferschen Versuch auch bei sachgemäßer Prüfung noch nicht unbedingt zur Identifizierung eines Stammes als Cholera ausreiche. Es gäbe Stämme (El Tor) die sonst in jeder Beziehung den echten Choleravibrionen glichen, sich aber von ihnen durch die Fähigkeit unterschieden, in der künstlichen Kultur ein Hämotoxin und ein akut wirkendes Toxin zu bilden Zur sicheren Choleradiagnose gehöre also der Nachweis, daß die fraglichen Vibrionen diese beiden Substanzen nicht bilden. Von anderer Seite ist allerdings dieser Unterschied nicht als bedeutungsvoll anerkannt worden und die Mehrzahl der Bakteriologen sieht im positiven Ausfall des Pfeifferschen Versuchs — bei Innehaltung aller Vorsichtsmaßregeln — den Beweis für die Choleranatur des fraglichen Stammes (Verhandlungen der Gesellschaft für Mikrobiologie, Centralbl. für Bakt., Ref. Bd. XXXVIII). Eine gewisse Sonderstellung muß den El-Tor-Vibrionen allerdings eingeräumt werden (Pfeiffer und Friedberger, Centralbl. f. Bakt. 1908, Bd. LVII, Heft 1).

Es seien im Anschluß die für das Deutsche Reich geltenden Vorschriften für die bakteriolytische Prüfung choleraverdächtiger Kulturen wiedergegeben (Kolle, Klin. Jahrb. 1903; Min.-Erlaß v. 6. Nov. 1902*).

Pfeifferscher Versuch (das hierzu erforderliche bakteriolytische Serum ist aus dem Königlichen Institut für Infektionskrankheiten zu Berlin zu beziehen)[1]). Das hierzu verwendete Serum muß möglichst

---

*) Die Sachverständigenkonferenz vom 13.—15. Febr. 05 zu Berlin hat zu dieser Anleitung einige Abänderungsvorschläge gemacht, die als Anmerkungen hier wiedergegeben werden:

1.) Für die Anstellung des Versuches darf nur Kaninchenserum benutzt werden. Dasselbe muß möglichst hochwertig sein.

hochwertig sein, mindestens sollen 0,0002 g des Serums genügen, um bei Injektion einer Mischung von einer Öse (1 Öse = 2 mg) einer 18stündigen Choleraagarkultur von konstanter Virulenz mit 1 ccm Nährbouillon die Cholerabakterien innerhalb einer Stunde im Meerschweinchen-Peritoneum zur Auflösung unter Körnchenbildung zu bringen, d. h. das Serum muß mindestens einen Titer von 0,0002 g haben.

Zur Ausführung des PFEIFFERschen Versuchs sind vier Meerschweinchen von je 250 g Gewicht erforderlich.

Tier A erhält das fünffache Multiplum der Titerdosis, also 1 mg von einem Serum 0,0002.

Tier B erhält das zehnfache Multiplum der Titerdosis, also 2 mg des Serums.

Tier C dient als Kontrolltier und erhält das fünfzigfache Multiplum der Titerdosis des Choleraserums, also 10 mg von normalem Serum derselben Tierart, von welcher das bei A und B benutzte Serum stammt.

Sämtliche Tiere erhalten diese Serumdosen gemischt mit je einer Öse der zu untersuchenden, 18 Stunden bei 37° auf Agar gezüchteten Kultur in 1 ccm Fleischbrühe (nicht in Kochsalz- oder Peptonlösung) in die Bauchhöhle eingespritzt.

Tier D erhält nur $^1/_4$ Öse[2.)] Cholerakultur intraperitoneal, um zu erfahren, ob die Kultur für Meerschweinchen virulent ist.

Zur Injektion benutzt man eine Kanüle mit abgestumpfter Spitze. Die Injektion in die Bauchhöhle geschieht nach Durchschneidung der äußeren Haut, es kann dann mit Leichtigkeit die Kanüle in den Bauchraum eingestoßen werden. Die Entnahme des Peritonealexsudats zur mikroskopischen Untersuchung im hängenden Tropfen erfolgt vermittels Glaskapillaren gleichfalls an dieser Stelle. Die Betrachtung des Exsudats geschieht im hängenden Trdpfen bei starker Vergrößerung, und zwar 20 Minuten[3.)] und eine Stunde nach der Injektion.

Bei Tier A und B muß nach 20 Minuten, spätestens nach einer Stunde typische Körnchenbildung bzw. Auflösung der Vibrionen erfolgt sein, während bei Tier C und D eine große Menge lebhaft beweglicher und[4.)] in ihrer Form gut erhaltener Vibrionen vorhanden sein muß. Damit ist die Diagnose gesichert.

Behufs Feststellung abgelaufener Cholerafälle ist der PFEIFFERsche Versuch in folgender Weise anzustellen:

Es werden Verdünnungen des Serums des verdächtigen Menschen mit 20, 100 und 500 Teilen der Fleischbrühe hergestellt, hiervon je 1 ccm, mit je einer Öse einer 18stündigen Agarkultur virulenter Choleravibrionen vermischt, je einem Meerschweinchen von 200 g Gewicht in die Bauchhöhle eingespritzt. Ein Kontrolltier erhält $^1/_4$ Öse[5.)] der gleichen Kultur ohne Serum in 1 ccm Fleischbrühe aufgeschwemmt in die Bauchhöhle eingespritzt.

Bei positivem Ausfall der Reaktion nach 20 bzw. 60 Minuten ist anzunehmen, daß der betreffende Mensch, von welchem das Serum stammt, die Cholera überstanden hat.

2.) Das Tier D soll nach dem Vorschlage der Sachverständigenkonferenz 1 Öse Cholerakultur erhalten (statt $^1/_4$).

3.) Sachverständigenkonferenz: Die mikroskopische Betrachtung soll auch sofort nach der Einspritzung geschehen.

4.) Die Sachverständigenkonferenz setzt hier statt „und“ das Wort „oder“.

5.) Die Sachverständigenkonferenz schlägt als Dosis für das Kontrolltier „eine Öse“ vor.

Der Pfeiffersche Versuch gegenüber anderen Bakterienarten.

1. Typhusbazillen.

Der Vorgang der Bakteriolyse durch spezifische Immunsera ist von Pfeiffer gegenüber Cholera und einer Reihe anderer Vibrionen, ferner gegenüber Typhus- und Colibakterien beobachtet und beschrieben worden.

Die Bakteriolyse zeigt bei Typhus- und Colibazillen einige bemerkenswerte Abweichungen (Pfeiffer und Kolle, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXI, pag. 203). Der Prozeß verläuft viel langsamer und weniger typisch. Auch hier ist die Immobilisierung der Bakterien die erste in die Augen fallende Erscheinung; dann werden die Stäbchen dünner, weniger stark lichtbrechend und zerfallen schließlich in kleine Trümmer. Daneben sieht man bei Anwendung stark wirksamer Sera die Bildung typischer Granula; aber auch intakte, allerdings unbewegliche Stäbchen kann man oft noch lange Zeit beobachten. Die ersten deutlichen Degenerationserscheinungen beginnen nach etwa 15—20 Minuten, der Auflösungsprozeß ist nach einer, mitunter aber auch erst nach 2—3 Stunden beendet. Bei positivem Ausfall des Versuchs überlebt das Tier den Versuch meist.

Gelegentlich begegnet man Typhusstämmen, die gegen bestimmte Sera sehr wenig oder gar nicht empfindlich sind. Nach Pfeiffer und Kolle (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXI, pag. 203) brauchen virulente Typhusstämme zu ihrer Auflösung größere Serummengen als weniger virulente. Ferner sind im allgemeinen Stämme, die frisch aus dem Menschen oder Tier herausgezüchtet sind, weniger empfindlich als ältere Laboratoriumstämme. Diese verminderte Empfindlichkeit wird besonders deutlich, wenn man die im tierischen Organismus selbst gewachsenen Bakterien prüft. Bail (Arch. für Hygiene, Bd. LII) benutzt dazu das Peritonealexsudat tödlich infizierter Tiere, aus dem die Leukocyten mit Hilfe feinen Filtrierpapieres abfiltriert worden sind. Die filtrierten Bakterien werden durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit befreit, gewaschen und kommen in NaCl-Aufschwemmung zur Injektion. Durch Züchtung auf künstlichen Nährböden verlieren diese Bakterien ihre Serumfestigkeit meist sehr rasch, doch haben Friedberger und Moreschi (Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 45) einen 2 Jahre lang im Laboratorium gezüchteten Stamm beobachtet, der für verschiedene Typhussera völlig oder fast völlig unempfindlich war.

Besserer und Jaffé (Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 45) fanden unter den aus Typhusbazillenträgern gezüchteten Stämmen mehrere, die von der Mehrzahl der angewandten Immunkörper nicht stärker beeinflußt wurden als von Normalseris; auch ein aus einem Fall von ambulantem Typhus geprüfter Stamm zeigte ein ähnliches Verhalten.

Derartige Beobachtungen beweisen, daß aus dem negativen Ausfall des Pfeifferschen Versuchs bei der Typhusdiagnose nicht ohne weiteres der Schluß gezogen werden darf, daß der untersuchte Stamm kein Typhusstamm ist. Es muß der fragliche Stamm zum mindesten noch mit anderen Typhusseris geprüft werden. Wenn die kulturelle und eventuell die Agglutinationsprüfung die Diagnose Typhusbazillen wahrscheinlich macht, so wird man in solchen Fällen bei negativem Ausfall des Pfeifferschen Versuchs die anderen bereits früher bei der Choleradiagnostik besprochenen Untersuchungsmethoden heranziehen können.

1. Man sucht durch Immunisierung mit dem fraglichen Stamm ein Serum herzustellen, das gegen echte Typhusstämme im Pfeifferschen Versuch zu prüfen ist. Mitunter gelingt es allerdings nicht, ein Serum zu erhalten, das bakteriolytische Eigenschaften, selbst dem homologen Stamm gegenüber, besitzt. Dann schlagen Besserer und Jaffé — in Anlehnung an Pfeiffer (l. c.) — vor,

2. den Schutzversuch an aktiv immunisierten Meerschweinchen heranzuziehen.

a) Meerschweinchen werden mit dem fraglichen Stamm immunisiert und dann mit dem Typhusstamm geprüft.

b) Meerschweinchen werden mit Typhusstämmen immunisiert und mit dem fraglichen Stamm geprüft.

Besserer und Jaffé injizierten zur Immunisierung 2—3 mal in den üblichen Intervallen steigende Mengen abgetöteter Agarkultur und stellten den Schutzversuch erst mindestens 3 Wochen nach der letzten Injektion an, um sicher zu sein, daß die jeder Injektion folgende „negative Phase“ sicher überwunden ist. Es wurden stets mehrere Meerschweinchen gleichzeitig zu einem Versuch herangezogen. Die im entscheidenden Versuch angewandte Menge lebender Kultur, die intraperitoneal injiziert wird, muß so groß sein, daß das nicht vorbehandelte Kontrolltier, das die gleiche oder eine etwas kleinere Dosis erhält, stirbt.

Der positive Ausfall des Pfeifferschen Versuchs darf — bei entsprechendem Ausfall der Kontrollen — auch bei der Typhusdiagnose nach allen bisherigen Erfahrungen als beweisend angesehen werden. — Die zur Hogcholeragruppe gehörigen Stämme (Paratyphus etc.) können allerdings gelegentlich in geringem Maße mit beeinflußt werden (Conradi, Drigalski, Jürgens, Zeitschr. für Hygiene 1903, Bd. XLII, Kutscher und Meinicke, Zeitschr. für Hygiene, Bd. LII). Man wird bei Ausdehnung des Versuchs bis zur Titergrenze aber doch wohl stets eindeutige Resultate erhalten.

Die diagnostische Verwertung des Pfeifferschen Versuchs erfordert hier dieselben Vorsichtsmaßregeln wie gegenüber Cholerabazillen. Ein möglichst hochwertiges Immunserum ist für die Diagnose der Bakterienart notwendig. Die Bakterienmenge soll 1 Normalöse = 2 mg nicht überschreiten; sie soll die mehrfach tödliche Dosis einer virulenten Kultur sein. Es sei hier der Entwurf einer amtlichen Vorschrift für die bakteriolytische Prüfung typhusverdächtiger Stämme wiedergegeben.

Beilage zu den Veröffentlichungen des Reichsgesundheitsamts 1903, Nr. 36.

Pfeifferscher Versuch.

Das hierzu verwandte Serum muß möglichst hochwertig sein. Zur Ausführung des Pfeifferschen Versuchs sind 4 Meerschweinchen von je 200 g Gewicht erforderlich.

Tier A erhält das 5fache Multiplum der Titerdosis.

Tier B erhält das 10fache Multiplum der Titerdosis.

Tier C dient als Kontrolltier und erhält das 50fache Multiplum der Titerdosis vom normalen Serum derselben Tierart, von welcher das bei Tier A und B benutzte Serum stammt. Sämtliche Tiere erhalten diese Serumdosen gemischt mit je 1 Öse der zu untersuchenden, 18 Stunden bei 37° auf Agar gezüchteten Kultur in 1 ccm Fleischbrühe (nicht in Kochsalz- oder Peptonlösung) in die Bauchhöhle eingespritzt.

Tier D erhält nur $1/_4$ Öse Kultur intraperitoneal, um zu erfahren, ob die Kultur für Meerschweinchen virulent ist.

Zur Injektion benutzt man eine Kanüle mit abgestumpfter Spitze. Die Injektion in die Bauchhöhle geschieht nach Durchschneidung der äußeren Haut, es kann dann mit Leichtigkeit die Kanüle in den Bauchraum eingestoßen werden. Die Entnahme des Peritonealexsudats zur mikroskopischen Untersuchung im hängenden Tropfen erfolgt vermittels Glaskapillaren gleichfalls an dieser Stelle. Die Betrachtung des Exsudats geschieht im hängenden Tropfen bei starker Vergrößerung und zwar 20 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden nach der Injektion.

Bei Tier A und B muß spätestens nach 2 Stunden typische Körnchenbildung bzw. Auflösung der Bazillen erfolgt sein, während bei Tier C und D eine große Menge lebhaft beweglicher und in ihrer Form gut erhaltener Bazillen vorhanden sein muß. Damit ist die Diagnose gesichert.

2. Bazillen der Paratyphusgruppe.

Unter dem Namen Hogcholera- oder Paratyphusgruppe werden eine Reihe von Bakterien zusammengefaßt, die nach ihrem Vorkommen und ihrer Tierinfektiosität mit verschiedenen Namen bezeichnet werden, kulturell und durch die Immunitätsmethoden aber nicht zu unterscheiden sind. Es sind die Bazillen des Paratyphus B, (der Schweinepest), des Mäusetyphus, der Psittacosis, der Fleischvergiftungen (Typus Aertryck) und der Pseudotuberkulose der Meerschweinchen. Sera, die mit einem dieser Stämme hergestellt sind, wirken in annähernd gleicher Weise auf die ganze Gruppe. Eine sichere Trennung dieser Stämme durch den Pfeifferschen Versuch ist nicht möglich.

Die Beobachtungen über das Verhalten der Bakterien der Paratyphusgruppe im Peritoneum des Meerschweinchens unter der Einwirkung von Immunserum, das mit einem Stamm dieser Gruppe hergestellt ist, gehen recht weit auseinander.

Kutscher und Meinicke (Zeitschr. für Hygiene, Bd. LII) fanden, daß der Auflösungsprozeß wesentlich rascher als bei Typhusbazillen ablaufe, fast so schnell und vollständig wie bei Choleravibrionen. Virulente Stämme wurden ebensogut aufgelöst wie avirulente. Dabei waren die angewandten Bakteriendosen verhältnismäßig groß, nämlich 1 Öse, auch in Fällen, wo die Virulenz des Stammes $1/_{10000}$ Öse betrug.

Böhme (Zeitschr. für Hyg., Bd. LII) beobachtete bei Bakterien dieser Gruppe im Pfeifferschen Versuch nur eine unvollständige Lyse.

Neufeld und Hüne (Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. XXV, Heft 1) fanden überhaupt keine deutliche extrazelluläre Auflösung der Paratyphusbazillen, sie beobachteten lediglich gesteigerte Phagocytose unter dem Einfluß des Immunserums.

Ob diese starken Unterschiede der Beobachtungsergebnisse auf Verschiedenheiten der angewandten Stämme bzw. der Sera beruhen oder anderweitig zu erklären sind, muß noch dahingestellt bleiben. Man wird also bei der Beurteilung des Pfeifferschen Versuchs hier noch mehr als den Typhusbazillen gegenüber auf die Beobachtung des Endresultats, das Überleben oder den Tod der Versuchstiere, Wert zu legen haben. Aber auch hier zeigen sich Abweichungen. Die mit genügenden Serumdosen ($1/_{1000}$ bis $1/_{10000}$ ccm wirksamer Sera) versehenen Tiere sind zwar nach 24 Stunden völlig munter, während die Kontrolltiere, die $1/_{10}$ bis $1/_{100}$ Normalserum erhalten haben, bereits tot sind. Häufig sterben aber die anscheinend geschützten Tiere noch später (nach 4—14 Tagen) unter dem

Bilde der Bakteriämie (Bonhoff, Archiv für Hygiene 1904, Bd. L, pag. 222, Böhme, l. c.). Die Versuchsresultate scheinen auch in dieser Beziehung sehr von den Eigenschaften der Stämme bzw. der Sera abzuhängen (Kutscher und Meinicke, l. c.).

Bei Anwendung des Pfeifferschen Versuchs zu diagnostischen Zwecken bildet immerhin das Verhalten in den ersten Tagen nach der Injektion ein sicheres Kriterium, auch wenn die Tiere noch später absterben.

Wichtig ist die Beobachtung, daß Paratyphussera häufig auch Typhusstämme mit beeinflussen (Conradi, Drigalski und Jürgens, Zeitschr. für Hygiene, 1903, Bd. XLII, Kutscher und Meinicke, l. c.) Die Beeinflussung kann unter Umständen bis zur Titergrenze des Serums gegenüber Paratyphusbazillen gehen (Böhme, l. c.).

3. Dysenteriebazillen.

Die Mehrzahl der Autoren hat, um den bakteriziden Titer eines Dysenterieserums festzustellen, sich damit begnügt, den Schutzwert des Serums bei gleichzeitiger Injektion von lebender Kultur in die Bauchhöhle festzustellen. Da aber der Schutzwert die Resultante der verschiedenartigsten Serumwirkungen sein kann, so darf er jedenfalls nicht ohne genauere Analyse als Maßstab für das bakteriolytische Vermögen eines Serums benutzt werden.

Bemerkenswerter Weise ist nun das typische Pfeiffersche Phänomen, d. h. die Auflösung der Bakterien in Granula bei gleichzeitiger intraperitonealer Injektion von Serum und Kultur bisher nicht geschildert worden. Lentz (Kolle-Wassermann, Handb. der pathog. Mikroorg., Bd. LV, Dysenterie) und Lüdke (Centralbl. für Bakteriologie, Bd. XL) geben geradezu an, daß sie bei dieser Versuchsanordnung vergeblich nach der Auflösung suchten. Es war nur das Verschwinden der Bakterien zu beobachten.

Bei aktiv immunisierten Meerschweinchen ist allerdings eine typische Bakteriolyse im Peritoneum beobachtet worden.

Für das Vorhandensein einer echten Bakteriolyse spricht jedenfalls auch die Beobachtung des hängenden Tropfens.

Die Bakteriolyse im lebenden Tier unter veränderten Versuchsbedingungen.

Die Diskussion über die Bedeutung des Pfeifferschen Phänomens für die Immunität hat dazu geführt, den Versuch in der mannigfaltigsten Weise zu variieren. Die wichtigsten dieser Untersuchungsmethoden, deren Bedeutung allerdings nicht auf diagnostischem, sondern auf theoretischem Gebiet liegt, seien hier angeführt.

Metschnikoffs Versuch über die Präparierung der Bauchhöhle.

Metschnikoff (Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome IX, pag. 433) behauptete, daß die extracelluläre Bakteriolyse der Vibrionen im Pfeifferschen Versuch nur die Folge des Untergangs von Leukocyten und des Austritts von Cytasen (Komplement) aus diesen sei. Es gelänge, die Leukocyten durch eine vorhergehende Bouilloninjektion widerstandsfähiger zu machen; unter diesen Bedingungen bleibe auch die extracelluläre Bakteriolyse aus. Metschnikoff injiziert am Tage vor Anstellung des Versuchs in das Peritoneum des Meerschweinchens einige Kubikzentimeter einer Leukocyten anlockenden

Flüssigkeit (Bouillon, Aleuronataufschwemmung). Ist jetzt am nächsten Tage die Bauchhöhle mit einem dicken eiterähnlichen Exsudat angefüllt, so bleibt bei Injektion von Immunserum und Kultur nach Metschnikoff die extracelluläre Lyse aus. Die Bakterien werden phagocytiert und innerhalb der Leukocyten unter Granulabildung aufgelöst (siehe auch Garnier, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome XI, pag. 767).

Pfeiffer (Deutsche med. Wochenschr. 1896, pag. 97) behauptet im Gegensatz dazu, daß auch unter diesen Umständen eine sehr deutliche extracelluläre Lyse stattfinde. Auch Abel (Centralbl. für Bakteriologie, Bd. XX, pag. 761), Ascher (Centralbl. für Bakteriol. 1902, Bd. XXXII, pag. 449) und Neufeld und Hüne (Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. XXV, Heft 1) bestätigen durchaus Pfeiffers Beobachtungen. Die Phagocytose kann zwar recht ausgesprochen sein, es findet aber immer auch eine deutliche extracelluläre Lyse statt.

Bail (Archiv für Hygiene, Bd. LII) betont, daß die Beschaffenheit des Exsudats den Ausfall des Versuchs sehr wesentlich beeinflusse. Es gelänge meist nicht, ein wirklich eitriges Exsudat in der Bauchhöhle anzusammeln, die dünneren Exsudate geben dann eine recht erhebliche extracelluläre Bakteriolyse. Sei das Exsudat aber dick-eitrig, so sei diese sehr gering, bei weitem die Mehrzahl der Vibrionen werde phagocytiert. Um dickes Exsudat zu bekommen, wendet Bail folgende Methode an:

Am ersten Tage erhalten Meerschweinchen 5 ccm Aleuronataufschwemmung intraperitoneal, am zweiten Tage die gleiche Menge; subkutan wird am selben Tage 0,01 ccm Anticholeraserum injiziert. Am dritten Tage findet erst die bakterielle Infektion der mit dickem Exsudat versehenen Bauchhöhle statt. Bei der Versuchsanordnung tritt nach Bail die extracelluläre Lyse sehr zurück gegen die Phagocytose, ganz fehlt aber auch jene nie.

Das Ergebnis dieses Versuches widerspricht durchaus nicht den Pfeifferschen Beobachtungen. Es ist bekannt, daß Leukocyten die Fähigkeit haben, das — zur Aktivierung des Immunserums erforderliche — Komplement zu absorbieren. Schon daraus erklärt sich eine Schwächung der Bakteriolyse, die weiterhin in der Bailschen Versuchsanordnung noch dadurch bedingt wird, daß das Immunserum erst vom Blute aus nach der Stelle der Infektion transportiert werden muß. Die unter der Mitwirkung phagocytosebefördernder Serumsubstanzen sich abspielende Phagocytose wird ferner naturgemäß sehr viel stärker sein, wenn in der Bauchhöhle bereits große Mengen von Leukocyten vorhanden sind, als wenn diese erst aus den Blutgefäßen einwandern müssen*).

Injektion des Serums getrennt von den Bakterien.

Der typische Pfeiffersche Versuch verlangt eine ganz bestimmte Anordnung: gleichzeitige Injektion von Serum und Kultur in die Bauchhöhle des Meerschweinchens. Für die diagnostische Verwertung der Reaktion ist es wichtig, sich streng an diese Vorschriften zu halten. Das Phänomen der Bakteriolyse durch eiu Immunserum tritt aber auch dann in Erscheinung, wenn das Serum vor der Infektion und an einer anderen Stelle gegeben wird.

Wie Pfeiffer und Issaeff (Deutsche med. Wochenschr. 1894) gezeigt haben, findet die Bakteriolyse in der Bauchhöhle auch dann statt, wenn das Serum einige Zeit vor der Injektion subkutan injiziert wird,

*) Siehe Levaditi, Über Phagocytose, Bd. II, pag. 317.

nur darf dieser zeitliche Abstand nicht zu klein sein, da die Resorption des Serums einige Zeit erfordert. Ein Zwischenraum von einem Tag trägt diesem Umstand genügend Rechnung. Die Serummenge muß bedeutend größer als sonst gewählt sein, PFEIFFER und ISSAEFF geben 0,1 ccm. Die Bakteriolyse verläuft weit weniger energisch als bei direkter Mischung; die Ursache liegt darin, daß der Immunkörper erst allmählich an die im Peritoneum befindlichen Bakterien treten kann.

Intravenöse Injektion des Serums gibt ähnliche Resultate. Wenn in BAILs Versuchen (Archiv für Hygiene, Bd. LII) die Bakteriolyse bei dieser Anordnung nur wenig größer war, als die bei Normaltieren ohne Seruminjektion, so sieht FRIEDBERGER (Centralbl. für Bakt., Bd. XLIV) den Grund hierfür in der zu hohen Dosierung der Bakterien. Eine wesentliche Verzögerung der Bakteriolyse tritt allerdings immer ein. Das Serum kann auch, wenn es innerhalb einiger Stunden nach der bakteriellen Infektion injiziert wird, seine Wirkung entfalten (der sogenannte Heilversuch). Hierbei ist zu beachten, daß in der Zwischenzeit, wenn die Bakterienmenge die Dosis let. min. überschreitet, die Bakterien sich vermehrt haben. Es bedarf dann sehr viel größerer Serumdosen zur Auflösung der Bakterien (s. später).

Statt der Bauchhöhle läßt sich zur Demonstration der Bakteriolyse auch die Pleurahöhle benutzen (BAIL). Auch in der Bauchhöhle der Kaninchen und Ratten (METSCHNIKOFF, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome IX) läßt sich das PFEIFFERsche Phänomen gut demonstrieren.

Bakteriolyse an anderen Stellen des Organismus.

So sicher das PFEIFFERsche Phänomen in der Bauchhöhle des Meerschweinchens zu beobachten ist, so verschiedene Beurteilung hat die Frage der extrazellulären Bakteriolyse gefunden, sobald die Bakterienvernichtung unter dem Einfluß von Immunserum (oder ohne dieses) an anderen Körperstellen untersucht wird.

Bakteriolyse im Subkutangewebe.

Es seien zunächst die Methoden geschildert, nach denen das Verhalten der Bakterien unter der Haut normaler Tiere untersucht wurde.

NUTTAL (Zeitschr. für Hygiene, Bd. IV — s. auch FLÜGGE, Zeitschr. für Hygiene, Bd. IV) brachte kleine Stückchen Lunge von eben an Milzbrand gestorbenen Mäusen in den Rückenlymphsack des Frosches. Nach einigen Tagen wird das Impfstück herausgenommen und das an seiner Oberfläche befindliche Exsudat im hängenden Tropfen oder im gefärbten Ausstrichpräparat mikroskopisch untersucht. Die Auflösung geht zum großen Teil unter der Mitwirkung von Leukocyten vor sich, ein Urteil über die Wirkung der Lymphe allein ist kaum möglich.

Bei Warmblütern konnte NUTTAL (l. c.) die Bakteriolyse im Organismus in folgender Weise zeigen. Unter die Haut des Kaninchenohres wurde, einer METSCHNIKOFFschen Versuchsanordnung folgend (Virchows Archiv, Bd. XCVII), durch einen kleinen Schnitt steril ein mit einer Aufschwemmung von frischer Milzbrandkultur gefülltes Glasröhrchen gebracht. Die Hautwunde wurde geschlossen und dann das Röhrchen zerbrochen. Aus dem sich um die Kapillare ansammelnden Exsudat wurde nach ca. 16 Stunden ein Tröpfchen zur Untersuchung entnommen. Immer zeigten sich erhebliche Degenerationsvorgänge an einem großen Teil der Bakterien, und zwar an den phagocytierten und den freien in ungefähr gleicher

Weise. Der Bakterienzerfall tritt bei den Warmblütern erheblich schneller auf als bei den Kaltblütern.

Radziewsky (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXVII) injiziert unter die Haut des Kaninchenohrs an dessen Innenseite nahe der Spitze $^1/_{10}$ ccm einer Pneumokokken-Aufschwemmung. Einige Stunden nach der Injektion bildet sich eine weiche teigige Geschwulst, die hauptsächlich seröse Flüssigkeit enthält. Mit Glaskapillaren lassen sich Proben des Exsudats gewinnen, die im mit Karbolfuchsin oder Methylenblau gefärbten Präparat untersucht wurden. Die Bakteriolyse äußert sich im Nachlassen und völligen Verschwinden der Färbbarkeit, die leeren Kapseln bleiben häufig erhalten. Sawtschenko (Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome XI) injiziert Milzbrand unter die Haut von Ratten.

Untersuchung der Bakteriolyse in Schnittpräparaten.

Die sich bei der Einbringung von Bakterien unter die Haut des Versuchstiers oder an anderen Körperstellen abspielenden Vorgänge lassen sich noch genauer verfolgen in Schnittpräparaten, die der histologischen Technik entsprechend angefertigt werden. Die Schnittmethode bietet besonders den Vorteil, daß sie die räumlichen Beziehungen zwischen Bakterien, Gewebe und Leukocyten richtig darstellt, während die Ausstrichmethode in dieser Hinsicht natürlich versagt.

Bereits Wyssokowitsch (Zeitschr. für Hygiene, Bd. I) hatte die histologische Methode bei seinen Untersuchungen über den Verbleib der in die Blutbahn injizierten Bakterien herangezogen. Er fand, daß die Bakterien in den Organen an den Wänden der Kapillaren oder in den Kapillarendothelien selbst, mitunter auch in Zellen des interstitiellen Gewebes abgelagert wurden. Auch wenn der Kulturversuch bereits die völlige Abtötung der Bakterien nachwies, waren diese mikroskopisch noch aufzufinden, trugen aber deutliche Degenerationszeichen an sich; sie färbten sich weniger stark und erschienen dünner und kürzer (Färbung von Schnitten mit Methylenblau oder nach Gram).

Kisskalt (Zeitschrift für Hygiene, Band XLV und XLVII) verfolgte die subkutane Infektion von weißen Mäusen mit den verschiedensten Bakterien, indem er den Tieren mit dem infizierten Messer einen Schnitt an der Rückenhaut beibrachte, ferner untersuchte er die subkutane Pneumokokkeninfektion am Ohr des Kaninchens, die subkutane Milzbrandinfektion, die Infektion des Kaninchen-Glaskörpers mit Heubazillen. Die zu untersuchenden Gewebestückchen werden in Sublimat fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten (Schnittstärke 15 μ) und gefärbt. Für die Färbung empfiehlt Kisskalt besonders folgende Methoden:

1. Färbung mit Karbolfuchsin — Differenzierung mit Essigsäure.
2. Färbung nach Gram — Nachfärbung mit Bismarckbraun.
3. Färbung mit Lithionkarmin und nach Gram.
4. Längere Vorfärbung mit Hämatoxylin — Färbung nach Gram, Nachfärbung mit Eosin.

Die Gramfärbung kommt natürlich nur bei Versuchen mit nach Gram sich färbenden Bakterien in Betracht. Für diese ist sie sehr geeignet, da sie den Unterschied zwischen normalen und in Auflösung begriffenen Bakterien besonders deutlich zur Anschauung bringt. Die normalen Bakterien sind vollständig nach Gram gefärbt, die degenerierten nur unvollständig oder gar nicht, sie nehmen dafür die Gegenfarbe an (Bismarckbraun, Eosin). Die Methode erlaubt ein gutes Urteil darüber, wie weit die Auflösungsprozesse sich intracellulär (in Leukocyten) oder

extracellulär abspielen, ob die Nähe größerer Leukocytenmassen die extracelluläre Lyse begünstigt u. a. Sie ergibt hier mitunter wesentlich andere Resultate als die Ausstrichmethode. Wenn in Ausstrichen die Bazillen zum großen Teil extracellulär gelagert erscheinen, so weist nach Kisskalt das Schnittpräparat der gleichen Stelle mitunter fast ausschließlich intracelluläre Lagerung nach.

Bei der subkutanen Infektion des Kaninchens mit Pneumokokken am Ohr ließ sich in dem entstehenden starken Ödem deutlich extracelluläre Lyse nachweisen, ebenso bei der subkutanen Infektion von weißen Mäusen mit großen Ödem erzeugenden Milzbrandmengen (1 Öse). Für den Nachweis der extracellulären Lyse ist unter Umständen der Zeitpunkt der Tötung von Bedeutung. In der ersten Zeit nach der Injektion war keine extracelluläre Lyse zu beobachten, erst 36 Stunden nach der Injektion, als das Tier bereits im Sterben lag, trat diese deutlich hervor.

Wenn die Entstehung des Ödems durch Verwendung kleiner Infektionsdosen vermieden wird, so fehlt nach Kisskalt auch die extracelluläre Lyse. Kisskalt selbst folgert aus seinen Versuchen, daß unter den natürlichen Infektionsbedingungen — wenigstens für die angegebenen Bakterienarten — eine extracelluläre Lyse nicht zustande komme.

Untersuchung der Bakteriolyse im Subkutangewebe immunisierter Tiere.

Metschnikoff und seine Schule verneint das Auftreten einer extracellulären Bakteriolyse im Subkutangewebe aktiv oder passiv immunisierter Tiere vollständig. Die injizierten Bakterien gingen nur durch Phagocytose zu Grunde (Metschnikoff, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome IX, pag. 433, Mesnil, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome X, pag. 369, Salimbeni, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome XII, pag. 192, Cantacuzène, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome XII, pag. 273). Die Technik der Versuche entspricht ganz der des Pfeifferschen Versuchs.

a) Aktiv gegen Cholera oder andere Vibrionenarten (Vibrio Massauah) immunisierte Tiere (Meerschweinchen, Kaninchen, Pferde) erhalten in das subkutane Gewebe eine Injektion der mehrfach tödlichen Bakteriendosis, in etwas Bouillon oder Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

b) Normaltiere werden mit einer Mischung der mehrfach tödlichen Bakteriendosis und des zugehörigen verdünnten oder auch nicht verdünnten Immunserums injiziert.

c) Normaltiere. Die Injektion von Serum und Kultur geschieht an verschiedenen Orten und zwar entweder gleichzeitig oder die Seruminjektion geht der Bakterieninjektion voran.

Die Injektion geschieht mit feiner Spritze, die Entnahme mit Glaskapillaren. Metschnikoff und seine Mitarbeiter legen großen Wert darauf, daß dabei Blutungen in das subkutane Gewebe sorgfältig vermieden werden, da diese das Resultat wesentlich beeinflussen können.

R. Pfeiffer (Deutsche med. Wochenschr. 1896, pag. 97) und Ascher (Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII, pag. 449) bestätigen, daß die Bakteriolyse unter diesen Bedingungen viel langsamer abläuft, als im Peritoneum; noch nach 5—24 Stunden seien einzelne intakte Vibrionen zu finden. Die extracelluläre Auflösung sei aber doch in jedem einzelnen Falle deutlich nachweisbar. Besonders trete dies hervor bei aktiv immunisierten Tieren. Eine ein Jahr lang immunisierte Ziege starb plötzlich, 22 Stunden nach der Injektion von 500 Agarkulturen

lebender virulenter Cholera. Das an der Injektionsstelle entstandene, von Leukocyten fast freie Ödem ließ keine Vibrionen mehr erkennen, auch die inneren Organe erwiesen sich bei kultureller Prüfung als steril, die injizierten Vibrionen mußten also sämtlich aufgelöst worden sein.

Das Pfeiffersche Phänomen läßt sich nach Cantacuzène (Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome XII, pag. 273) im subkutanen Gewebe leicht demonstrieren, wenn gleichzeitig beschädigte Leukocyten unter die Haut eingeführt werden.

Bakteriolyse im subkutanen Ödem.

Metschnikoff und seine Schüler (Metschnikoff, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome IX, Bordet, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome IX und X) variieren den Versuch in der Weise, daß sie durch Stauung ein stärkeres subkutanes Ödem erzeugen und bei aktiv oder passiv immunisierten Tieren das bakteriolytische Vermögen dieser Flüssigkeit untersuchen. Zur Erzeugung des Ödems wurde das Ohr des Kaninchens, das sich hierzu besonders gut eignet, oder eine Extremität mit einer elastischen Ligatur (Gummiring) vorsichtig abgeschnürt. Der Druck darf nicht so stark sein, daß Dekubitus oder Gangrän entsteht.

Boks (Centralbl. für Bakt. 1899, Bd. XXVI, pag. 565) gibt zur Stauung des Kaninchenohres folgende Methode an. Ein zylindrischer, an einem Ende schräg abgeschnittener Pflock aus weichem Holz (Lindenholz) wird mit der Spitze voran in die Ohrmuschel gesteckt. Um das Ohr wird ein elastisches Band gelegt, das durch Reißzwecken an dem Holzpflock befestigt wird. Um das Tier an der Entfernung des Apparates zu verhindern, wird es bis zum Hals in einen Sack gesteckt. Die Injektion und die Entnahme geschieht wie im vorigen Versuch. Die Beimischung von Blut vermeidet Bordet bei der Entnahme durch vorheriges Fortmassieren des Blutes. Ascher (Centralbl. für Bakt., Bd. XXXII, pag. 449) entnimmt die Ödemflüssigkeit mitunter nicht mit der Kapillare, sondern streicht sie durch sanften Druck heraus. Er überzeugte sich gelegentlich auch durch Untersuchung der Stelle im Schnitt, daß keinerlei Blutung eingetreten sei.

Nach den französischen Autoren fehlt auch hier bei Vermeidung von Blutungen die extracelluläre Lyse völlig oder ist doch sehr gering. Ascher beobachtet sie deutlich, sie tritt aber sehr langsam in Erscheinung.

Bakteriolyse in der vorderen Augenkammer.

In die vordere Augenkammer von Kaninchen wurde ein Gemisch von Choleravibrionen und Immunserum (bzw. Vibrio Massauah und dem entsprechenden Immunserum) injiziert, oder es wurde das Immunserum ($^3/_4$—1 ccm) einige Tage vorher subuktan verabfolgt (Metschnikoff, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome IX; Mesnil, Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome X, pag. 369). Die Vibrionen bleiben zunächst unverändert. Erst wenn Leukocyten einwandern, also Entzündungserscheinungen auftreten, kommt es zur Bakteriolyse.

Es ist also wohl als sicher anzusehen, daß die Bakteriolyse im normalen oder durch Stauung ödematös gewordenen Unterhautgewebe, ebenso in der vorderen Augenkammer nur sehr langsam in Erscheinung tritt. Auch in vitro erweisen sich das Stauungsödem und das Kammerwasser als wenig bakterizid, es mangelt ihnen an Komplement. Sie

unterscheiden sich auch in anderer Beziehung besonders durch ihren geringen Eiweißgehalt, vom Serum und der Peritonealflüssigkeit. Wenn sich im Unterhautbindegewebe Entzündungsprozesse etablieren, die mit starker seröser Exsudation einhergehen, so wirkt dieses entzündliche Ödem bakteriolytisch (vgl. die erwähnten Versuche von NUTTAL, RADZIEWSKY, KISSKALT). Die Erscheinung, daß es auch in der vorderen Augenkammer zur Bakteriolyse kommt, wenn Leukocyten dort nachzuweisen sind, ist wohl ebenso aufzufassen.

Es sei noch bemerkt, daß die Milzbrandbazillen sich gegenüber den bakteriziden Körperflüssigkeiten wesentlich anders verhalten, als die meisten andern Bakterien, daß also Beobachtungen an Milzbrandbazillen Verallgemeinerungen nicht zulassen (vgl. den Abschnitt über Wirkungsart der bakteriolytischen Sera).

Bakteriolyse im strömenden Blut.

Auch die Veränderungen, die die Bakterien im strömenden Blut normaler oder immunisierter Tiere erfahren, sind, wenn auch nicht ganz ohne Schwierigkeiten, der morphologischen Untersuchung zugänglich. Bakterien, die direkt in die Blutbahn eingeführt werden, werden sehr rasch zum großen Teil in den inneren Organen abgelagert (WYSSOKOWITSCH, Zeitschr. für Hygiene, Bd. I), ihr Verschwinden aus der Blutbahn ist daher nicht als Beweis für die erfolgte Auflösung zu betrachten. Es müssen die Zerfallsformen selbst zur Anschauung gebracht werden.

LEVADITI (Ann. Pasteur, Tome XV) injiziert, früheren Versuchen BORDETS (Ann. Pasteur, Tome IX, pag. 462) folgend, normalen oder immunisierten Kaninchen eine Agarkultur Choleravibrionen in $^1/_2$ ccm Bouillon in die Jugularis und legt nach einiger Zeit Blutausstrichpräparate an. Um die Phagolyse zu vermeiden, die nach den französischen Autoren der Bakterieninjektion zu folgen pflegt, präpariert LEVADITI die Tiere häufig durch eine vorangehende Bouillon- oder Kochsalzinjektion. Er findet Phagocytose und intracelluläre Lyse. Nur in den Kapillaren mancher Organe (Lunge) findet, wie LEVADITI aus Schnittpräparaten ersah, auch eine extracelluläre Lyse statt, aber auch diese ist beschränkt auf die Nähe von Leukocytenhaufen. Die extracelluläre Auflösung wird allgemeiner einige Zeit nach der Injektion, wenn mittlerweile zahlreiche Leukocyten zugrunde gegangen sind. LEVADITI injiziert einem immunisierten Kaninchen Choleravibrionen in die Jugularis, sofort danach wird das eine Ohr abgeschnürt. Einige Zeit später, wenn die Leukocyten im zirkulierenden Blut spärlicher geworden sind, wird das zweite Ohr abgebunden und in die Randvene dieses Ohres eine neue Vibrionenmenge injiziert. In dem zuerst abgebundenen Ohr, das aus der allgemeinen Zirkulation ausgeschaltet war, läßt sich keine extracelluläre Lyse nachweisen, wohl aber in dem zweiten, dessen Blut unter dem Einfluß des Leukocytenzerfalls gestanden hat.

LAMBOTTE und STIENNON (Centralbl. für Bakteriologie, Bd. XL, Heft 2—4), die den Versuch mit geringer Änderung wiederholen, finden dagegen bei der gleichen Versuchsanordnung auch in dem zuerst abgebundenen Ohre deutliche extracelluläre Bakteriolyse. Die intracelluläre Bakteriolyse sehen sie ebenfalls großenteils als Folge der vorhergenden Bindung von Ambozeptor und Komplement an.

Mit Hilfe der gewöhnlichen Färbemethoden ist es nicht immer leicht, Bakteriengranula von Blutplättchen zu unterscheiden. Für die nach GRAM färbbaren Bakterien gibt diese Methode eine sichere Diffe-

renzierungsmöglichkeit. Da die der typischen Bakteriolyse durch Immunsera zugängigen Bakterien (Choleravibrionen, Typhusdysenteriegruppe usw.) sämtlich Gram negativ sind, so kommt diese von M. Löwit (Sitzungsbericht der Wiener Akademie 1904, Math. Nat. Kl., Bd. CXIII, Heft 3) ausgearbeitete Methode wesentlich nur für die Untersuchung der Bakteriolyse im normalen Organismus in Frage.

Löwit injiziert Kaninchen intravenös Milzbrandbazillen. Nach einer bestimmten Zeit, wenn die Granulabildung voraussichtlich auf voller Höhe ist (ca. 15—30 Minuten) wird das Tier aus der Karotis entblutet, und die gesamte Blutmenge in Zentrifugenröhrchen aufgefangen, die zu $^1/_4$ mit 7 $^0/_0$iger Magnesiumsulfatlösung gefüllt sind, um die Gerinnung zu verhüten. Durch kurzes Zentrifugieren werden die Erythrocyten ausgeschleudert. Die überstehende Blutplättchen, Leukocyten und Bakterien enthaltende Flüssigkeit wird abgehebert. Durch langdauerndes Zentrifugieren werden diese Bestandteile aus dem Plasma abgeschieden. Der bakterienreiche Bodensatz wird nochmals gewaschen, dann auf Deckgläsern ausgestrichen und nach Gram gefärbt.

Die in den Organen abgelagerten Bakterien werden in ähnlicher Weise gewonnen. Die dem entbluteten Tiere möglichst aseptisch entnommenen Organe werden in 10—20 ccm einer sterilen 2,5 $^0/_0$igen Magnesiumsulfatlösung übertragen, ausgepreßt oder steril zerrieben. Die durch Glaswolle filtrierte Suspension wird nun in derselben Weise wie das Blut weiter behandelt, zuerst kurz zentrifugiert, dann werden die festen Bestandteile der resultierenden Flüssigkeit durch längeres Zentrifugieren gewonnen.

Die Stärke der Bakteriolyse bestimmt Löwit, indem er das Prozentverhältnis der zu Granula umgewandelten Bakterien gegenüber der Gesamtzahl ermittelt. Er zählt ca. 100 Bakterien für jede Bestimmung. Die Fehler dieser Methode schätzt Löwit auf etwa 5—15, selten 25 $^0/_0$. Er findet auf diese Weise, daß die Bakteriolyse in der Lunge und im Gehirn besonders stark ist, in der Leber und im Knochenmark bedeutend schwächer, während das Blut sehr wechselnde Resultate gibt, je nach dem Orte und der Technik der Bakterieninjektion. Löwit schließt daraus, daß im Blut kein oder nur wenig freies Komplement für Milzbrand vorhanden ist, daß es vielmehr im Innern von Zellen sich befindet und erst unter besonderen Umständen an das Blut abgegeben wird. Wie später ausgeführt wird, ist die anthrakocide Substanz nicht identisch mit dem typischen Komplement.

Bakteriolyse durch tierische Flüssigkeiten außerhalb des Organismus.

Die Auflösung von Bakterien unter der Einwirkung von Serum — normalem oder Immunserum — und anderen Flüssigkeiten läßt sich wie im Organismus so auch außerhalb desselben in vitro demonstrieren.

Bereits Nuttal (Zeitschr. für Hygiene, Bd. IV, pag. 353) stellte derartige Untersuchungen an Flüssigkeiten des normalen Organismus an. Von der zu untersuchenden Flüssigkeit wird ein Tropfen auf ein Deckglas gebracht und mit einer ganz kleinen Menge Bakterien (30—100) geimpft, die durch stärkere Verdünnung einer Stammaufschwemmung gewonnen wird. Das Präparat wird auf dem geheitzten Objekttisch über dem hohlgeschliffenen Objektträger betrachtet oder nach der Herstellung in den Brutschrank übertragen und in geeigneten Pausen mikroskopisch beobachtet. Zur Impfung sind nur frische von Involutionsformen freie

Kulturen zu benutzen. In Kontrollpräparaten werden Bakterien in Bouillon aufgeschwemmt (oder besser in inaktiviertem Serum).

Die direkte mikroskopische Beobachtung wie das gefärbte Präparat lassen nach einiger Zeit die gleichen degenerativen Veränderungen erkennen, wie man sie etwa in der Bauchhöhle normaler Tiere findet. Die Kontrollpräparate bleiben während der Beobachtungszeit frei von Degenerationserscheinungen.

Wenn nicht sämtliche eingeführten Bakterien zerfallen, nimmt die Bakteriolyse bis zu einem gewissen, für die einzelnen Bakterienarten verschiedenen Zeitpunkt zu, bleibt dann eine Zeitlang stationär, bis schließlich die noch übrig gebliebenen lebensfähigen Bazillen wieder in Wucherung übergehen.

Die Beobachtung im hängenden Tropfen wird ergänzt durch das Studium des mit Karbolfuchsin, Methylenblau u. dergl. gefärbten Präparates. Nach METSCHNIKOFF kann auch dem hängenden Tropfen etwas wässerige Methylenblaulösung hinzugesetzt und so das feuchte Präparat gefärbt werden.

Es können in dieser Weise die verschiedensten Körperflüssigkeiten untersucht werden.

Nachweis der Bakteriolyse durch Immunserum im hängenden Tropfen.

Frisches Immunserum zeigt für sich im hängenden Tropfen häufig, aber nicht immer, eine stärkere Bakteriolyse als das Normalserum der gleichen Tierart, älteres oder inaktiviertes Immunserum ist für sich wirkungslos.

Wie METSCHNIKOFF (Ann. de l'Inst. Pasteur 1895, Tome IX, pag. 433) und BORDET (Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome IX, pag. 462) erkannten, lassen sich regelmäßig die gleichen Erscheinungen, die man beim PFEIFFERschen Versuch in der Bauchhöhle des aktiv oder passiv immunisierten Meerschweinchens beobachtet, auch außerhalb des Organismus nachweisen, wenn man dem Immunserum etwas Peritonealexsudat, defibriniertes Blut oder frisches aktives Serum eines normalen Tieres, kurz eine „komplementhaltige" Flüssigkeit hinzufügt. Dieser Versuch wies zum ersten Male die komplexe Zusammensetzung der Bakteriolysine nach, der bei den Versuchen über Bakteriolyse in vitro Rechnung getragen werden muß.

Die im hängenden Tropfen zu beobachtenden Erscheinungen weichen von denen in der Bauchhöhle nur insofern ab, als die Auflösung nicht über die Granulaform hinausgeht, während in der Bauchhöhle schließlich auch die Granula schwinden.

Die Beobachtung erfolgt wieder im hängenden Tropfen (gefärbt oder ungefärbt) oder im gefärbten Ausstrichpräparat.

Die Bakteriolyse durch Immunserum + Komplement verläuft in vitro — ganz wie der PFEIFFERsche Versuch — völlig spezifisch. Dabei sind ganz ähnliche Beobachtungen über den Einfluß der Virulenz zu erhalten; avirulente Kulturen können bereits vom Normalserum allein gelöst werden, es ist deshab stets eine Kontrolle erforderlich, die nur Vibrionen und Normalserum enthält.

Der Versuch kann ebenso wie der PFEIFFERsche benutzt werden:

a) zur Identifizierung eines fraglichen Stammes,

b) zur Untersuchung eines Serums auf spezifische Immunkörper.

Die Versuchsanordnung zur Prüfung eines Vibrionenstammes ist nach Bordet folgende: Eine junge Choleraagarkultur wird in 5 bis 7 ccm Bouillon oder Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 2 Tropfen hiervon werden auf einen Objektträger gebracht, dazu 1 Tropfen Immunserum gefügt. Eine Öse der Mischung wird auf ein Deckglas übertragen, daneben eine Öse frisches Normalserum gebracht. Bordet verwendet Serum normaler Meerschweinchen, Menschen, Ratten, Kaninchen und Ziegen; Meerschweinchen- und Menschenserum zeigen in seinen Versuchen die beste kompletierende Wirkung. Diese kann natürlich je nach der Herkunft des Immunserums wechseln. Es gelten hier für die Auswahl des Komplements dieselben Gesichtspunkte wie beim bakteriziden Plattenversuch (s. d.). Die beiden Tropfen werden auf dem Deckglas gemischt, dann wird diese Mischung in der üblichen Weise über dem hohlgeschliffenen Objektträger angebracht und in den Brutschrank gelegt. Ein Kontrollpräparat enthält eine Mischung von echten Choleravibrionen, Choleraserum und Komplement, um in jedem Versuch die typische Bakteriolyse zum Vergleich zu haben; ein zweites Kontrollpräparat enthält die zu prüfende Kultur und Normalserum, aber kein Immunserum, um den Grad der durch Normalserum allein bewirkten Bakteriolyse festzustellen. Bei positivem Ausfall des Versuchs muß die erste Mischung ungefähr ebenso starke Bakteriolyse zeigen wie Kontrolle 1, während Kontrolle 2 nur wesentlich schwächere Zerfallserscheinungen aufweist. Die endgiltige Beobachtung erfolgt nach zweistündigem Aufenthalt der Präparate im Brutschrank. Wenn der Versuch auch, gerade von französischer Seite, oft an Stelle des kostspieligeren Pfeifferschen Versuchs ausgeführt worden ist, so ist er doch nicht scharf genug, um diesen zu verdrängen.

Die Serumprüfung nach obiger Methode kommt — neben dem Plattenversuch — besonders dann in Frage, wenn es sich um die Untersuchung normaler Sera auf Ambozeptoren handelt (s. weiter unten). Ebenso kann die Prüfung einer normalen Körperflüssigkeit auf ihren Komplementgehalt nach dieser Methode erfolgen. Zur quantitativen Untersuchung ist die Methode weniger geeignet.

B. Kultureller Nachweis der Bakterizidie.

Zum kulturellen Nachweis der Bakterizidie wird eine bekannte Bakterienzahl der auf ihre bakterizide Wirkung zu untersuchenden Flüssigkeit zugesetzt. Nach einer gewissen Einwirkungsdauer wird die Zahl der noch lebenden (bzw. vermehrungsfähigen) Bakterien wieder bestimmt. Zur Zählung bedient man sich meist des in seiner Methodik als bekannt vorausgesetzten Plattenverfahrens: Eine genau abgemessene Menge der auf ihren Gehalt an vermehrungsfähigen Bakterien zu untersuchenden Flüssigkeit wird mit einem flüssig gemachten bei der Abkühlung erstarrenden Nährmedium gemischt und die Mischung in einer Petrischale zur Platte ausgegossen. Die Zählung findet nach entsprechendem Aufenthalt im Brutschrank statt. Das Nährmedium muß in jedem Falle so gewählt sein, daß es einen geeigneten Kulturboden für die betreffende Bakterienart abgibt. Man wird daher unter Umständen dem Agar oder der Gelatine noch Zusätze geben (Glyzerin, Traubenzucker u. dergl.).

Neben dem Plattenverfahren wird auch das Verdünnungsverfahren benutzt. Man stellt sich von der auf ihren Bakteriengehalt zu untersuchenden Flüssigkeit Verdünnungen in geometrischer Progression her

und setzt von jeder der stärkeren Verdünnungen ein bestimmtes Volumen, etwa einen Tropfen, einem Bouillonröhrchen zu. Die Röhrchen trüben sich, wenn in der betreffenden Verdünnung noch lebensfähige Keime waren; sie bleiben steril, wenn die Verdünnung so weit getrieben war, daß in der verwandten Einsaatmenge entwicklungsfähige Bakterien nicht mehr vorhanden sind. Daraus läßt sich berechnen, wieviel Bakterien in der Volumeinheit der geprüften Flüssigkeit vorhanden sind. Es werden zweckmäßig von jeder Verdünnung mehrere Röhren geimpft, um so die Fehler der Einzelbestimmung auszugleichen.

Das Zählverfahren kann zur Untersuchung der im infizierten Organismus selbst sich abspielenden Vorgänge benutzt werden. Es gibt Aufschlüsse über die Vermehrung oder Abtötung von in den Körper eingebrachten Keimen, über den Mechanismus der Verminderung aber sagt es zunächst nichts.

Wyssokowitsch (Zeitschr. für Hyg., Bd. I) prüfte so den Verbleib intravenös eingeführter Bakterien. Die Zahl der im Blute enthaltenen Keime nahm rasch ab, dafür waren die Bakterien reichlich in den inneren Organen nachweisbar. Die Verminderung der Bakterien wird also hier wenigstens zum großen Teil nicht durch die Bakterizidie des Blutes, sondern durch die Ablagerung in den parenchymatösen Organen bewirkt. Um den Einfluß dieser Bakterienfiltration auszuschalten, kann man den Versuch sich in einem abgeschlossenen Gefäßbezirke abspielen lassen. Buchner (Archiv für Hyg., Bd. X) untersuchte so das Verhalten von Bakterien in einer abgebundenen mit Blut gefüllten Arterie. Einem Hunde wurden 2 ccm Typhusbouillonkultur intravenös injiziert, 2 Minuten später wurde die Karotis eröffnet und eine Blutmenge von 50 ccm abgelassen, um mit Sicherheit infiziertes Blut in der Karotis zu haben. Die nächsten Kubikzentimeter wurden zur Keimzählung steril aufgefangen, dann wurde ein 5 cm langes Stück der Karotis durch Fadenschlingen abgebunden, die bereits vorher gelegt waren. Nach 5 Stunden wurde das Blut aus diesem abgeschlossenen Stück entnommen und im ganzen kulturell geprüft; es war steril, während eine Öse des vor dem Abschnüren aufgefangenen Blutes ca. 230 Keime enthielt. Bei dieser Versuchsanordnung wird allerdings lediglich die Bakterizidie des Gesamtblutes, nicht die des Serums bestimmt.

Auch beim Pfeifferschen Versuch kann durch Anlegung von Plattenkulturen zu verschiedenen Zeiten nach Beginn des Versuches die Verminderung lebender Bakterien verfolgt werden.

Seine Hauptverwendung findet das Zählverfahren zur Untersuchung bakterizider Wirkungen außerhalb des Körpers im Reagenzglase. In dieser Weise können die verschiedensten Körperflüssigkeiten (Blut, Plasma, Serum usw.), ebenso auch Organbreie oder -extrakte auf ihre bakterizide Wirkung untersucht werden.

Prüfung von Flüssigkeiten des normalen Organismus.

Nuttal (Zeitschr. für Hyg., Bd. IV, pag. 353) und Buchner (Archiv für Hyg., Bd. X) haben die Technik des bakteriziden Plattenversuches zur Untersuchung der Bakterizidie des Blutes und des Serums ge-

schaffen. Nuttal gab in eine größere Anzahl von Röhrchen die gleiche Menge steril aufgefangenen defibrinierten Blutes (0,5—1 ccm), besäte sie mit einer kleinen Öse Milzaufschwemmung einer eben an Milzbrand verendeten Maus und bewahrte die Röhrchen im Thermostaten auf. Verschiedene Zeit nach Beginn des Versuches wurden Röhrchen zu Gelatineplatten verarbeitet und in diesen später durch Auszählung die Kolonienzahl festgestellt. Eine Kontrollplatte bestimmte den Keimgehalt einer Öse der ursprünglichen Aufschwemmung.

Buchner modifizierte die Methode in der Weise, daß er eine größere Blutmenge besäte und von dieser zu verschiedener Zeit nach der Aussaat mit steriler Pipette abgemessene gleiche Proben entnahm, deren Keimgehalt durch das Kulturverfahren bestimmt wurde.

Die Bakterizidie des fibrinogenhaltigen Vollblutes läßt sich nach der gleichen Methode zeigen. Wie in diesem Falle die Gerinnung zu verhüten ist, wird später bei Besprechung der Plasmagewinnung ausführlicher erörtert.

Die Mitwirkung der Leukocyten bei der Bakterizidie wird ausgeschaltet durch die Untersuchung des Plasmas oder des Serums.

Die Methoden der Gewinnung des Plasmas, der Vergleich der Bakterizidie des Plasmas und des Serums seien später besprochen.

Am häufigsten ist zu bakteriziden Versuchen von den Flüssigkeiten des normalen Organismus das Serum herangezogen worden. Die Versuche werden nach den von Nuttal und Buchner für die Untersuchung des Blutes aufgestellten Grundsätzen ausgeführt.

Im folgenden werden die einzelnen Faktoren behandelt, die auf das Resultat von Einfluß sind.

Impfmaterial.

Zur Impfung der auf Bakterizidie zu untersuchenden Flüssigkeit muß eine möglichst homogene Bakterienaufschwemmung benutzt werden. Häufig bietet eine Bouillonkultur oder die Verreibung einer Öse Agarkultur in einem flüssigen Medium ein völlig geeignetes Ausgangsmaterial. Schwieriger wird die Herstellung einer gleichmäßigen Emulsion, wenn die verwandte Bakterienart zur Bildung von Ketten oder Flocken neigt. Gerade der besonders früher für bakterizide Versuche so viel verwandte Milzbrand hat diese störende Eigenschaft in höchstem Maße. Starkes Schütteln einer Milzbrandbouillonkultur in Kölbchen mit sterilen Glasperlen reißt die Ketten möglichst auseinander. Ein leichtes Zentrifugieren nach dem Schütteln kann die Flüssigkeit von etwa noch vorhandenen gröberen Partikeln befreien. Durch Filtration können ebenso Flocken aus der geschüttelten Aufschwemmung zurückgehalten werden. Auch das — allerdings nicht ganz ungefährliche — Verreiben der Kulturen mit etwas Flüssigkeit im sterilen Mörser bewährt sich zur Herstellung homogener Aufschwemmungen. — Eine von größeren Ketten freie Milzbrandaufschwemmung stellt ferner das eben entnommene ungeronnene Blut einer schwer milzbrandkranken Maus dar. Durch Verreiben eines Milzstückchens einer an Milzbrand verstorbenen Maus in Bouillon läßt sich ebenfalls eine gleichmäßige Suspension gewinnen.

Einfluß der Menge und der Virulenz der verwandten Kultur.

Nehmen wir an, daß wir es mit einem bestimmten Serum und einer bestimmten Bakterienart zu tun haben. Die Zahl der durch eine gewisse Serummenge abgetöteten Bakterien hängt dann sehr von

der Aussaatmenge ab. Wenn die Bakterienaussaat eine gewisse Größe nicht überschreitet, so können alle Bakterien vernichtet werden. Es kommen allerdings Unregelmäßigkeiten vor. Selbst bei verhältnismäßig kleinen Bakterienmengen können einzelne Bakterien überleben und später sich wieder vermehren. Überschreitet die Aussaat die noch völlig abtötbare Menge, so pflegt mit Zunahme der Aussaat zunächst auch noch die Zahl der abgetöteten Bakterien zuzunehmen, allerdings ebenso auch die Zahl der überlebenden. Bei weiterer Steigerung kann die Keimverminderung wieder kleiner werden.

Man wird für vergleichende bakterizide Versuche zweckmäßig die Einsaatmenge nur so groß wählen, daß das am stärksten wirksame Serum die Bakterien noch völlig abtötet. Bei größerer Einsaat verwischen sich die Unterschiede in der Kolonienzahl leicht. (Hüne, Arbeiten aus d. Kais. Gesundh.-Amt Bd. XXVI.) Es werden meist Kulturverdünnungen, am besten in Bouillon, als Ausgangsmaterial benutzt. Mit der Pipette werden gleiche Mengen der Kulturverdünnung zur Besäung der einzelnen Röhrchen abgemessen.

Frisch aus dem lebenden Organismus oder einige Zeit in aktivem Serum gezüchtete Bakterien können widerstandsfähiger gegen die Serumeinwirkung sein als die üblichen Laboratoriumsstämme (Haffkine, Ann. de l'Inst. Pasteur 1890, Tome IV, pag. 363; Kionka, Centralbl. für Bakt. 1892, Bd. XII, pag. 321; Trommsdorff, Archiv für Hyg. 1901, Bd. XXXIX, pag. 31; Cohn, Zeitschr. f. Hyg. 1903, Nr. 45; Courmont et Lesieur, Journ. de Physiol. et de Pathol. générales 1903, Tome V, pag. 331; Sawtschenko, Ann. de l'Inst. Pasteur 1907, Tome XI, pag. 865; Danysz, Ann. de l Inst. Pasteur 1900, Tome XIV, pag. 641). Dasselbe gilt für durch Tierpassagen virulent gemachte Stämme (van de Velde, La Cellule 1894, Tome X, pag. 401; s. a. Eisenberg, Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV, pag. 739).

Einfluß der Einwirkungszeit.

Das Resultat des Versuches hängt von der Zeitdauer der Serumeinwirkung ab. In der ersten Zeit der Einwirkung gehen verhältnismäßig viele Bakterien zugrunde, während weiterhin in gleichen Zeiträumen weniger Keime abgetötet werden.

Die Geschwindigkeit der Abtötung ist sehr verschieden, je nach der Art der angewandten Bakterien. Nissen (Zeitschr. f. Hyg. 1889, Bd. VI, pag. 487) bestimmte in Versuchen, in denen er keine völlige Abtötung erhielt, die Zeitdauer bis zum Eintritt des Keimminimums, um vergleichbare Werte für die Geschwindigkeit zu erhalten. Das Keimminimum bei der Einwirkung auf verschiedene Bakterienarten wird erreicht — es handelt sich bei diesen Untersuchungen allerdings um Blut, nicht um Serum —

bei	Coccus aquatilis	nach	5—10	Minuten
„	Milzbrand	„	10—20	„
„	Cholera	„	20—40	„
„	Typhus	„	120	„

Die Größe der Einsaatmenge zeigte sich dabei nicht von wesentlichem Einfluß, so lange nicht außerordentlich große Bakterienmengen benutzt werden.

Um einen genauen Überblick über den Verlauf und die Größe der Bakterizidie in einem bestimmten Falle zu erhalten, wird man deshalb zweckmäßig den Keimgehalt der Bakterienserummischung zu verschiedenen Zeiten nach dem Ansetzen des Versuches ermitteln. Wenn

dies Verfahren zu umständlich erscheint, muß die Einwirkungsdauer des Serums auf die Bakterien so bemessen sein, daß möglichst der Zeitpunkt des Keimminimums getroffen wird. Durch Vorversuche ist dieser Zeitpunkt zu ermitteln. Sehr häufig bewährt sich eine Einwirkungsdauer von etwa 3 Stunden.

Einfluß des Mediums.

Die Übertragung der Bakterien von dem Nährboden, auf dem sie gewachsen sind, in ein neues Medium ist nicht immer gleichgültig. Es kann durch den Wechsel des Mediums allein ohne irgend eine Serumeinwirkung Bakterizidie hervorgerufen werden. Physiologische Kochsalzlösung schädigt z. B. die Bakterien sehr stark, wie folgender Versuch von Hüne beweist (Arbeiten aus d. Kais. Gesundh.-Amte, Bd. XXVI, pag. 200).

Einwirkung physiologischer Kochsalzlösung auf Cholera-, Typhus- und Paratyphusbazillen:

Cholera, Virulenz $^1/_4$ Öse; die Aufschwemmung enthält in 1 ccm $^1/_{5000}$ Öse.
Typhus, Virulenz $^1/_4$ Öse; die Aufschwemmung enthält in 1 ccm $^1/_{10000}$ Öse.
Paratyphus, Virulenz $^1/_{10}$ Öse; die Aufschwemmung enthält in 1 ccm $^1/_{20000}$ Öse.

	Sofort nach Verdünnung m. Bouillon	Sofort nach Verdünnung m. Kochsalz	Verdünnung in Kochsalzlösung, dann bei 37°				
			$^1/_4$ Std.	$^1/_2$ Std.	2 Std.	4 Std.	24 Std.
Cholera	6000	3000	75	25	0	0	0
Typhus	8500	3780	3100	2500	300	0	0
Paratyphus	5500	3600	1850	750	400	0	0

In den Bouillonaufschwemmungen war nach 4 Stunden Vermehrung eingetreten.

Zusatz geringer Mengen von Nährsubstanzen setzt die Bakterizidie durch Kochsalzlösung meist erheblich herab. Auch dann kann aber eine anfängliche Keimverminderung mitunter beobachtet werden. Jedenfalls muß man sich bei der Untersuchung bakterizider Serumwirkungen überzeugen, daß das Medium, in dem der Versuch vor sich geht, an sich das Bakterienwachstum nicht wesentlich hemmt. Nach M. Neiser und Wechsberg genügt hierzu im allgemeinen ein Zusatz von 3 Tropfen Bouillon zu einer Menge von 2 ccm Kochsalzlösung.

Quantitative Bestimmung der bakteriziden Kraft des Serums.

Ein Urteil über die Stärke der Bakterizidie kann gewonnen werden:

1. Aus der Menge der Bakterien, die von einer bestimmten Menge unverdünnten Serums eben noch abgetötet werden. So vermag nach Buxton (Journal of Med. Res. 1904, Vol. XIII) 1 ccm frisches Kaninchenserum 1 Million Typhusbazillen, 50 Millionen Paratyphusbazillen und 100 Millionen Choleravibrionen völlig abzutöten.

Wright hat nach diesem Prinzip eine besondere Methode ausgearbeitet (siehe später).

2. Aus dem Verdünnungsgrade, in dem ein Serum eben noch eine deutliche bakterizide Wirkung entfaltet. Auch dieses Prinzip ist besonders von Wright zu quantitativen Bestimmungen verwertet worden.

3. Aus der Stärke der Bakterienverminderung, die bei gleicher Einsaatmenge nach einer bestimmten Zeit eingetreten ist. Gewöhnlich findet, wie oben erwähnt, die Keimbestimmung mehrmals, in verschiedenen Abständen statt. Diese Methode ist die üblichste für die Untersuchung normaler Sera. Für die Untersuchung der Immunsera ist eine Verbindung der Methoden 2 und 3 gebräuchlich.

Zur Anstellung des bakteriziden Versuches nach der üblichen Methode ist erforderlich:

1. eine Reihe steriler mit Wattepfropf verschlossener kleiner Reagenzgläser, die in einem Reagenzglasgestell untergebracht sind;
2. die zu prüfenden, steril entnommenen Sera;
3. eine frische (24 stündige) Kultur;
4. sterile Bouillon (oder Kochsalzlösung) zur Verdünnung der Kultur;
5. ein Satz frisch sterilisierter kalibrierter Pipetten.

Für das Gießen der Platten sind noch notwendig:

6. eine Anzahl Röhrchen verflüssigten und auf ca. 42° C abgekühlten Agars (bzw. Gelatine usw.);
7. ein Satz steriler PETRIschalen.

Auf die Wichtigkeit der Sterilität aller verwandten Geräte sei bebesonders hingewiesen.

Die Kulturaufschwemmung soll möglichst so hergestellt sein, daß die Aussaatmenge gut zählbar ist, andrerseits durch die Serumwirkung innerhalb der Beobachtungszeit gerade völlig oder fast völlig abgetötet wird. Die geeignete Dichte muß event. durch Vorversuche festgestellt werden. Eine (für manche Fälle geeignete) Aufschwemmung von $^1/_{5000}$ Öse pro ccm kann in folgender Weise hergestellt werden: 1 Öse in 10 ccm Bouillon verreiben — 1 ccm der Aufschwemmung mit 9 ccm frischer Bouillon verdünnen (Aufschwemmung 2) — 1 ccm der Aufschwemmung 2 wieder mit 9 ccm Bouillon verdünnen (Aufschwemmung 3) — 1 ccm der Aufschwemmung 3 mit 4 ccm Bouillon verdünnen (Gebrauchsaufschwemmung).

In jedes Versuchsröhrchen kommt die gleiche Menge Serum, etwa 1 ccm. Handelt es sich um den Vergleich zweier Sera, a und b, so erhält eine Anzahl Röhrchen, etwa 4, je 1 ccm a, eine zweite Reihe von 4 Röhrchen je 1 ccm b. Jedes Röhrchen wird weiterhin mit einer bestimmten — für alle Röhrchen gleichen — Menge der Bakterienaufschwemmung versetzt, z. B. mit je 0,1 ccm der Aufschwemmung 1:5000.

Folgende Kontrollen sind zweckmäßig:

Kontrolle 1: Serum a ohne Bakterien } zur Sterilitätsprüfung,
„ 2: „ b „ „ }

„ 3: Bestimmung der Aussaat. 1 Röhrchen wird mit 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, der 3 Tropfen Bouillon zugesetzt werden. Das Röhrchen erhält dann die gleiche Impfmenge wie die Versuchsröhrchen.

Die Röhrchen werden geschüttelt und kommen in den Brutschrank. Kontrolle 3 wird sofort ohne vorangehende Bebrütung mit Agar zur Platte ausgegossen. Auch von den Röhrchen des eigentlichen Versuchs kann je eins sofort zur Platte verarbeitet werden, wenn man die Größe der Abtötung bestimmen will, die bereits im ersten Augenblick der Serumeinwirkung stattfindet.

Von den im Brutschrank befindlichen Röhrchen wird nach bestimmten Zeiträumen, etwa 2—4—6 Stunden, je ein Röhrchen beider Reihen herausgenommen und zur Platte verarbeitet. Nach 24 stündigem Stehen im Brutschrank werden die Agarplatten gezählt.

Zwei Versuchsprotokolle seien hier angeführt.

1. Cohn, Zeitschr. für Hyg. 1903, Bd. XLV, pag. 68:

Von einer Typhusbouillonkultur werden gleiche Mengen übertragen

a) in aktives Kaninchenserum

b) in inaktives „

Resultat.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.	nach 24 Std.
Aktives Serum	1700	280	2	3
Inaktives Serum	900	6000	17 000	∞

2. Aus Trommsdorff, Archiv für Hyg. 1901, Bd. XXXIX, pag. 33. Menschliches Blutserum wird geprüft:

a) gegen frisch aus Patienten gezüchtete Typhusbazillen,

b) gegen einen Laboratoriumsstamm.

Um die Fehler jeder einzelnen Bestimmung zu verringern, wird jeder Versuch mehrfach angesetzt.

Resultat.

	Aussaat	nach 2—3 Std.	nach 5—6 Std.	n. 24—25 Std.
Reihe a . . .	10 221—12 256	2074—4275	3217—4664	39 125—8344
Reihe b . . .	2016—6586	0—0	0—0	0—0

Manche Einzelheiten über den bakteriziden Plattenversuch sind in dem Abschnitt über bakterizide Immunsera erwähnt.

Wrights Methoden.

A. E. Wright hat für die Untersuchung der Bakteriolysine — ebenso wie anderer Antikörper (Agglutinine, Opsonine) — eine eigene Methodik ausgearbeitet, die nur sehr kleiner Serummengen benötigt. Das Grundprinzip der Wrightschen Methodik ist die Anwendung von Glaskapillaren, in denen sowohl die Mischung wie die Einwirkung des Serums auf die Bakterien, zum Teil auch die kulturelle Prüfung, vor sich geht. Wright hat es verstanden, durch zweckmäßige Benutzung der Glasblasekunst seinen Versuchen eine außerordentlich kompendiöse und übersichtliche Form zu geben. Er nimmt keine Rücksicht auf die komplexe Zusammensetzung der Bakteriolysine, sondern beschränkt sich auf die Feststellung, wie groß die bakterizide Fähigkeit des Serums, als Ganzes betrachtet, bei Gesunden und Kranken bzw. Immunisierten ist. Es wäre leicht, durch geringe Modifikationen der Methode diese auch

zur quantitativen Bewertung des Ambozeptorengehaltes eines Serums zu benutzen.

WRIGHT hat die quantitative Prüfung des bakteriolytischen Vermögens auf zweierlei Weise vorgenommen, entweder:

1. indem er bestimmt, welche Serumverdünnung noch eine abgemessene Bakterienmenge am Auskeimen verhindert, oder

2. indem er bestimmt, wieviel Bakterien von einer festgesetzten Serummenge völlig abgetötet werden.

I. Methode der Serumverdünnungen.

(Lancet, 1. Dezember 1900.)

Zur Ausführung des Versuchs ist folgendes Instrumentarium nötig:

1. ein Satz steriler Uhrgläschen zur Herstellung der Serumverdünnungen;

2. sterile „Blutkapseln" zum Aufsaugen des Blutes und zur Gewinnung des Serums aus dem Blut (s. Fig. 1). Eine kurze Glasröhre von ca. 4 mm Durchmesser ist auf der einen Seite in eine gerade, auf der anderen Seite in eine gebogene Kapillare ausgezogen. Das aus einer Stichwunde des Fingers hervorquellende Blut wird durch die gebogene Kapillare in die Kapsel eingesogen, die etwa zu $^1/_2$ bis $^2/_3$ gefüllt wird. Um das Blut steril zu gewinnen, befeuchtet WRIGHT die gereinigte Fingerkuppe mit Alkohol und brennt diesen rasch ab. Nach der Füllung der Glaskapsel wird der noch leere Teil der Kapsel rasch über der Flamme erwärmt, dann die mit dem leeren Ende in Verbindung stehende gerade Kapillare an ihrer Spitze in der Sparflamme eines Gasbrenners zugeschmolzen. Die durch die Erwärmung ausgedehnte Luft in der Kapsel zieht sich bald wieder zusammen und saugt damit das Blut völlig in die Kapsel ein. Jetzt wird auch die gebogene Kapillare zugeschmolzen und das Röhrchen nach Eintritt der Gerinnung zur Abscheidung des Serums zentrifugiert. Vor dem Gebrauch wird die Kapsel durch eine in der Flamme sterilisierte Zange aufgebrochen.

Fig. 1. Blutentnahme aus der Fingerbeere zur Serumgewinnung.

3. Die Kultur. WRIGHT impft von einer Bouillonkultur aus ein Gelatineröbrchen mit flachem Stich. Nach 12—18 stündiger Bebrütung bei 22° wird das Gelatineröhrchen, in dem eben Wachstum erkennbar ist, durch vorsichtiges Erwärmen geschmolzen. Um eine gründliche Durchmischung des Inhalts zu erzielen, wird dieser etwa 25 mal von einem Röhrchen in ein steriles zweites umgegossen. Eine annähernd gleiche Bakteriendichte erhält man auch, wenn man 2,5 cmm einer 10 fach verdünnten jungen Bouillonkulturen in ein Röhrchen mit geschmolzener Gelatine überträgt.

4. Eine kalibrierte Kapillarpipette (s. Fig. 2). Die ca. 0,25—0,4 mm weite Kapillarröhre ist durch Graduirung mit einer bestimmten Menge Quecksilber in gleiche Volumina von ca. je 2,5 cmm eingeteilt. Die Kapillare ist an der Stelle ihres Übergangs in das weite Rohr rechtwinklig gebogen. Mit Hilfe eines über das weite Ende gestülpten Gummiballons füllt man die gewünschten Flüssigkeitsmengen in die Pipette bzw. treibt sie durch leichten Druck auf den Ballon wieder aus.

5. Sterile Kapillarkulturröhrchen (s. Fig 2). Eine an ihrer Übergangsstelle rechtwinklig abgebogene Kapillare ist an ihrem Ende zu einer sehr feinen zugeschmolzenen Spitze ausgezogen. Diese Kapillare dient zur Aufnahme und Mischung von Serum und Gelatinekultur, in ihr wird das erstarrte Gemisch auch zur Auskeimung in den Brutschrank (22°) gebracht.

a
b
Messpipette
←Kapillarkulturröhrchen
z

Fig. 2. Meßpipette und Kapillarkulturröhrchen. Aus der Pipette sind 1 Vol. Kultur (*b*) und 1 Vol. Serum (*a*) in das Kulturröhrchen übergefüllt, 1 Vol. Serum bleibt in der Pipette.

6. Ein Behälter, der zum Anwärmen aller für den Versuch gebrauchten Gegenstände (Kulturröhren, Uhrgläser, Kulturen, Pipetten) auf etwa 37° dient. (Ein doppelwandiges Gefäß, dessen Wände mit warmem Wasser gefüllt werden).

7. Sterile Bouillon zur Herstellung der Serumverdünnungen.

8. Ein Gefäß mit kochendem Wasser, in dem vor jeder neuen Abmessung die Pipette durch durch Aufsaugen des Wassers gereinigt und sterilisiert wird.

9. Eine am Ende mit einer feinen Glaskapillare durchlochte Gummikappe (s. Fig. 3).

a+b

Fig. 3.
Kultur und Serum sind in dem Kulturröhrchen gemischt und in den mittleren Teil der Kapillare gebracht worden, die darauf an ihrem unteren Ende zugeschmolzen worden ist. Der Gummiballon kann jetzt entfernt werden.

Der Versuch selbst geht in folgender Weise vor sich: Mit Hilfe der Meßpipette werden Serumverdünnungen für (Typhusuntersuchungen etwa $^1/_2$, $^1/_5$, $^1/_{10}$, $^1/_{20}$, $^1/_{40}$) hergestellt. In die Meßpipette werden dann 2 Teile (à 2,5 cmm) Serum (bzw. Serumverdünnung) und 1 Teil der geschmolzenen gut gemischten Gelatinekultur eingefüllt, die Pipette wird in das weite Ende des Kulturröhrchens eingeführt, bis sie an der Umbiegungsstelle des Röhrchens auf die gegenüberliegende Glaswand stößt (siehe Fig. 2). Es werden jetzt aus der Pipette die beiden der Öffnung zunächst gelegenen

Volumina, also ein Teil Kultur und ein Teil Serum durch Druck auf den Ballon entleert, ein Teil Serum bleibt in der Pipette (es wird auf die Weise verhindert, daß durch Auspressen von Luft die Flüssigkeit ins Schäumen gerät). Die ausgepreßte Flüssigkeit sammelt sich in der Kapillare des Kulturröhrchens dicht hinter der Umbiegungsstelle an. Das äußerste sehr feine Ende der Kapillare wird nun an der Spitze abgebrochen, über das weite Ende des Röhrchens nach Entfernung der Pipette der mit einem Kapillarventil versehene Gummiball vorsichtig gestülpt. Durch vorsichtigen Druck auf den Ball und folgendes Nachlassen wird die Flüssigkeit tiefer in die Kapillare eingetrieben und dann wieder höher aufgesogen. Es wird durch mehrfache Wiederholung dieses Verfahrens eine gründliche Durchmischung der Kultur mit dem Serum erzielt. Diese Art der Durchmischung vermeidet jegliche Blasenbildung in der Gelatine, die bei deren zäher Konsistenz eine weitere gründliche Mischung unmöglich machen würde. Nach der Mischung wird die

Fig. 4. Die abgeschnittenen Kapillaren sind nach der Bebrütung in eine mit Kanadabalsam oder Zedernöl gefüllte Glaskammer gebracht.

Fig. 5. Mikroskopisches Bild der Kulturkapillaren.

Flüssigkeit in den mittleren Teil der Kapillare gedrückt, diese am Ende zugeschmolzen und der Gummiball entfernt. In derselben Weise werden eine ganze Reihe Kulturröhrchen mit den verschiedenen Serumverdünnungen und Kultur beschickt. Nachdem jedes Röhrchen markiert ist, werden alle für 2—3 Tage in den Brutschrank bei 22° C gebracht. Nach der Bebrütung werden die Kapillaren unterhalb des Knies abgeschnitten und nun bei schwacher Vergrößerung mikroskopisch untersucht. Die Untersuchung geschieht in folgender Weise: Die vier Ecken eines Objektträgers werden mit kleinen Siegellackpfeilern versehen. Auf den Objektträger wird etwas Kanadabalsam oder Zedernöl gebracht und dann ein zweiter angewärmter Objektträger aufgelegt und etwas angepreßt, so daß eine mit Flüssigkeit versehene niedrige Kammer entsteht. In diese werden die abgeschnittenen Kapillaren eingelegt; bei schwacher Vergrößerung werden dann die Kolonien in jeder Kapillare gezählt (s. Fig. 4 und 5). Ein Untersuchungsprotokoll sei im Auszug mitgeteilt:

Bakterizidie des menschlichen Serums gegenüber Typhusbazillen.
(Lancet 1900, Vol. II, pag. 1560.)

Herkunft des Serums	Serumverdünnung							Kontrollröhren		
	2	10	20	40	50	80	100	1	2	3
	Zahl der Kolonien									
Gesunder W . .	0	0	—	36	—	51	73	41	52	43
Gesunder S . .	0	0	—	über 200	—	über 200	—	über 200	über 200	über 200
Gesunder R . .	0	0	0	0	—	100	100	über 200	über 200	über 200

Die Verdünnungszahlen geben das Verhältnis des Gesamtinhaltes zur Serummenge an.

Die Kontrollröhren enthalten statt der Serumverdünnungen reine Bouillon.

II. Methode der Kulturverdünnungen

(Lancet, 2. III. 1901 und Proceedings of the Royal Soc. London, 1902, 5. Aug.).

Für die Mehrzahl seiner Untersuchungen hat Wright die Methode der Kulturverdünnungen angewandt, die anzeigt, wieviel Bakterien von einer bestimmten Menge Serum noch völlig abgetötet werden.

Folgendes Instrumentarium ist erforderlich:

1. ein Satz steriler Uhrgläschen,
2. sterile Blutkapseln,
3. eine 24stündige (Typhus-) Bouillonkultur,
4. sterile Bouillon,
5. ein Gefäß mit kochendem Wasser,
6. eine kalibrierte Meßpipette zur Herstellung der Kulturverdünnungen. Es kann die oben beschriebene Pipette benutzt werden; Wright empfiehlt mehr folgende Form (Fig. 6): Die Kapillare der Pipette ist in Volumina zu ca. je 2,5 cmm geteilt, sie faßt etwa zehn solcher Teile. An die Kapillare schließt sich ein in der Mitte wieder durch ein kurzes dickeres Kapillarstück geteilter größerer Hohlraum an, dessen Ausdehnung so bemessen ist, daß die 225 und 250 cmm bezeichnenden Marken sich gerade an der Zwischenkapillare befinden. Mit Hilfe dieser Pipette lassen sich leicht beliebige Verdünnungen herstellen. Eine Kulturverdünnung 1:10 z. B. erhält man, indem man bis zum Teilstrich 225

Fig. 6. Pipette zur Herstellung von Verdünnungen.

Fig. 7. Kulturkapillare für Bouillonkulturen.

Bouillon aufsaugt, dann Kultur nachzieht, bis die Gesamtflüssigkeit den Teilstrich 250 erreicht. Durch Ausblasen des Inhalts in ein steriles Uhrgläschen und wiederholtes Aufsaugen wird die Mischung bewirkt. In dieser Weise werden in Uhrgläschen eine Reihe von Verdünnungen hergestellt, für Typhusuntersuchungen etwa nach folgendem Schema:

1-, 2-, 5-, 10-, 25-, 50-, 100-, 1000-, 10000-, 100000-, 1000000fache Verdünnung.

Um die in der Volumeneinheit enthaltene Bakterienzahl zu ermitteln, bläst Wright 10 cmm einer stärkeren Verdünnung (etwa 1:1000000) auf eine Agarplatte und zählt nach 24stündiger Bebrütung die entstandenen Kolonien. In dieser Weise werden 3 Platten angelegt; durch Rechnung läßt sich leicht ermitteln, wieviel Keime in 1 ccm der Originalaufschwemmung enthalten sind.

7. Um die bakterizide Kraft des Serums zu prüfen, wird ein Teil unverdünntes Serum mit einem Teil Kultur bzw. Kulturverdünnung gemischt. Nach 24stündiger Einwirkung bei 37° C wird die Mischung in ein Bouillonröhrchen oder auf die Oberfläche eines Agarröhrchens gespritzt. Es wird geprüft, ob hier Wachstum eintritt oder ausbleibt. Wright hat zur Vereinfachung der geschilderten Maßnahmen besondere Kulturkapillaren angegeben (s. Fig. 7). An die mit einer Marke versehene Kapillare schließt sich ein für die Aufnahme von Bouillon bestimmter ca. 1 ccm großer Hohlraum, der mit dem anderen Ende des Röhrchens durch eine gebogene Kapillare in Verbindung steht. Die gebogene Kapillare verhindert das Eindringen von Luftkeimen.

Der Hohlraum wird zu etwa $^2/_3$ mit steriler Bouillon gefüllt, die in der Kapillare befindliche Flüssigkeit wird völlig in den Hohlraum eingesogen, so daß die Kapillare wieder leer ist. Dann wird die Kapillare bis zur Marke mit unverdünntem Serum gefüllt, worauf eine Luftblase eingesogen und Kultur bzw. eine Kulturverdünnung bis zur Marke aufgesogen wird. Serum und Kultur werden aus der Kapillare in ein steriles Uhrgläschen ausgeblasen, dort gemischt und wieder in die Kapillare eingesogen. Darauf wird die Kapillare an ihrem Ende zugeschmolzen. In dieser Weise wird mit den verschiedenen Kulturverdünnungen ein ganzer Satz von Mischungen angelegt. Alle Handhabungen müssen so vorgenommen werden, daß die in dem größeren Hohlraum befindliche Bouillon nicht wieder ausgetrieben wird; die zugeschmolzenen Röhrchen kommen für 18—24 Stunden in einen Brutschrank von 37° C, danach wird das unterste Ende der Kapillare in der Sparflamme zu einer Kapillare allerfeinsten Durchmessers ausgezogen und auf das weite Ende des Kulturröhrchens ein zusammengedrückter Gummiball gesetzt. Wenn nun die ganz feine Kapillare in ihrem Verlauf abgebrochen wird, so saugt der Gummiball die Serumkulturmischung in den mit Bouillon gefüllten Hohlraum. Nach weiterer eintägiger Bebrütung bei 37° wird aus der Trübung oder dem Klarbleiben der Bouillon geschlossen, ob die angewandte Kulturverdünnung völlig abgetötet worden ist oder nicht.

Wright hat die Methode auch für anaerobe Bedingungen ausgearbeitet (l. c.). Der Abschluß der Luft wird durch steriles säurefreies Öl erreicht. Die Einzelheiten dieser Methodik siehe im Original.

Protokoll eines Versuchs

(Lancet 2. III. 1901, pag. 611).

Prüfung der Bakterizidie eines normalen Serums gegen Choleravibrionen und gegen Typhusbazillen nach der Methode der Kulturverdünnungen.

A. Bestimmung der Aussaatmenge.

5 cmm einer Kulturverdünnung 1:100000 werden auf die Oberfläche eines Agarröhrchens gespritzt. Zählung der sich entwickelnden Kolonien.

Bakterienart	5 cmm einer Kulturverd. 1 : 100 000 enthalten		1 cmm der Orginalkultur enthält also
Choleravibrionen	Probe 1	20 Keime	410 000 Keime
	„ 2	21 „	
	Durchschnitt	20,5 Keime	
Typhusbazillen	Probe 1	21 Keime	510 000 Keime
	„ 2	30 „	
	Durchschnitt	25,5 Keime	

B. Bestimmung der bakteriziden Kraft des Serums.

Gleiche Mengen einer bestimmten Kulturverdünnung und unverdünnten Serums werden gemischt. Nach 24stündiger Einwirkung wird die Mischung auf Agarröhrchen ausgeblasen. Die Zahl der dort sich entwickelnden Kolonien wird bestimmt.

Bakterienart	Verdünnungsgrad der Bakterienaufschwemmung	Zahl der sich auf Agar entwickelnden Kolonien	1 cmm Serum tötet also
Cholera . .	unverdünnt	1	nahezu 410 000 Keime
	1 : 10	0	
	1 : 100	0	
	1 : 1000	0	
	1 : 10 000	0	
	1 : 100 000	0	
Typhus . .	1 : 10	8	nahezu 5100 Keime
	1 : 100	1	
	1 : 1000	0	
	1 : 10 000	0	
	1 : 100 000	0	

Die Kurve (s. Fig. 8) (aus Wright, Kurze Abhandlung über Antityphusinokulation, G. Fischer, Jena 1906) ist ein Beispiel für die Veränderungen der bakteriolytischen Kraft des Serums, wie sie nach prophylaktischen Injektionen abgetöteter Typhusbazillen beobachtet werden Die einzelnen Punkte der Kurve geben an, wieviel Millionen Typhusbazillen jeweils von 1 ccm Serum abgetötet werden. Die Zahlen unter der 500-Linie sind in 100facher Vergrößerung dargestellt.

a) Prüfung der Immunsera im Plattenverfahren.

Der bakterizide Reagenzglasversuch wurde zunächst in unveränderter Form auch auf die Immunsera übertragen. Die von Wright mit Hilfe seiner Kapillarenmethode angestellten Untersuchungen beziehen sich z. B. vorwiegend auf die Serumwirkungen Immunisierter. Konnte Wright auch bestimmte Resultate erheben, so entsprachen doch in anderen Fällen die Resultate nicht den Erwartungen. Die Immunsera wirkten mitunter kaum stärker als die entsprechenden Normalsera. Erst die Erkenntnis der komplexen Zusammensetzung der bakteriziden Stoffe zeigte den Weg, wie der bakterizide Reagenzglasversuch für die Prüfung der Immunsera zweckmäßig abzuändern sei. Da die Komplementmenge eines Serums durch die Immunisierung nicht vermehrt wird, so reicht sie häufig nicht aus, um die in der gleichen Serummenge enthaltenen Immunkörper voll zur Geltung kommen zu lassen. Es bedarf also eines Zusatzes von normalem aktiven (komplementhaltigen) Serum, um ein Urteil über den Gehalt an Immunkörpern zu gewinnen. Zu verschiedenen

Fig. 8. Die Kurve stellt den Anstieg der bakteriolytischen Kraft des Serums nach einer prophylaktischen Injektion von abgetöteten Typhusbazillen dar. Die Ordinaten geben an, wieviel Millionen Typhusbazillen jeweils von 1 ccm Serum abgetötet werden. Die Ordinaten unter der 500-Linie sind in 100facher Vergrößerung dargestellt.

Verdünnungen des Immunserums wird stets die gleiche Komplementmenge hinzugesetzt und bestimmt, bei welchem Verdünnungsgrade sich noch völlige Abtötung — oder eine deutliche Keimverminderung — nach einer gewissen Zeit geltend macht. Unter Berücksichtigung dieses Gesichtspunktes hat J. Trumpp (Archiv für Hyg. 1898, Bd. XXXIII, pag. 70) bakterizide Reagenzglasversuche über Immunsera angestellt.

Die genaue Ausgestaltung hat der bakterizide Reagenzglasversuch durch M. Neisser und Wechsberg erfahren (Münchener med. Wochenschrift 1901, Nr. 18). M. Neisser hat später in Ehrlichs gesammelten Arbeiten zur Immunitätsforschung (Berlin 1904, Hirschwald), diese Technik eingehend beschrieben.

Hochwertige Immunsera können zu ihrer Konservierung mit 0,5 % Phenol versetzt sein — die in Betracht kommenden Serummengen sind so gering, daß in dieser Verdünnung das Desinfiziens nicht mehr bakterizid wirkt und auch das Komplement nicht schädigt. Die Immunsera können auf Eis aufbewahrt werden, am besten in kleineren Einzelmengen,

die dann in kurzer Zeit verbraucht werden. Auf diese Weise wird eine sonst leicht eintretende nachträgliche bakterielle Verunreinigung bei der häufigen Entnahme von Serum aus dem Aufbewahrungsgefäß vermieden.

Das Komplement muß stets frisch und darf nicht mit Desinfizientien versetzt sein. Länger als 2—3 Tage im Eisschrank aufbewahrtes Komplement sollte auf keinen Fall verwandt werden; auch hier kann bereits eine unliebsame Abschwächung eingetreten sein.

Als Komplement kann nur solches Normalserum benutzt werden, das tatsächlich den immunisatorisch erzeugten Antikörper zu aktivieren vermag. Man wird hierauf am ersten rechnen können, wenn man als Normalserum das aktive Serum jener Tierart verwendet, die das Immunserum geliefert hat. Eine Anzahl anderer wirksamer Kombinationen ist in folgender Tabelle zusammengestellt:

Bakterienart	Immunserum	Komplement	Autoren
Vibrio Nordhafen	Kaninchen	Pferd	Neisser u. Wechsberg l. c.
do. „	do.	Ziege	do. do.
do. „	do.	Hammel	do. do.
do. „	do.	Meerschweinchen	do. do.
do. Metschnikoff	Huhn	Taube	Lipstein (Centralbl. für Bakt., Bd. XXXI, pag. 460)
do. „	Gans	Taube	do.
do. „	do.	Kaninchen	do.
do. „	do.	Ziege	do.
do. „	Ziege	Kaninchen	do.
do. Cholerae	Ziege	Kaninchen	Bail u. Kikuchi, Archiv für Hygiene, Bd. LIII
Bac. Dysenteriae	Pferd	Pferd	Shiga, Deutsche mediz. Wochenschr. 1904, pag. 79
do. „	do.	Mensch (die anderen auf ihre Kompletierungsfähigkeit untersuchten Sera waren wirkungslos)	do. do.
Bac. Typhi	Mensch	Kaninchen	do.
do. „	do.	do.	Töpfer u. Jaffé, Zeitschr. für Hygiene, Bd. 52
do. „	Kaninchen	do.	Töpfer und Neisser und Wechsberg
do. „	Esel	do.	do. do. do.
do. „	Pferd	do.	Bail, Archiv für Hygiene, Bd. LII
do. „	Kaninchen	Ziege	Neisser und Wechsberg
do. „	Hund	Meerschweinchen	do. do.

Zweckmäßig wird man sich jedesmal in einem Vorversuch von der Wirksamkeit der in Aussicht genommenen Serumzusammenstellung überzeugen.

Als Nährboden wird meist Agar benutzt. Man muß sich jedenfalls überzeugen, daß die verwandte Bakterienart auch im Plattenausguß des Nährbodens gut und gleichmäßig gedeiht.

Die Einsaatmenge wird so bemessen, daß nach dreistündiger Bebrütung die zur Plattenaussaat benutzte Flüssigkeitsmenge (5—10 Tropfen)

des immunserumfreien Kontrollröhrchens mindestens viele Tausende von Bakterien enthält.

Man benutzt nur eintägige Kulturen, von Bouillonkulturen wird etwa $^1/_{500}$ ccm, von Agarkulturen $^1/_{1000}$—$^1/_{10000}$ einer Platinöse von bestimmter Fassungskraft (2—3 mg) verwandt.

Zur Herstellung der Kulturverdünnungen nimmt man häufig sterile, physiologische Kochsalzlösung. Wenn, wie es mitunter der Fall ist, hierdurch eine beträchtliche Schädigung der Bakterien eintritt, so ist Bouillon als Verdünnungsflüssigkeit vorzuziehen. Diese von Fall zu Fall wechselnden Vorbedingungen sind eventuell durch besondere Versuche festzustellen.

Der Versuch wird angesetzt in sterilen mit Wattepfropf verschlossenen Reagenzgläschen, die am besten 10 cm Länge und ca. 1,3 cm Durchmesser haben. Auf Staubfreiheit der Zimmerluft ist zu achten. Es ist zweckmäßig, die einmal entfernten, auf sterilen Glasschalen niedergelegten Wattepfropfen erst nach Zusatz aller einzelnen Teile wieder aufzusetzen, fortwährendes Öffnen und Schließen der Gläser stört die Sterilität leichter. Die Wattepfropfen müssen, bevor sie wieder aufgesetzt werden, an ihrem unteren Ende abgebrannt werden.

Vor dem Ansetzen des Versuches wird in einem Vorversuche die zu verwendende als Komplement dienende Normalserummenge bestimmt. Diese darf für sich keine oder höchstens eine ganz unbedeutende Keimverminderung bewirken. In eine Reihe von Röhrchen kommen fallende Mengen von Komplement, alle Röhrchen werden mit Kochsalzlösung auf gleiches Volumen aufgefüllt und dann mit der gleichen Bakterienmenge versetzt. Nach dreistündigem Aufenthalt im Brutschrank werden Platten gegossen.

Wenn die geeignete Komplementmenge bestimmt ist, wird der Hauptversuch in folgender Weise angesetzt:

In eine Reihe von Röhrchen werden fallende Mengen des vorher inaktivierten Immunserums, etwa 1,0, 0,5, 0,25, 0,1. 0,05 ccm usw. gebracht; dann wird zu jedem Röhrchen die gleiche Komplementmenge und die Bakterienverdünnung gesetzt, etwa 1 ccm einer Aufschwemmung von einer Normalöse in 1000 ccm physiologischer Kochsalzlösung, und das Gemisch mit Kochsalzlösung auf das gleiche Volumen — etwa 2 $^1/_2$ ccm — aufgefüllt. Zur Erzielung eines gleichmäßigen Wachstums ist der Zusatz von 3 Tropfen Bouillon zu jedem Röhrchen empfehlenswert. Folgende Kontrollen sind nötig:

1. Eine Probe, die nur Bakterien ohne Zusatz von Immunserum und Komplement enthält. Die Probe ist mit physiologischer Kochsalzlösung auf 2,5 ccm aufzufüllen und mit 3 Tropfen Bouillon zu versetzen. Sie bestimmt die Aussaatmenge. Stern und Korte (Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 9) setzen diese Probe doppelt an, das eine Röhrchen wird sofort zur Platte ausgezogen, das andere erst nach dreistündiger Bebrütung.

2) Eine die gleiche Bakterien- und die gleiche Komplementmenge wie die übrigen Röhrchen enthaltende Probe ohne Immunserum. Diese Probe soll zeigen, daß die verwandte Komplementmenge an sich nicht abtötet.

3. Eine die gleiche Bakterien- und die gleiche Immunserummenge enthaltende Probe ohne Komplementzusatz. Sie prüft, ob das inaktivierte Immunserum an sich wirkungslos ist.

4. Die größte im Versuch verwandte Immunserumdosis, ohne Komplement und ohne Bakterien, zur Sterilitätsprüfung.

5. Die verwandte Komplementmenge für sich, zur Sterilitätsprüfung.

Will man den möglichen Einfluß der Agglutination bestimmen, so empfiehlt sich eine weitere Kontrollreihe, die ebenso angesetzt ist, wie die Versuchsreihe, nur statt des Komplementes inaktiviertes Normalserum enthält. Soweit die Keimverminderung nur eine scheinbare ist — als Folge der Agglutination — wird sie sich auch in diesem Satze geltend machen.

Im allgemeinen ist jedoch der Einfluß der Agglutination auf den Ausfall des Versuchs nur von recht geringem Einfluß. Die erwähnte Kontrollreihe ist meist entbehrlich.

Um zu entscheiden, wie stark der Gehalt eines Immun- oder Patientenserums an bakteriziden Ambozeptoren den eines Normalserums übertrifft, ist eine zweite Versuchsreihe anzusetzen, die an Stelle des inaktivierten Immunserums inaktiviertes Normalserum der gleichen Tierart in den gleichen Verdünnungen enthält.

Nach vorherigem gründlichen Schütteln verweilen die Röhrchen einige Stunden in dem Brutschrank bei 37 ° C. Die Einwirkungsdauer muß so bemessen sein, daß in ihr die bakteriziden Körper möglichst das Optimum ihrer Wirkung entfalten. Im allgemeinen ist ein dreistündiger Aufenthalt im Brutschrank zweckmäßig. In wichtigen Fällen wird man das Optimum vorher genau bestimmen. Kikuchi (Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII, Nr. 2) zeigte, daß die Bakteriolyse (ebenso wie die Agglutination und die Hämolyse) bei höheren Temperaturen (44—45 ° C) besser vor sich geht als bei 37 ° C. Im allgemeinen wird man sich mit der üblichen Brutschranktemperatur (ca. 37 ° C) begnügen.

Nach Ablauf der Einwirkungszeit wird aus jedem Röhrchen eine bestimmte gleiche Menge, etwa 0,2—0,5 ccm oder 5—10 Tropfen (die Pipetten müssen gleichmäßige Dicke haben!) entnommen, mit Agar gemischt und zur Platte ausgegossen. Die Platten werden, um das Verfließen der Kolonien zu verhindern, umgekehrt in den Brutschrank gestellt und nach 18—24 Stunden gezählt.

Töpfer und Jaffé (Zeitschr. für Hyg. 1906, Bd. LII, pag. 393) empfehlen, um die Rasenbildung im Kondenswasser zu vermeiden, folgendes Verfahren: Auf den Boden der Petrischale wird eine dünne Agarschicht gegossen, nach dem Erstarren wird auf diese Schicht die Aussaat und eine neue Menge flüssigen Agars gebracht, die in der Petrischale mit der Aussaat gründlich durchgemischt wird. Wenn auch diese zweite Agarschicht fest geworden ist, wird sie mit einer dritten Schicht sterilen Agars überdeckt.

Neufeld und Hüne (Arbeit. aus d. Kais. Gesundh.-Amt, Bd. XXV, H. 1) betonen, daß bei Verwendung von Gelatine als Nährboden das Resultat sehr verschieden sein kann, je nach dem schon nach 24 Stunden oder erst später gezählt wird. Es wachsen später noch Kolonien nach, die nach 24 Stunden nicht zu beobachten waren. Die Zählung kann auf dem Wolffhügelschen Zählbrett erfolgen; bei einiger Übung genügen im allgemeinen nach dem Augenmaß die Angaben: 0, etwa 100, einige Hunderte, etwa 1000, einige Tausende, viele Tausende, unzählbar viele. Nur größere Unterschiede sollen zu Schlüssen verwandt werden. Die Kontrollplatte ohne Immunserumzusatz muß stets mindestens viele Tausende von Kolonien enthalten. Bei deutlicher bakterizider Wirkung des Serums

weisen dann die entsprechenden Platten keine oder nur ganz vereinzelte Kolonien auf. Die Platten, die nur Immunserum bzw. nur Komplement ohne Bakterienzusatz enthalten, müssen steril sein. Statt der Zählung oder Schätzung der Keime genügt es mitunter auch, aus den Röhrchen je eine Platinöse zu entnehmen und auf schrägen Agar auszustreichen; grobe Unterschiede sind auch hier deutlich zu erkennen, man unterscheidet etwa folgende Werte: 0, einige Kolonien, viele Kolonien, dichter Rasen. NEISSER und LIPSTEIN (siehe NEISSER in EHRLICHS ges. Abhdl.) haben so die Wirkung eines bakteriziden Gonokokkenserums untersucht.

Die Zählmethode kann ergänzt werden durch die makroskopische Beobachtung der Mischungsröhrchen, in denen der Versuch angesetzt ist. Die Röhrchen bleiben im Brutschrank stehen und werden nach 6–24 Stunden geprüft, ob sie steril oder bewachsen, d. h. klar oder trüb sind. Meist stimmen die so erhaltenen Resultate gut mit denen des Plattenversuchs überein. Da aber auch bei ausgesprochener Bakterizide doch einzelne Keime der Serumwirkung widerstehen und zu einer nachträglichen Keimvermehrung führen können, so versagt diese Methode mitunter.

In der Mehrzahl der Versuche beobachtet man das von M. NEISSER und WECHSBERG als „Komplementablenkung“ bezeichnete Phänomen. Die Platten, die die größeren Mengen Immunserum enthalten, sind reich bewachsen, ebenso wie die mit ganz wenig Immunserum; dazwischen liegt eine Reihe Platten mit mittleren Immunserumdosen, in denen alle oder fast alle Bakterien abgetötet sind. Diese Hemmung der Bakteriсidie durch große Immunserummengen führen M. NEISSER und WECHSBERG auf eine Ablenkung des Komplements von den Bakterien durch einen Überschuß an Ambozeptoren zurück. Bezüglich der Erklärung dieses Phänomens sei auf die zitierte Arbeit von M. NEISSER und WECHSBERG verwiesen, ferner auf folgende Arbeiten: LIPSTEIN, Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXI, pag. 460 — BUXTON, Journal of med. Res. 1904, Vol. XIII.

Aus dem Auftreten dieses Phänomens folgt die Notwendigkeit, den bakteriziden Versuch auch mit stärkeren Serumverdünnungen anzusetzen.

Die Erscheinung der Komplementablenkung wird gelegentlich auch beobachtet, wenn statt des Immunserums inaktiviertes Normalserum verwandt wird (M. NEISSER und WECHSBERG l. c. — BUXTON l. c.).

Auch aktives Immunserum ohne Komplementzusatz kann das gleiche Phänomen geben (BUXTON l. c.). Größere Mengen des aktiven Immunserums sind dann wirkungslos, erst kleinere töten ab.

Nachfolgend sei ein Beispiel eines vollständigen bakteriziden Versuches gegeben (M. NEISSER und WECHSBERG l. c.).

(Siehe Tabelle pag. 408.)

Ein anderes Beispiel (aus BUXTON l. c.) zeigt das Auftreten der Komplementablenkung bei Verwendung aktiven Immunserums, das von einem gegen Typhusbazillen immunisierten Kaninchen stammte, ohne Komplementzusatz. Zur Kontrolle dient aktives normales Kaninchenserum in den gleichen Verdünnungen. Dieses tötet ab in Konzentrationen, in denen bei dem Immunserum sich deutliche Hemmung aufweist. Der Versuch zeigt ferner, wie gut die Beobachtung der 24 Stunden im Brutschrank gelassenen Röhrchen mit dem Resultat der Zählmethode übereinstimmt.

Auf das Phänomen der Komplementablenkung ist eine andere Methode des Nachweises immunisatorisch erzeugter Ambozeptoren von

Versuch von Neisser und Wechsberg.

Kontrolle	Kulturmenge	Inaktives Immunserum von Kaninchen gegen Vibrio Metschnikoff	Normales aktives Kaninchenserum zur Komplettierung	Zahl der Keime auf der Platte
	$^1/_{5000}$ ccm einer einer eintägig. Bouillonkultur von Vibrio Metschnikoff	1,0	0,3 ccm	∞
		0,5	0,3 „	∞
		0,25	0,3 „	Viele Tausende
		0,1	0,3 „	Einige Hundert
		0,05	0,3 „	etwa 100
		0,025	0,3 „	etwa 50
		0,01	0,3 „	0
		0,005	0,3 „	0
		0,0025	0,3 „	etwa 100
		0,001	0,3 „	∞
		0,0005	0,3 „	∞
I	$^1/_{5000}$ ccm	—	—	∞
II	$^1/_{5000}$ ccm	0,01	—	∞
III	—	1,0	—	0
IV	$^1/_{5000}$ ccm	—	0,3 ccm	∞
V	—	—	1,0 „	0

Zu jedem Röhrchen 3 Tropfen Bouillon. Mit 85 $^0/_0$iger Kochsalzlösung alle Röhrchen auf gleiches Volumen aufgefüllt. Sodann 3 Stunden im Thermostat bei 37° C. Hierauf je 5 Tropfen zu Agarplatten verarbeitet.

Versuch von Buxton.

Verdünnung	Zahl der Keime nach 5stündiger Bebrütung		Beobachtung der Röhrchen nach 24 Stunden	
	Normalserum	Immunserum	Normalserum	Immunserum
1	0	sehr viele Tausende	klar	getrübt
$^1/_2$	1	do. do.	do.	do.
$^1/_5$	2	do. do.	do.	do.
$^1/_{20}$	2500	4—5000	do.	klar
$^1/_{40}$	viele Tausende	4—5000	getrübt	do.
$^1/_{80}$	sehr viele Tausende	viele Tausende	do.	do.
$^1/_{100}$	do. do.	do. do.	do.	getrübt

Neisser und Wechsberg aufgebaut worden. Es wird diejenige Dosis eines normalen bakteriziden Serums oder eines Immunserums + Komplement bestimmt, bei der völlige Bakterizidie eintritt. Wir wissen jetzt, daß ein Mehr von Immunkörpern die Ablenkung gibt, die Bakterizidie also aufhebt oder verringert. Bewirkt also ein Zusatz des zu prüfenden Serums „Komplementablenkung", so wird umgekehrt auf die Anwesenheit bakterizider Immunkörper geschlossen. Bewiesen wird durch den positiven Ausfall des Versuchs, daß in dem geprüften Serum ein spezifisch gegen das betreffende Bakterium gerichteter Antikörper von bestimmten Eigenschaften (Komplementablenkung) ist. Es ist nicht ohne weiteres erwiesen, daß dieser Körper identisch mit dem bakteriziden Ambozeptor ist. Im allgemeinen stimmen allerdings diese Ablenkungsversuche recht gut mit den „bakteriziden" überein. Ein Versuchsbeispiel möge folgen (aus M. Neisser und Wechsberg l. c.), nur teilweise wiedergegeben:

Kulturmenge	Menge des komplettierenden aktiv. normalen Meerschweinchenserums	Zahl der Keime auf einer Platte bei Zusatz von inaktivem Ziegenserum gegen Vibrio Nordhafen			
		—	1,0 ccm	0,1 ccm	0,01 ccm
1/100 ccm einer eintägigen Bouillonkultur von Vibrio Nordhafen	1,0 ccm	0	viele Tausde.	vereinzelt	0
	0,5 „	0	fast ∞	etwa 100	0
	0,25 „	vereinzelt	∞	einige Hund.	vereinzelt
	0,1 „	mehr. Tausde.	∞	∞	etwa 100
	0,05 „	∞	∞	∞	viele Hund.
	0,025 „	∞	∞	∞	∞
	—	—	∞	∞	∞

M. Neisser benutzt neuerdings diese Methode, um sich ein vorläufiges Urteil über die bakterizide Wirkung eines gewonnenen Immunserums zu verschaffen. Im allgemeinen muß dem bakteriziden Versuch erst die Bestimmung der geeigneten Komplementdosis vorangehen. Wenn lediglich festgestellt werden soll, ob das Immunserum überhaupt für bakterizide Plattenversuche geeignet ist, so kann man diese Komplementbestimmung zunächst ersparen. Fallende Mengen inaktiven Immunserums werden mit der üblichen Bakteriendosis und einer Komplementmenge versetzt, die an sich — ohne Immunserumzusatz — bereits abtötet; 0,5 ccm genügen im allgemeinen dazu. Tritt jetzt eine deutliche Komplementablenkung ein, so kann daraus ein ungefährer Schluß auf den Wirkungswert des Immunserums gezogen werden. Für den eigentlichen bakteriziden Versuch ist die Bestimmung der geeigneten Komplementmenge unerläßlich.

b) Bioskopisches Verfahren.

M. Neisser und Wechsberg (Münchener med. Wochenschr. 1900, Nr. 37: vergl. auch dieselben, Zeitschr. für Hyg., Bd. XXXVI) haben ein Verfahren angegeben, die Schädigungen bzw. den Tod lebender Zellen aus der Aufhebung ihres Reduktionsvermögens zu erschließen. Das Verfahren ist zunächst benutzt worden, um Schädigungen von Organzellen (z. B. Nierenepithelien) und von Leukocyten zu studieren, kann aber ebenso auch für Bakterien angewandt werden. Die Methode beruht darauf, daß lebende Zellen die Fähigkeit haben, Methylenblau zu seiner farblosen Leukobase zu reduzieren, daß diese Entfärbung aber aufgehoben oder verringert wird, sobald die Zellen geschädigt sind.

Der Versuch wird ganz in der von M. Neisser und Wechsberg für das Zählverfahren angegebenen Weise angesetzt. Fallende Mengen Immunserum — die geeignete Komplementmenge — die gleiche Bakterieneinsaat — Auffüllung aller Röhrchen mit Kochsalzlösung auf gleiches Volumen — Zusatz von je 3 Tropfen Bouillon und je einem Tropfen einer sehr verdünnten Methylenblaulösung. Die Gemische werden mit Paraffin. liquid. überschichtet und für eine bestimmte Zeit, etwa 2 Stunden, in den Brutschrank gestellt. Die Bakterienmenge muß so gewählt sein, daß in dieser Zeit in dem nur Bakterien und Komplement, aber kein Immunserum enthaltenden Röhrchen gerade die Flüssigkeit völlig entfärbt wird. Die anderen Röhrchen zeigen je nach dem Grade

der Abtötung mehr oder weniger weitgehende Erhaltung der Farbe. Die Methylenblaulösung wird in folgender Weise hergestellt:

Methylenblau	1,0
Alcohol absol.	20,0
Aqua dest.	29,0

Von dieser Stammlösung wird zum Gebrauch 1 ccm mit 49 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und davon 1 Tropfen jedem Röhrchen zugesetzt.

Die Resultate des Versuchs entsprechen ganz denen des Zählverfahrens, es tritt z. B. auch die Komplementablenkung deutlich zutage (M. Neisser und Wechsberg, Münchener med. Wochenschr. 1901, Nr. 18).

II. Gewinnung bakteriolytischer Sera.

Die Zubereitung des als Antigen dienenden Injektionsmaterials, die Technik der Injektion, der Eintritt der Reaktion und andere zugehörige Fragen haben bereits in früheren Abschnitten Besprechung gefunden. Hier seien diese Fragen nur berührt, insoweit sie auf das Endresultat, die Erzielung des bakteriolytischen Serums, von direktem Einfluß sind.

Injektionsort.

Die meisten Untersucher betonen — wenigstens bei kleineren Tieren — die Überlegenheit der intravenösen Injektion zur Gewinnung bakteriolytischer Sera (Wassermann, Brüssel 1903, Internationaler Kongreß für Hyg. und Demogr., — Strong, Manila 1904).

Mertens hat in Pfeiffers Laboratorium (Deutsche med. Wochenschrift 1901, Nr. 24) vergleichende Untersuchungen über den Einfluß des Injektionsortes angestellt. Für die Ausführung war die Überlegung maßgebend, daß derartige Unterschiede sich besser zeigen würden bei Verwendung kleiner Dosen, die eben ausreichen, um — bei einer der in Frage kommenden Methoden — den maximalen Titerwert zu erzielen. Kaninchen wurden subkutan und intravenös mit kleinen Mengen abgetöteter Cholerakultur behandelt, das Serum wurde 7 Tage nach der Injektion im Pfeifferschen Versuch geprüft.

Dosis	1/5 Öse	1/20 Öse	1/20 Öse
Serumtiter bei subkutaner Injektion . .	0,004	0,007	0,06
Serumtiter bei intravenöser Injektion .	0,0002	0,0002	0,0004

Bei Anwendung sehr kleiner Dosen zeigt sich die intravenöse Injektion also der subkutanen überlegen.

Mit größeren Dosen gelingt es allerdings auch vom Unterhautzellgewebe aus, sehr hohe bakteriolytische Serumtiter zu erhalten. Die aus dem Institut für Infektionskrankheiten hervorgegangenen Arbeiten betonen zum Teil sogar, daß zur Gewinnung bakteriolytischer Sera die subkutane Injektion vorzuziehen sei; die intravenöse liefere dagegen besser agglutinierende Sera (Kolle, Klin. Jahrb. 1903 u. a.). Die intraperitoneale Injektion findet ebenfalls Anwendung zur Gewinnung bakteriolytischer Sera (siehe Choleraserum).

Auch vom Verdauungskanale aus ist eine aktive Immunisierung gegen manche der in Frage kommenden Bakterienarten möglich. Kutscher und Meinicke (Zeitschr. für Hyg. 1906, Bd. LII) fütterten Meerschweinchen mit lebenden Paratyphus- und Mäusetyphusbazillen. Mohrrübenschnitzel wurden mit dem Inhalt eines 24 Stunden bewachsenen Bouillonkölbchens getränkt, diese Mischung wurde an 10 Tiere verfüttert. Eine 4 Wochen später vorgenommene Infektion mit 1 Öse virulenter Kultur (= 1000 bis 10000 Dos. let. min.) wurde gut vertragen. In der Bauchhöhle der Tiere zerfielen dabei die Bakterien in der typischen Weise (vergl. auch Löffler, v. Leuthold-Festschrift I, und Wolff, Münchener med. Wochenschrift 1908, Nr. 6).

Die stomachale Immunisierung gegen Typhus gelang den Autoren nicht. Wright beobachtete eine Vermehrung der Bakteriolysine nach stomachaler Einführung von Typhusbazillen beim Meerschweinchen und beim Kaninchen. (Kurze Abhandlung über Antityphusinokulationen, Jena 1906.)

Kasten (Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 36) hat auf Wassermanns Veranlassung Untersuchungen angestellt, die zeigen, daß auch von der unverletzten Haut aus eine Immunisierung möglich ist. Eine 10 qcm große Fläche auf der Bauchhaut vom Kaninchen wurde rasiert und auf dieser eine Aufschwemmung von mehreren — lebenden oder toten — Agarkulturen in Bouillon $^1/_2$ Stunde lang mit einem Platinspatel gründlich verrieben. Die Einreibungen wurden mehrmals wiederholt. Es gelang auf diese Weise, Cholerasera von einem Titer bis zu $^1/_3$ mg, Typhussera bis zu 2 mg zu erhalten.

Impfmenge.

Genauere Untersuchungen über den Einfluß der Menge des Impfstoffes auf die Höhe des bakteriziden Titers sind aus dem Pfeifferschen Institut hervorgegangen.

Ascher (Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXIX, Nr. 4) zeigte, daß bei subkutaner Injektion von jungen Kaninchen mit bei 60° C abgetöteten Cholerakulturen der Serumtiter mit steigender Impfmenge zunahm. Die Unterschiede waren allerdings nicht groß und zeigten sich erst bei erheblichen Differenzen der Impfmenge.

Friedberger (v. Leyden-Festschrift, II. Bd.) spritzte Kaninchen in die Ohrvene abgestufte Mengen bei 60° C abgetöteter Choleraagarkulturen ein. Die Impfdosis war jedesmal in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, jedes Tier erhielt nur eine Injektion, 8 Tage nach der Impfung wurde der Serumtiter im Pfeifferschen Versuch bestimmt. Die Resultate sind aus folgender Tabelle ersichtlich:

Injektionsdosis:	Titer nach der Injektion:
$^1/_{20}$ Öse	0,0005—0,0002
$^1/_{100}$ "	0,0005—0,0003
$^1/_{500}$ "	0,005 —0,001
$^1/_{1000}$ "	0,005 —0,001
$^1/_{1000}$ "	0,003 —0,001
$^1/_{5000}$ "	0,1 —0,05
$^1/_{5000}$ "	0,1 —0,05

Die Untersuchung ergibt also, wenigstens bei intravenöser Injektion, daß eine deutliche Antikörperbildung schon mit ganz minimalen Bakterienmengen ($^1/_{5000}$ Öse) auszulösen ist, daß dann mit steigenden

Impfdosen auch der Serumtiter steigt, um aber bald, bei etwa $^1/_{100}$ Öse, eine Höhe zu erreichen, die bei weiterer Vermehrung des Impfstoffes kaum noch wächst.

Diese Beobachtung gilt zunächst für die intravenöse Injektion von Choleravibrionen bei Kaninchen. Bei subkutaner Injektion zeigt sich die Abhängigkeit des Serumtiters von der Impfmenge auch noch deutlich für größere Mengen (Ascher, l. c.). Das gleiche gilt nach den Erfahrungen von Hetsch und Kutscher (Klinisches Jahrb. 1905) für die Typhusschutzimpfung von Menschen. Die mit Dosen von einer Öse abgetöteter Typhusbazillen geimpften Menschen wiesen fast durchweg höhere Titer auf als die mit $^1/_{30}$ Öse geimpften. Sind die Bakterien durch eingreifendere Abtötungsverfahren stärker verändert, so genügen nach Friedberger und Moreschi (Centralbl. f. Bakt., Bd. XXXIX, pag. 453) ganz kleine Mengen auch bei intravenöser Injektion nicht, um stärkere Bildung von Bakteriolysinen auszulösen; es bedarf dann größerer Mengen.

Häufig ist eine gewisse Proportionalität zwischen der Stärke der Impfreaktion und der Titerhöhe beobachtet worden. Andererseits bedingt gerade die Stärke der Reaktion, sowohl beim Menschen wie beim Tier, die Festsetzung einer gewissen Grenzdosis, über die, wenigstens bei nur einmaliger Injektion, nicht hinausgegangen werden soll. Daß die Allgemein- oder Lokalreaktion nicht Bedingung der Antikörperbildung ist, lehren übrigens die Friedbergerschen Versuche über die Wirkung kleinster Mengen, ebenso die mit ungiftigen Kulturfiltraten (freien Rezeptoren) angestellten Versuche.

Die starke Giftwirkung einer Bakterienart und die dadurch bedingte Stärke der Reaktion können in manchen Fällen die Immunisierung sehr erschweren, so z. B. bei der Gewinnung von Dysenterieserum.

Die Stärke der Reaktion ist abhängig von dem Orte der Injektion, sie ist bei der intravenösen Injektion häufig (aber nicht immer) größer als bei der intraperitonealen, noch geringer bei der subkutanen. Dementsprechend werden die Dosen bei intravenöser Injektion meist kleiner gewählt, als bei intraperitonealer oder subkutaner.

Für die Dosierung ist es ferner wichtig, ob lebende oder tote Bakterien injiziert werden. Die Dosis let. min. liegt für lebende Bazillen niedriger, unter Umständen sehr bedeutend niedriger als für tote. In manchen Fällen wird es kaum möglich sein, die Immunisierung mit Injektionen lebender Bazillen zu beginnen, so z. B. wenn Meerschweinchen gegen Paratyphusbazillen immunisiert werden sollen, da hier bereits minimale Dosen ($^1/_{10000}$ Öse) oft letal sein können. Man wird dann zur Injektion lebender Bazillen erst übergehen, wenn durch vorangehende Immunisierung mit toten ein gewisser Schutz entstanden ist.

Virulenz, Bindungsvermögen.

Virulente Stämme pflegen höherwertige bakteriolytische Sera zu liefern als weniger virulente. Pfeiffer und Friedberger (Berliner klin. Wochenschr. 1902, pag. 581), injizierten Kaninchen intravenös kleinste Mengen ($^1/_{100}$ Öse) verschieden virulenter Cholerakulturen. Die erzielten Serumtiter schwankten um das 100fache, je nach dem Virulenzgrade. Von avirulenten Stämmen lösten selbst Dosen von 1 Öse nur eine geringe Ambozeptorbildung aus. Der Unterschied in der Serumstärke pflegt geringer zu sein, als der in der Virulenz der verwandten Stämme. (Wassermann, Brüssel 1903, Intern. Kongreß f. Hyg. u. Dem. Strong, Manila, 1904.)

Wassermann (Brüssel 1903 [Versuche mit Strong], u. Kochfestschrift 1903) führte dann aus, daß das Maßgebende für das antigene Vermögen eines Stammes nicht die Virulenz, sondern das Bindungsvermögen sei. Häufig gehen allerdings gerade bei Cholera (Pfeiffer und Friedberger l. c.) Virulenz und Bindungsvermögen parallel, dann ist der virulente Stamm auch der zur Immunisierung sich besser eignende. Als Wassermann zwei Typhusstämme untersuchte, von denen der weniger virulente das größere Bindungsvermögen hatte, gab dieser Stamm bei der Immunisierung den höheren bakteriolytischen Titer.

Pettersson (Centralbl. f. Bakt. Nr. 38, pag. 73) konnte allerdings Wassermann nicht bestätigen; er sieht in der Virulenz den wesentlichen Faktor.

Lebende Bakterien geben häufig einen stärkeren Reiz zur Immunkörperproduktion als tote (Wassermann l. c.—Pettersson l. c.). Wassermann führt diesen Unterschied auf eine Herabminderung der Bindungsfähigkeit durch die Abtötung zurück.

Im allgemeinen lassen sich aber auch bakteriolytische Sera maximaler Wirksamkeit durch Benutzung der viel ungefährlicheren abgetöteten Kulturen gewinnen. Bei Injektion lebender Kulturen muß man mit der Möglichkeit rechnen, daß die Bakterien längere Zeit in dem Versuchstier am Leben bleiben, selbst wenn mittlerweile das Serum ein höheres bakteriolytisches Vermögen angenommen hat.

Präparierung des Impfstoffs.

Die zur Injektion bestimmten Bakterien können in der verschiedensten Weise durch physikalische oder chemische Mittel abgetötet werden, oder es können die als Antigene wirksamen Bestandteile aus ihnen nach sehr verschiedenen Methoden extrahiert werden (vgl. Band I). Größere Bedeutung haben diese Methoden für die aktive Immunisierung der Menschen gegen Infektionskrankheiten erlangt. Es kommt hier darauf an, Antigene zu besitzen, die einerseits einen möglichst hohen Immunisierungswert geben, andererseits möglichst geringe lokale und allgemeine Reaktionen veranlassen. Im Tierversuch ist für diese Methoden der Nachweis geführt worden, daß es mit ihrer Hilfe gelingt, einen bestimmten Immunisierungseffekt zu erzielen. Auch am Menschen ist durch die Serumprüfung im Pfeifferschen oder im bakteriziden Reagenzglasversuch der Wert der Methoden geprüft worden. Bezüglich der Resultate sei auf Band I verwiesen. Hier seien nur einige vergleichende Untersuchungen über den Wert der verschiedenen Methoden an Tieren und Menschen angeführt.

Friedberger und Moreschi (Centralbl. f. Bakt. Bd. 39, pag. 453) verglichen die antigene Wirkung kleinster Dosen ($^1/_{100}$ Öse) verschiedenartig abgetöteter Typhus- und Cholerabakterien bei intravenöser Injektion an Kaninchen. Bruchteile von $^1/_{100}$ Öse einer bei 60° nach Kolle abgetöteten Agarkultur vermochten bereits ein Serum von maximaler Wirksamkeit (Titer ca. $^1/_{10}$ mg) zu erzeugen. Ein gleich wirksames Serum wird durch ebenso kleine Mengen eines nach Löffler bei 120° trocken sterilisierten Impfstoffes erzielt. Stärker eingreifende Maßnahmen setzen die antigene Wirkung herab. Abtötung der feuchten Bakterien bei Temperaturen über 100°, Einwirkung trockner Hitze von 150° verändert die Bakterien so, daß jene kleinen Impfmengen nur sehr geringe Antikörperbildung auslösen, der Titer steigt allerdings bei Verwendung

größerer Mengen. Durch Chloroformabtötung wird bemerkenswerter Weise die lysinogene Fähigkeit nur wenig beeinträchtigt, die agglutinogene aufgehoben.

Strong (Manila 1904) erzielte durch einmalige intravenöse Injektion von 6 ccm der nach M. Neisser-Shiga hergestellten freien Rezeptoren (Cholera) bei Kaninchen einen Serumtiter von 0,04 mg, der Serumtiter war höher als selbst nach Injektion von $^1/_2$ Öse lebender Kultur. 1 ccm Impfflüssigkeit entsprach 1—2 Ösen Kultur; die Autolyse hatte 2—5 Tage gedauert. Impfpulver gaben weniger gute Resultate.

Gaffky, Kolle, Hetsch und Kutscher (Klinisches Jahrb. 1905) verglichen den Wert der verschiedenen Schutzimpfungsmethoden gegen Typhus am Menschen. Zur Prüfung kamen die Verfahren von:

1. Pfeiffer-Kolle: Große Dosen bei 60° abgetöteter Bazillen.
2. Bassenge-Rimpau: Kleine Dosen bei 60° abgetöteter Bazillen.
3. M. Neisser-Shiga: Freie Rezeptoren.
4. Wassermann: Impfpulver.
5. Wright: Bouillonkulturen.

Das Serum wurde im Pfeifferschen Versuch gegen zwei verschiedene Stämme sieben Tage nach der ersten bzw. auch nach der zweiten Injektion geprüft.

Die Pfeiffer-Kollesche Methode gab die besten Resultate, es wurden mit ihr sehr häufig Titer von 1 mg erzielt, während die anderen Methoden nur Titer bis 2—5 mg ergaben.

Zahl der Impfungen.

Im allgemeinen ist es üblich, zur Erzielung besonders hochwertiger bakteriolytischer Sera mehrere Injektionen vorzunehmen. Tatsächlich steigt der Serumtiter häufig nach einer zweiten oder noch weiter fortgeführten Injektion weiter an, besonders in den Fällen, wo die erste Injektion noch keine besonders starke Antikörperbildung auslöste. Die größeren Versuchstiere (Pferde, Ziegen, Hammel) pflegen meistens, besonders auch, wenn es sich um Gewinnung von Seris zu therapeutischen Zwecken handelt, längere Zeit hindurch mit steigenden Dosen behandelt zu werden. Auch bei der Typhusschutzimpfung des Menschen hat sich die mehrmalige Injektion bewährt. Andererseits beweisen die Erfahrungen von Friedberger, Friedberger und Moreschi, Strong, Gaffky u. a., daß auch eine einmalige Injektion, besonders bei Kaninchen, bereits sehr hohe Serumtiter erzeugen kann.

Die Verwendung steigender Dosen entspricht den von Ehrlich (Deutsche med. Wochenschr. 1891) und v. Behring für künstliche Immunisierungen aufgestellten Prinzipien. Das Tier wird meist im Laufe des Immunisierungsprozesses toleranter; man kann daher, ohne zu starke Reaktionen zu fürchten, allmählich mit der Dosis steigen, in der Erwartung, daß der stärkeren Dosis auch eine stärkere Antikörperproduktion entsprechen wird.

Die Bakterienmengen, die einem längere Zeit vorbehandelten Tier einverleibt werden können, sind unter Umständen außerordentlich groß. Pfeiffer erwähnt, daß eine längere Zeit mit Cholerabazillen geimpfte Ziege schließlich die Injektion von mehr als 100 Agarkulturen lebender Bazillen auf einmal vertrug.

Die Tiere sollen immer erst dann neue Injektionen erhalten, wenn sie sich von der vorhergehenden erholt haben, sonst tritt leicht eine

Kumulierung der schädigenden Wirkung ein und die Tiere gehen zugrunde*).

Unmittelbar auf die Antigeninjektion folgt im allgemeinen eine „negative Phase“ (EHRLICH und BRIEGER, Zeitschr. für Hygiene 1893, Bd. XIII, pag. 336. — WRIGHT, Kurze Abhandl. über Antityphusinok., Jena 1906). Der verminderte Antikörpergehalt des Serums scheint häufig mit einer größeren Empfindlichkeit gegen das Antigen einherzugehen. Regelmäßige Wägungen sind, besonders wenn es sich um wertvollere Tiere handelt, sehr empfehlenswert. Das Gewicht der Tiere soll während des ganzen Immunisierungsprozesses nicht wesentlich sinken. Das übliche Intervall zwischen zwei oder mehr Injektionen — gutes Befinden des Tieres vorausgesetzt — beträgt etwa 10 Tage.

Zeitpunkt der Blutentnahme.

Die Blutentnahme zur Serumgewinnung soll in dem Zeitpunkt geschehen, wo der Antikörpergehalt des Serums sein Maximum erreicht hat. Lehrreiche Daten über den Anstieg des bakteriolytischen Titers bei Kaninchen, die mit Cholerabazillen vorbehandelt sind, geben PFEIFFER und MARX (Zeitschr. für Hyg. 1898, Bd. XXVII). Danach ist der mit Hilfe des PFEIFFERschen Versuchs bestimmte Serumtiter

24 Stunden nach der Injektion	. . .	ungefähr normal
2 mal 24 do. do.	. . .	ca. 300 mg
3 mal 24 do. do.	. . .	20—30 mg
4 mal 24 do. do.	. . .	1—5 mg
5 mal 24 do. do.	. . .	$^1/_4$—3 mg
8 mal 24 do. do.	. . .	$^1/_{12}$—$^1/_{20}$ mg
52 mal 24 do. do.	. . .	2—3 mg.

Der Anstieg der bakteriolytischen Ambozeptoren beginnt also ungefähr am 3. Tage, setzt sich fort bis etwa zum 8. Tage, um dann wieder allmählich abzufallen. Es bestehen hier ganz ähnliche Verhältnisse wie bei der Bildung der übrigen Antikörper. Auch die bei dem Studium des Tetanusantitoxins von EHRLICH und BRIEGER (l. c.) entdeckte und später für andere Antikörper bestätigte, der Injektion unmittelbar folgende sog. „negative Phase“ hat sich, wie erwähnt, im Verlauf der Bakteriolysinkurven feststellen (WRIGHT l. c.) lassen. Der Zeitpunkt des maximalen Antikörpergehalts soll übrigens bei subkutaner Injektion etwas später als bei intraperitonealer, bei dieser etwas später als bei intravenöser liegen. Es handelt sich aber nur um einen Unterschied von 2—3 Tagen.

Man entnimmt im allgemeinen das Blut zwischen dem 7. und 14. Tage nach der letzten Injektion.

Immunisierungsbeispiele.

In den vorangehenden Abschnitten sind eine Reihe von Immunisierungsmethoden zur Gewinnung bakteriolytischer Sera bereits beschrieben worden.

Es seien im folgenden noch einige Beispiele für die Gewinnung bakteriolytischer Sera etwas genauer wiedergegeben.

a) Choleraserum.

Bakteriolytische Cholerasera werden am zweckmäßigsten von Kaninchen gewonnen, da diese sich gut zur Immunisierung eignen und ihr Normalserum nur einen sehr geringen bakteriolytischen Titer hat (0,1 bis

*) Siehe DOERR dieses Handb.: Anaphylaxie.

0,3 g nach Kolle), während Pferde, Esel, Ziegen einen sehr hohen Normaltiter haben (0,005—0,05). — Kolle zieht die subkutane oder intraperitoneale Injektion der intravenösen vor.

Das für die amtliche Choleradiagnose bestimmte, im Institut für Infektionskrankheiten hergestellte bakteriolytische Choleraserum wird in folgender Weise hergestellt (Kolle, Klin. Jahrb. 1903): Eine größere Anzahl von Kaninchen erhalten je eine durch einstündiges Erhitzen auf 56° abgetötete Cholera-Agarkultur intraperitoneal. 14 Tage danach werden sie entblutet, die Sera werden gemischt, dann im Vakuum getrocknet und in Mengen von 0,1 oder 0,2 g trocken in Glasröhrchen eingeschmolzen; in dieser Form kommen sie zur Abgabe. Der Titer des flüssigen Serums beträgt ca. $^1/_2$ mg.

b) Typhusserum.

Zur Gewinnung von bakteriolytischem Typhusserum gingen Besserer und Jaffé (Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 51) in folgender Weise vor: Kaninchen wurden in zehntägigen Intervallen mit steigenden Dosen abgetöteter Typhusbazillen behandelt. Die beiden ersten Injektionen zu $^1/_2$ und 1 Agarkultur erfolgten subkutan, die nächsten zu $^1/_2$, 1 und 2 Kulturen intraperitoneal. Der Titer gegen den homologen Stamm betrug etwa 0,1—0,5 mg.

M. Neisser immunisierte Ziegen in folgender Weise (nach mündlicher Mitteilung): Intravenöse Injektion einer Agarkultur von eine Stunde auf 65—70° erhitzten Typhusbazillen. Nach etwa 10 Tagen, wenn die Ziege die erste Injektion gut vertragen hat, nochmalige Injektion (zwei tote Agarkulturen). — Kaninchen wurden nach folgendem Schema immunisiert: Intravenöse Injektion steigender Dosen durch Hitze abgetöteter Typhusbazillen in Intervallen von etwa 8—10 Tagen; die Wahl der Dosis ist abhängig von der Stärke der Reaktion. Beginn mit $^1/_{20}$—$^1/_{10}$ Agarkultur, dann $^1/_5$—$^1/_4$, schließlich $^1/_4$—$^1/_2$—1 Agarkultur abgetöteter Bazillen.

M. Neisser und Shiga (Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 4) erhielten ferner bei Kaninchen ein wirksames bakteriolytisches Typhusserum durch intravenöse Injektion von sog. „freien Rezeptoren". Eine eintägige Agarkultur wurde in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, eine Stunde auf 60° erhitzt, zwei Tage bei 37° gehalten und dann durch eine Reichelkerze filtriert. Kaninchen vertrugen die Injektion von 10 ccm des Filtrates ohne störende Reaktion. Durch zwei Injektionen gelang es Sera zu erhalten, die im Reagenzglasversuch in 1000facher Verdünnung (bei Komplementzusatz) noch sehr stark wirkten. Marx (Diagnostik, Serumther. u. Prophyl. der Infektionskrankh.) erwähnt, daß sich Hunde zur Gewinnung bakteriolytischen Typhusserums besonders gut eignen.

c) Paratyphusserum.

Für die Gewinnung eines im Pfeifferschen Versuch (nicht aber im Plattenversuch) stark wirksamen bakteriolytischen Serums empfehlen Kutscher und Meinicke (Zeitschr. für Hyg. Bd. LII) subkutane oder intraperitoneale Injektion bei Kaninchen in folgender Weise: a) mehrfache subkutane Injektion, zuerst von toten, dann von lebenden Bazillen in den üblichen Intervallen und in steigenden Dosen. Die Abtötung erfolgt durch zweistündiges Erhitzen auf 60°. Die Dosen waren $^1/_4$ Agarkultur tot — $^1/_2$ Agarkultur tot — $^1/_8$ Kultur lebend (mitunter noch

eine weitere Injektion von $^1/_4$ Kultur lebend). b) Mehrfache intraperitoneale Injektion nach ähnlichem Schema: $^1/_4$ Agarkultur tot — $^1/_2$ Kultur tot — 1 Kultur tot — $^1/_4$ Kultur lebend.

Der benutzte Paratyphusstamm war sehr virulent ($^1/_{10000}$ Öse für Meerschweinchen). Es gelang leicht, hochwirksame Sera zu erzielen, der Titer war wiederholt 1 : 1000.

Paratyphusserum beeinflußt im allgemeinen die Stämme der Hogcholeragruppe in annähernd gleicher Weise. Die gleiche Wirkung entfalten Sera, die durch Vorbehandlung mit einem anderen Stamme dieser Gruppe hergestellt sind.

Böhme erhielt ein hochwertiges bakteriolytisches Serum gegen die Bakterien der Hogcholeragruppe durch mehrmalige intravenöse Injektion von mit Formol abgetöteten Psitakosebazillen. Die Firma Gans in Frankfurt a. M. stellt ein Schweinepestserum her, das den Bakterien der Hogcholeragruppe gegenüber ziemlich stark bakteriolytisch wirkt.

Sera gegen die Stämme, die zur Gruppe des Bacillus enteritidis Gärtner gehören, lassen sich in ähnlicher Weise gewinnen.

d) Dysenterieserum.

Die Herstellung wirksamer bakteriolytischer Dysenteriesera stößt infolge der ausgesprochenen Giftigkeit der Shiga-Kruseschen Bazillen, sowohl der lebenden wie der toten, auf gewisse Schwierigkeiten (Kruse, Deutsche med. Wochenschr. 1903, pag. 6). Kleinere Versuchstiere, besonders Kaninchen, erliegen dieser Giftwirkung sehr leicht. Bei intravenöser Injektion werden Kaninchen nach Lüdke (Centralbl. für Bakt. Bd. XXXIX) bereits durch $^1/_{20}$ Öse lebender Shiga-Kruseescher Bazillen getötet, die letale Dosis von abgetöteten Bazillen beträgt ca. 1 Öse. Bei subkutaner und intraperitonealer Injektion sind Kaninchen weniger empfindlich. Nach Dörr (Centralbl. f. Bakt. XXXVIII, Heft 4 u. 5) liegt die Dosis let. min. lebender oder toter Shiga-Kruseescher Bazillen für subkutane Injektion bei $^1/_2$ Öse. Flexnerstämme werden in der Dosis von 1—2 Ösen noch gut vertragen. Nach einer einmaligen subkutanen oder intraperitonealen Injektion von $^1/_{50}$—$^1/_{20}$ Öse lebender Kultur erhielt Lüdke Sera, die in der Dosis von $^1/_{20}$—$^1/_{100}$ g gegen die einfach tödliche Dosis lebender Bazillen zu schützen vermochten.

Es sei hier nochmals hervorgehoben, daß die Schutzwirkung nicht dem bakteriolytischen Vermögen des Serums parallel zu gehen braucht. Die Schutzwirkung kann durch andere Faktoren sehr wesentlich mitbedingt werden; nach Kraus und Dörr (Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 30) ist das Antidysenterieserum tatsächlich in erster Linie ein antitoxisches (siehe Dörr, dies. Handb., Bd. II).

Hammel und Ziege vertragen nach Kruse (l. c.) die Injektion von Dysenteriebazillen gut, liefern aber nach Kruse kein wirksames Antiserum. Auch Martini und Lentz (Zeitschr. für Hyg. 1902, Bd. XLI, Heft 2) haben mit Ziegen keine guten Resultate erzielt. Kolle und Hetsch (Experimentelle Bakteriologie und Infektionskrankheiten, Berlin 1906) empfehlen dagegen die intravenöse Behandlung von Ziegen oder Hammeln mit abgetöteten Kulturen. Am besten eignen sich zur Serumgewinnung Esel und Pferde. Kruse erhielt hier Sera, die in der Dosis von $^1/_{80000}$ g noch ein Meerschweinchen gegen die sonst tödliche Dosis lebender Bazillen schützen, das Peritonealexsudat erwies sich dabei steril. Eine starke bakteriolytische Wirkung wies Kruse an diesem Serum durch den Versuch im hängenden Tropfen nach. Menschenserum + $^1/_{1000}$

Immunserum brachte Dysenteriebazillen in wenigen Stunden zur Aufquellung und teilweisen Auflösung.

Shiga (Zeitschr. für Hyg. u. Infektionskrkh. 1902, Bd. XLI, Heft 3) gewann sein Antiserum ebenfalls von Pferden. Die Einzelheiten der Immunisierung sind nicht angegeben. Die Prüfung des Serums auf Bakterizidie erfolgte im Plattenversuch. $^1/_{10000}$—$^1/_{100000}$ ccm war noch deutlich wirksam. Die Firma Gans in Frankfurt stellt nach Shigas Vorschrift ein Antidysenterieserum her.

Neuerdings vertritt Shiga (Zeitschr. f. Hyg., Bd. LX, Heft 1) die Ansicht, daß für die Ätiologie der epidemischen Dysenterie eine ganze Reihe von untereinander ähnlichen, aber doch deutlich zu scheidenden Bazillentypen in Betracht kommen. Er immunisiert dementsprechend zur Gewinnung von Antidysenterieserum mit verschiedenen Stämmen; 2 Pferde werden mit je 2 verschiedenen Bazillentypen alternierend vorbehandelt, die Sera dieser beiden Pferde werden gemischt. Das so gewonnene Serum ist auch gegenüber den andern nach Shiga ätiologisch in Betracht kommenden Stämmen wirksam. Shiga prüft dies Serum im Schutzversuch an Mäusen und im bakteriziden Plattenversuch.

Nach Lüdke (Centralbl. für Bakt., Bd. XL) gelingt es auch, bei Kaninchen durch einmalige subkutane Injektion von nach Neisser-Shiga oder Wassermann hergestellten Extrakten oder nach Löffler bei 110 bis 130° getrockneten Bakterien Sera zu gewinnen, deren Schutztiter etwa $^1/_{100}$ g beträgt.

e) Pyocyaneusserum.

Wassermann (Zeitschr. für Hygiene 1896, Bd. XXII, pag. 263, s. auch Wassermann, Immunität bei Bac. pyocyaneus, Handbuch der pathog. Mikroorganismen von Kolle-Wassermann, Bd. IV, pag. 1212) zeigte, daß es gelingt, durch Vorbehandlung von Ziegen mit lebenden Pyocyaneusbazillen ein bakterizides Pyocyaneusserum zu erhalten, das im Pfeifferschen Versuch die Bazillen zur Auflösung bringt. Nach P. Müller (Centralbl. für Bakt., Bd. XXVIII, pag. 1500) läßt sich die gesteigerte Bakterizidie des Pyocyaneusserums auch im Reagenzglasversuch zeigen, aber nur unter anaeroben Bedingungen. Wassermann (l. c.) injizierte Ziegen intravenös oder subkutan steigende Dosen lebender Pyocyaneusbazillen. Die Immunisierung muß wegen der Giftigkeit der Kulturen sehr vorsichtig geleitet werden, unter ständiger Kontrolle der Injektionsreaktion und des Gewichtes. Wassermann begann bei subkutaner Injektion mit einer Dosis von $^1/_{10}$ Normalöse lebender virulenter 24stündiger Kultur und stieg allmählich bis auf 16—20 Kollesche Massenkulturen. Das erhaltene Serum schützte in der Dosis von ca. 1 mg Meerschweinchen gegen $^1/_2$—1 Öse lebender virulenter Pyocyaneusbazillen.

III. Methoden zum Studium der Konstitution und Wirkungsweise der bakteriolytischen Sera.

Es sei hier auf den Aufsatz von Friedberger, Über bakterizide Sera (Kolle-Wassermann, Handbuch der path. Mikr., Bd. IV) und auf den Abschnitt von Sachs, Über hämolytische Sera und Komplemente in diesem Handbuch, Bd. II verwiesen.

Das Studium des Wirkungsmechanismus der bakteriolytischen Sera knüpft an die Entdeckung der Inaktivierung und Reaktivierung dieser Sera an.

Die bakteriolytische Fähigkeit ist außerordentlich labil, die mannigfaltigsten Einflüsse, Hitze, Aufbewahrung, Licht u. a. vermögen sie dem Serum zu nehmen, „inaktivieren" es. Ein inaktiviertes Immunserum ist außerhalb des Körpers, also bei der Prüfung im hängenden Tropfen oder im Plattenversuch, völlig wirkungslos. Dagegen zeigt es im Organismus, also bei Prüfung im PFEIFFERschen Versuch, nach der Inaktivierung den gleichen Wirkungsgrad wie vorher.

Inaktivierung.

Sera, und zwar sowohl Normal- wie Immunsera werden gewöhnlich durch $^1/_2$stündiges Erhitzen im Wasserbade auf 55—58° inaktiviert. Bezüglich der Technik des Inaktivierens sei auf den Artikel von SACHS über hämolytische Sera verwiesen. Schon kürzeres Erhitzen auf die genannte Temperatur setzt die bakteriolytische Kraft des Serums stark herab, 20 Minuten langes Erhitzen auf 54° macht nach STEINHARDT (Journ. of Med. Res. 1905, Bd. XIV, Heft 1) das Kälberserum unwirksam gegen Coli- und Dysenteriebazillen, während Typhusbazillen noch abgetötet werden. Mehrstündiges Erhitzen auf 50° raubt nach BUCHNER dem Serum ebenfalls die baktericiden Fähigkeiten.

Andererseits wird nach der Mehrzahl der Autoren die Baktericidie des Serums gegen Milzbrand durch $^1/_2$stündiges Erwärmen auf 55—58° noch nicht beträchtlich geschädigt, erst Temperaturen von 63° beseitigen auch das bakteriolytische Vermögen des Serums gegen Milzbrand. Wie später ausgeführt wird, ist es aber fraglich, ob es sich hier um eine echte Komplementwirkung handelt.

Der Aufenthalt des Serums außerhalb des Tierkörpers läßt für sich schon die bactericide Kraft allmählich sinken. 3 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrtes Serum ist häufig wirkungslos, im Eisschrank gehaltenes Serum hat auch noch nach 8 Tagen häufig einen Teil seiner Wirksamkeit, Einfrierenlassen des Serums konserviert es noch besser*). Licht zerstört die Baktericidie je nach seiner Intensität und Qualität in verschieden rascher Zeit. Durchleitung von Sauerstoff schädigt sie ebenfalls BUCHNER (Arch. für Hyg., Bd. X und XVII).

Zur Entfaltung der bakteriolytischen Fähigkeit ist die Anwesenheit von Salzen erforderlich (BUCHNER); durch Dialyse kann ein Serum völlig wirkungslos gemacht werden. Eine Inaktivierung sensu strictiori liegt nicht vor, da der Zusatz von Salzen allein die Bakterizidie wieder herstellt. Nach Untersuchungen auf hämolytischem Gebiet wird das Komplement bei der Dialyse in zwei Komponenten gespalten; vgl. SACHS, dies. Handb., Bd. II.

Reaktivierung.

Ein inaktiviertes Serum kann durch Zusatz frischen Serums wieder reaktiviert werden, d. h. wieder den vollen Grad seiner früheren bactericiden Kraft erhalten. Die Möglichkeit der Reaktivierung bakteriolytischer Sera wurde von METSCHNIKOFF (Ann. de l'Inst. Pasteur, T. IX, pag. 433) und BORDET (Ebenda, pag. 462) an Choleraimmunserum in vitro nachgewiesen.

Während inaktiviertes Choleraserum Cholerabazillen im hängenden Tropfen nicht aufzulösen vermag, bringt es nach Zusatz der gleichen

*) Als zweckmäßige Methode zur Konservierung des (hämolytischen) Komplements hat FRIEDBERGER den Zusatz hypertonischer Kochsalzlösung angegeben (Centralbl. für Bakt., Bd. XLVI, Heft 5).

Menge Peritonealflüssigkeit eines normalen Meerschweinchens die Vibrionen rasch zum körnigen Zerfall, es wird durch das Peritonealexsudat „reaktiviert“. Das Peritonealexsudat allein ruft nur geringe Lösungserscheinungen hervor. Frisches defibriniertes Meerschweinchenblut oder frisches Serum wirkt in gleicher Weise. Die Reaktivierung läßt sich ebenso auch im Plattenversuch nachweisen; die übliche Technik des Plattenversuchs macht stets von dieser Erscheinung Gebrauch. Durch die Inaktivierungs- und Reaktivierungsversuche wird bewiesen, daß an der bakteriolytischen Wirkung eines Immunserums zwei Substanzen beteiligt sind, eine thermostabile, im inaktiven Immunserum enthaltene, der „Immunkörper (Ambozeptor)“, und eine thermolabile, im frischen Immun- oder frischen Normalserum enthaltene, das „Komplement (Addiment, Cytase)“. Daß das inaktivierte Immunserum im Pfeifferschen Versuch ebenso wirkt, wie das aktive, beruht darauf, daß das Peritoneum nach der Injektion der Bakterien und des Immunserums sofort genügend Komplement absondert.

Komplexe Konstitution der normalen Sera.

Auch die bakteriolytischen Substanzen des normalen Serums sind im allgemeinen komplex zusammengesetzt, bestehen aus Ambozeptor und Komplement, wenngleich es auch wahrscheinlich bakteriolytische Serumstoffe einheitlicher Natur gibt. (Siehe Kraus und Clairmont, Zeitschr. für Hyg., Friedberger, Centralbl. für Bakt. 1908.)

Durch Erhitzen auf 56° werden die normalen Sera inaktiviert, sie wirken im Plattenversuch oder im hängenden Tropfen nicht mehr bakteriolytisch. Daß trotzdem thermostabile bakteriolytische Antikörper in ihnen vorhanden sind, läßt sich durch den Pfeifferschen Versuch erweisen. Das inaktivierte Normalserum wird mit einer Öse Cholera- oder Typhusbazillen in 1 ccm Bouillon einem Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. Die mikroskopische Beobachtung der Bakteriolyse und das Überleben des Versuchstieres entscheiden den Versuch, der eine quantitative Bestimmung des Immunkörpergehaltes ermöglicht. Unter Umständen sind normale Sera recht reich an bakteriolytischen Antikörpern, so kann Pferdeserum noch in einer Menge von 0,005 g eine Öse Choleravibrionen in der Meerschweinchenbauchhöhle auflösen. Die thermostabilen Antikörper des Normalserums wirken spezifisch, wie Pfeiffer und Friedberger (Deutsche med. Wochenschr. 1901, pag. 834) durch den Absorptionsversuch nachwiesen.

Das mit einer größeren Menge Cholerakultur vorbehandelte Serum hat seine Wirksamkeit gegen Choleravibrionen (ganz oder teilweise) im Pfeifferschen Versuch eingebüßt, die gegen Typhusbazillen behalten.

Die normalen bakteriolytischen Antikörper bedürfen wie die immunisatorisch erzeugten der Mitwirkung des Komplements. Versuche in vitro — im hängenden Tropfen oder im Plattenversuch — demonstrieren diese Verhältnisse. Der Versuch wäre am einfachsten, wenn es gelänge, als Komplement ein aktives Serum zu benutzen, das keine Ambozeptoren gegen die verwandte Bakterienart enthielt, also für sich allein nicht lytisch wirkte. Dieser Fall wird nur selten verwirklicht sein. Man benutzt deshalb eine so geringe Menge Komplementserum bzw. eine solche Serumverdünnung, daß durch das Komplementserum allein eine nennenswerte Bakteriolyse nicht zustande kommt. Der Forderung, daß das Komplement zu dem Ambozeptor passe, wird man im allgemeinen entsprechen, wenn man als Komplement das Serum der gleichen Tierart

wählt. Es können allerdings manchen Seris die Komplemente für die in ihnen enthaltenen Ambozeptoren völlig fehlen (Bail und Petterson, Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität I—X. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIII—XXXVI. — Pettersson, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIX, pag. 423); diese Sera sind dann auch im aktiven Zustande völlig unwirksam, erhalten aber durch Zusatz bestimmter fremder aktiver Sera bakteriolytische Wirksamkeit. Mitunter ist nach Bail und Pettersson auch ein passendes Komplement in den Leukocyten der gleichen (oder auch einer anderen) Tierart zu finden. Das Serum des Menschen, des Hundes, des Ochsen enthält Ambozeptoren für Milzbrand, aber kein Komplement. Kaninchenserum und meist auch Extrakt von Kaninchenleukocyten vermag diese Sera zu komplettieren.

Bordet (Annal. Past., Bd. XIII, pag. 273) schwemmte Choleravibrionen in einer Mischung von aktivem Pferdeserum und aktivem Menschenserum auf und zeigte, daß die Vibrionen sich hier lösten, während jedes Serum für sich nur eine geringe Wirkung entfaltet.

Moxter (Centralbl. f. Bakteriol., Bd. XXVI, pag. 344) reaktivierte inaktiviertes Serum mit verdünntem aktivem Peritonealexsudat. Am Tage vor dem Versuch wurden dem Versuchstiere 2—5 ccm Bouillon in die Bauchhöhle injiziert, das sich ansammelnde Exsudat wurde 24 Stunden später nach Verdünnung mit 1 ccm Kochsalzlösung aufgesaugt. Zur Herstellung der Vibrionenaufschwemmung wurden 2 mg (= 1 Öse) einer 24stündigen Agarkultur in 1 ccm Bouillon verrieben. 1 Öse der Aufschwemmung und 1 Öse der zu untersuchenden Flüssigkeit wurden gemischt und im hängenden Tropfen beobachtet. Um eine quantitative Schätzung zu ermöglichen, wurde am Rande des Tropfens das Verhältnis der Zahl der Granula zu der der intakten Bakterien festgestellt. Das Peritonealexsudat, so wie es gewonnen war, wirkte meist recht stark bakteriolytisch, mit der 7—8fachen Menge Kochsalzlösung verdünnt, fast gar nicht mehr. Wurde aber die Kochsalzlösung durch inaktives Serum ersetzt, so war die Bakteriolyse wieder stark.

Versuchstier	Aktives Serum	Bauchhöhlen-Exsud., mit 0,6 %iger NaCl-Lösg. ausgespült	Dasselbe, mit 0,6 %iger NaCl-Lösung 7—8-fach verdünnt	Dasselbe, mit inaktiv. Serum 7—8 fach verdünnt	Inaktives Serum
Meerschweinchen	1 Std. 44 Min. mehr Granula als Vibrionen	1 Std. dgl.	1 Std. 30—40 Granula	45 Min. Granula weit überwiegend	1 Std. Keine Granula
Ratte	30 Min. fast nur noch Granula	1 Std. Vereinzelte Granula	2 Std. 17 Min. Keine Granula	1 Std. Mehr Granula als Vibrionen	1 Std. Keine Granula

Folgender, einer Arbeit von Wechsberg (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXIX, pag. 184) entnommener Versuch zeigt mit Hilfe des bakteriziden Plattenverfahrens die Anwesenheit von Typhus-Ambozeptoren im normalen Kaninchenserum.

Tabelle I gibt den Wirkungswert des im Hauptversuch als Komplement benutzten aktiven Meerschweinchenserums für sich allein an.

Aus Tabelle II ist die Steigerung zu ersehen, die die Bakterizidie durch den Zusatz des an sich unwirksamen (Kontrolle IV) inaktiven normalen Kaninchenserums erfährt.

Tabelle I.

Kulturmenge	Aktives normales Meerschweinchenserum	Zahl der Keime auf der Platte	Bemerkungen
$^1/_{10000}$ einer eintägigen Agarkultur	1,0	mehrere Hunderte	
	0,5	viele Tausende	
	0,25	∞	
	0,1	∞	
	—	∞	Kontrolle I

Tabelle II.

Kulturmenge	Aktives normales Meerschweinchen-serum	Inaktives normales Kaninchen-serum	Zahl der Keime auf der Platte	Bemerkungen
$^1/_{10000}$ einer eintägigen Agarkultur	1,0	1,0	0	
	0,5	1,0	0	
	0,25	1,0	viele Tausende	
	0,1	1,0	∞	
—	1,0	—	0	Kontrolle II
—	—	1,0	0	„ III
$^1/_{10000}$ Agarkult.	—	1,0	∞	„ IV

Zur quantitativen Beurteilung des Ambozeptorengehalts normaler Sera mittels des Plattenversuchs können fallende Verdünnungen des ambozeptorhaltigen Serums geprüft werden, doch ist dies Verfahren nur innerhalb enger Grenzen anwendbar, da der Ambozeptorengehalt meist zu gering ist, um stärkere Verdünnungen zu gestatten. Eine gewisse quantitative Schätzung ermöglicht auch die Schnelligkeit und die Vollständigkeit der Abtötung.

Es ist daran zu denken, daß auch bei Verwendung von Normalseris gelegentlich das Phänomen der Komplementablenkung beobachtet wird, daß also bei Anwendung unverdünnten inaktiven Serums dessen Ambozeptorgehalt übersehen werden kann.

Malvoz (Ann. Past. 16) benutzte die Bordet-Gengousche Absorptionsmethode (s. später) zum Nachweis von Ambozeptoren im Serum des normalen Hundes gegen Milzbrand. Als Komplement wurde Kaninchen-, Meerschweinchen- und Rattenserum angewandt.

Pirenne (Centralbl. für Bakteriologie, Bd. XXXVI, Nr. 2, 3 u. 5) zeigte mit Hilfe der gleichen Methode, daß Rattenserum (trotz seiner starken bakteriziden Wirkung) keinen Ambozeptor für Milzbrand hat. Dagegen enthält es Choleraambozeptoren.

Es seien noch einige im bakteriziden Plattenversuch erprobte Kombinationen normaler Sera zusammengestellt.

(Siehe Tabelle pag. 423.)

Absorption der Ambozeptoren.

Durch die Inaktivierungs- und Reaktivierungsversuche wird die komplexe Zusammensetzung der Bakteriolysine erwiesen. Über das nähere Verhalten der Ambozeptoren und Komplemente bei der Bakteriolyse geben die Absorptionsversuche Aufklärung.

Amboceptorhaltiges inaktives Serum von	Komplementhaltiges aktives Serum von	Bakterienart	Zitiert nach
Ziegen	Pferden	Dysenteriebaz.	Shiga, Z. f. Hyg., Bd. XLI, H. 3
Kaninchen	Meerschweinchen	Typhusbaz.	Wechsberg, Z. f. Hyg., Bd. XXXIX
Kaninchen	Kaninchen	Typhusbaz.	Vedder, Journ. of Med. Res. 1903, Bd. V
Hunden	Kaninchen	Proteus	Pettersson, C. f. B., Bd. XXXIX
Katzen	Kaninchen	„	„ „ „ „ „ XXXIX
Hunden	Kaninchen	Milzbrand	Bail, C. f. B., Bd. XXXIII
Hunden	Ratten	„	Pettersson, C. f. B., Bd. XXXIII
	Hühnereiweiß	„	„ „ „ „ „ XXXIII
Mensch, Rind, Schwein, Ziege	Kaninchen, meist auch Ratten und Pferden	Milzbrand	Bail und Pettersson, Centralbl. f. Bakt., Bd. XXXIII

Nach den ersten Versuchen von Pfeifffr, Hahn und Trommsdorff haben besonders Pfeiffer und Friedberger sowie Wassermann dies für die Theorie der Immunkörper so bedeutungsvolle Gebiet ausgebaut.

Bei der Mischung von Bakterien mit dem zugehörigen inaktivierten Immunserum entziehen jene dem Serum die Immunkörper. Das Serum verarmt an Immunkörpern, die Bakterien haben dagegen die Eigenschaften angenommen, die sonst die dauernde Anwesenheit des Immunserums ihnen gibt; sie werden in der Peritonealhöhle des Meerschweinchens leicht aufgelöst bzw. zerfallen auch im hängenden Tropfen bei Zusatz von frischem Normalserum. Ihre Abtötung durch dieses ist ebenso im Plattenversuch nachweisbar.

Um das Schwinden der Immunkörper aus dem Serum nachzuweisen, wird die absorbierende Bakterienmenge zweckmäßig ziemlich groß, die Serummenge dagegen klein gewählt. Der Gehalt an Immunkörper muß vor und nach der Absorption bestimmt werden, ein absolut kleiner Verlust wird leichter aufgedeckt werden, wenn die Gesamtmenge der Immunkörper klein ist, eine Verminderung von 10 auf 5 I.-E. wird sich leichter erweisen lassen, als eine solche von 100 auf 95 I.-E. Es empfiehlt sich deshalb, zum Absorptionsversuch das Serum in verdünntem Zustande zu benutzen. Andererseits ist es vorteilhaft, die Serummenge doch so groß zu wählen, daß nach der Absorption noch Ambozeptoren in deutlicher Menge nachweisbar sind. Unterschiede im Absorptionsvermögen verschiedener Stämme sind dann leichter aufzudecken, als wenn das Serum völlig erschöpft ist.

Für Cholera-Bindungsversuche empfehlen Pfeiffer und Friedberger (Berliner klin. Wochenschr. 1902, pag. 581) pro 1 ccm Serumverdünnung 1 Öse Agarkultur zuzusetzen. Das Serum wird je nach seinem Titer in einer Verdünnung von 1:20 bis 1:500 verwandt.

Sehr eingehende Untersuchungen über die Faktoren, die auf die Ambozeptorbindung von Einfluß sind, haben Meinicke, Jaffé und Flemming (Zeitschr. für Hygiene, Bd. LII) angestellt.

Die Absorption wird vollständiger, wenn das Serumbakteriengemisch häufig geschüttelt wird und auf die Weise die agglutinierten Bakterienhaufen wieder zerteilt werden. Die im Innern größerer Haufen liegenden Bakterien können weniger gut absorbierend wirken, als wenn sie

gleichmäßig verteilt sind. Nach MEINICKE, JAFFÉ und FLEMMING ist die Absorption am ausgiebigsten, wenn das Gemisch im Brutschrank durch einen Schüttelapparat in dauernder Bewegung gehalten wird.

Die Bindung geht sowohl bei Eisschranktemperatur wie bei höheren Temperaturen vor sich. Große Differenzen in bezug auf die Schnelligkeit und Stärke der Bindung bestehen nicht, nach MEINICKE, JAFFÉ und FLEMMING verläuft immerhin der Prozeß bei 43° vollständiger als bei Eisschranktemperatur.

Die Bindung geht recht schnell vonstatten, nach 15 Minuten ist der Prozeß bereits sehr weit vorgeschritten, nach etwa 1 Stunde vollständig abgelaufen, eine längere Bindungsdauer ergibt keine stärkere Absorption. Sowohl lebende wie tote Bakterien absorbieren die Ambozeptoren. Bei Anwendung toter Bakterien bleibt die Bakterienmenge während des Versuchs constant, während lebende Bakterien — wenigstens bei höherer Temperatur — sich vermehren und dadurch das Resultat beeinflussen können. MEINICKE, JAFFÉ und FLEMMING geben lebenden Bakterien den Vorzug, da sie fürchten, daß bei dem Abtötungsprozeß freie Rezeptoren in größerer Menge auftreten können, die die Bindung in unkontrollierbarer Weise beeinflussen.

Zu vergleichenden Untersuchungen ist stets die Innehaltung gleicher Serumkonzentrationen und gleicher absoluter Serummengen nötig, denn die absorbierte Menge verändert sich entsprechend diesen beiden Faktoren.

Nach erfolgter Bindung werden die Bakterien durch scharfes Centrifugieren entfernt, die abgegossene oder abpipettierte klare Flüssigkeit auf ihren Ambozeptorengehalt geprüft. Zur völligen Entfernung der Bakterien sind Centrifugen mit recht hoher Tourenzahl erforderlich. PETTERSSON (Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIII) macht darauf aufmerksam, daß sich leicht an der Seitenwand des Glases Bakterien absetzen, die beim Abziehen der Flüssigkeit wieder mitgerissen werden. Er centrifugiert deshalb mehrmals, nachdem er jedesmal die Flüssigkeit in ein frisches Centrifugenglas gegossen hat.

Aus der zitierten Arbeit von MEINICKE, JAFFÉ und FLEMMING sei als Beispiel ein Absorptionsversuch angeführt, in dem der Einfluß der Bindungsdauer geprüft wird.

Zu je 1 ccm einer Verdünnung 1:50 des bakteriziden Choleraserums 80 wird 1 Öse Cholerakultur des Stammes Baku IV. hinzugesetzt, 3 Proben dieses Gemisches werden bei 37° je ½ Stunde, 1 und 2½ Stunden geschüttelt. Das Centrifugenklar gegen Kultur Baku IV im bakteriziden Tierversuch ausgewertet.

Dauer der Bindung	Verdünungen des Centrifugenklars					
	1:200	1:500	1:1000	1:2000	1:5000	1:10 000
½ Stunde	lebt	lebt	+	+		
1 „	„	+	+	+		
2 Stunden	„	+	+	+		
Kontrolle mit nicht abgesättigtem Serum			lebt	lebt	+	+

Durch ½ stündige Absorption wird also der Titer des Serums von 1:2000 auf 1:500, durch 1—2 stündige Absorption auf 1:200 herabgesetzt.

Von wesentlicher Bedeutung für den Ausfall des Absorptionsversuches sind die Bakterienstämme, die für den Versuch benutzt werden. Es sind zu unterscheiden:

1. Der Stamm, der zur Immunisierung des Serum liefernden Tieres diente,
2. der Stamm, der zur Absorption des Serums benutzt wird,
3. der Stamm, mit dem der Ambozeptorengehalt des Serums vor und nach der Absorption geprüft wird.

Je nach dem zur Immunisierung dienenden Stamme kann, wie bereits früher erwähnt, das Serum auf verschiedene Stämme eine verschieden starke Wirkung entfalten, unter Umständen gegenüber gewissen Stämmen wirkungslos sein.

Nehmen wir an, wir haben es mit einem gegebenen Serum zu tun, dessen Wirkung auf die in Betracht kommenden Stämme bekannt ist. Behandeln wir dieses Serum mit einem Stamm A, so wird dadurch der Gehalt des Serums an Amboceptoren gegenüber A herabgesetzt, er ist meist auch gegenüber anderen Stämmen herabgesetzt, wenn auch häufig weniger als gegenüber dem zur Absorption benutzten Stamme A.

Einige Beispiele zeigen dies verschiedenartige Verhalten (aus der Arbeit von Meinicke, Jaffé und Flemming).

1. Bakterizides Kaninchenserum, gewonnen durch Injektion eines Cholerastammes Nr. 74. Der Titer gegenüber diesem Stamme beträgt 1:10000. Das Serum wird in der Verdünnung 1:20 mit verschiedenen Kulturen abgesättigt, gegen verschiedene Kulturen im Pfeifferschen Versuche geprüft. Das Zeichen 0 bedeutet Bakteriolyse und Ueberleben des Versuchstieres, + fehlende oder ungenügende Bakteriolyse und den Tod des Tieres.

A. Absättigung mit Stamm G VI.

Ausgewertet gegen	Verdünnungen				Kontrolle mit nicht abgesättigtem Serum
	1:200	1:500	1:1000	1:2000	1:5000
S III	0	+	+	+	0
74	0	+	+	+	0
G VI	+	+	+	+	0
B I	0	+	+	+	0

Der Titer ist für den zur Absättigung benutzten Stamm am stärksten herabgesetzt; aber auch gegen die 3 anderen Stämme wirkt das absorbierte Serum nur noch schwach.

B. Absättigung mit Stamm G IV.

Ausgewertet gegen	Verdünnungen				Kontrolle mit nicht abgesättigtem Serum
	1:200	1:500	1:1000	1:2000	1:5000
S III	0	0	0	0	0
74	0	0	0	0	0
G IV	0	+	+	+	0
B I	0	+	+	+	0

Hier ist durch die Absättigung die Serumwirksamkeit gegen die Stämme G IV und B I stark herabgesetzt, während eine Verminderung gegenüber den beiden anderen Stämmen aus der Tabelle nicht erkennbar ist.

Bei Prüfung eines absorbierten Choleraserums mit einer großen Anzahl von Stämmen findet man meist gewisse Gruppen, denen gegenüber der Titer des absorbierten Serums annähernd gleich (hoch oder gering) ist. Auch wenn das Serum mit einem anderen Stamm absorbiert worden ist, machen sich die gleichen Gruppen geltend. Man erhält so eine Methode, innerhalb derselben Bakterienart, Gruppen von einem bestimmten einheitlichen Rezeptorenapparat zu sondern.

Aus Friedberger und Moreschis (l. c.) Versuchen geht hervor, daß nach Absorption eines Serums mit einem Stamme der Titer für einen andern Stamm völlig unverändert bleiben kann.

Kaninchenimmunserum, gewonnen durch zweimalige Injection des Typhusstammes Gießen.

Ursprünglicher bakteriolytischer Titer für		Titer nach der Ausfällung mit Typhus Sprung für	
Typhus Giessen	Typhus Sprung	Typhus Giessen	Typhus Sprung
0.00005	0,02	0,00005	> 0,1

Bezüglich der Deutung dieses verschiedenen Verhaltens sei auf die zitierten Arbeiten von Pfeiffer und Friedberger, sowie Meinicke, Jaffé und Flemming verwiesen.

Es kann also ein Stamm ein sehr gutes Bindungsvermögen für die homologen Ambozeptoren haben, während er die auf manche anderen Stämme wirkenden Ambozeptoren fast oder ganz unbeeinflußt läßt. Das Urteil über das Bindungsvermögen eines Stammes ist danach zum Teil von der Wahl des Stammes abhängig, mit dem das Serum nach der Absorption geprüft wird.

Die Stärke der Absorption läßt sich auch mit Hilfe des Begriffs der „Immunitätseinheit" ausdrücken (s. pag. 370). Der Gehalt an Immunitätseinheiten ist gleich dem reziproken Wert des Titers. Man bestimmt den Gehalt des Serums an Immunitätseinheiten vor und nach der Absorption und berechnet durch Subtraktion die absorbierte Menge.

Einer Arbeit von Pettersson (Centralblatt für Bakteriol. 1905, Bd. XXXVIII, pag. 73) ist folgender Versuch entnommen: Typhusimmunserum vom Titer 0,0075 (1 Kubikzentimeterenthält also 133 I.-E.). 1 ccm Serum wird mit 1 ccm Kochsalzlösung gemischt, die 1 Oese abgetöteter Typhuskultur enthält. 1 ccm dieser Mischung enthält also $^{133}/_{2} = 66{,}5$ I.-E. Auf 1 ccm der Mischung wirkt $^{1}/_{2}$ Öse Kultur ein. Absorptionsdauer $1^{1}/_{4}$ Stunde bei 37°. Darnach wird klar zentrifugiert. Der Abguß wird im Pfeifferschen Versuch geprüft: Es werden Verdünnungen des Abgusses hergestellt, die in 1 ccm 0,03 bezw. 0,04 ccm Abguß enthalten. 1 ccm dieser Verdünnung wird zusammen mit einer Öse Typhusbazillen einem Meerschweinchen von 280 g intraperitoneal injiziert.

0,03 ccm	0,04 ccm
Tier stirbt	Tier bleibt am Leben

Der Titer des Abgusses liegt also zwischen 0,03 und 0,04 ccm, 1 ccm des Abgusses enthält zwischen 25—33 I.-E.

Vor der Absorption enthielt 1 ccm der Mischung 66,5 I.-E. Durch $^1/_2$ Öse sind also absorbiert worden: 66 minus 25—33 I.-E. = 41—33 I.-E. 1 Öse hat zwischen 82 und 66 I.-E. absorbiert.

Wie einerseits das Schwinden der Ambozeptoren aus dem Serum, läßt sich andererseits auch nachweisen, daß die absorbierenden Bakterien durch die Ambozeptoren charakteristische Veränderungen erfahren haben, daß sie „sensibilisiert sind", „die Amboceptoren gebunden haben". Sie werden in der Bauchhöhle eines normalen Meerschweinchens ohne Zusatz von Immunserum aufgelöst; im hängenden Tropfen bewirkt Zusatz von — an sich nur wenig wirksamem — aktivem normalem Serum die Auflösung, und im Plattenversuch läßt sich ebenso die Abtötung bei Zusatz von aktivem Normalserum nachweisen.

Die auf ihre Sensibilisierung zu prüfenden Bakterien müssen vorher sorgfältig von Serumresten befreit werden. Da zu diesen Versuchen meist hochwertige Sera benutzt werden, so könnten selbst kleine anhaftende Serummengen auf das Resultat von Einfluß sein. Die Bakterien werden abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit mit steriler Pipette abgehebert. Der Bodensatz wird dann in dem gleichen Zentrifugenglas in steriler physiologischer Kochsalzlösung mit der Platinöse aufgeschwemmt. Die Menge dieser Waschflüssigkeit soll nicht zu klein sein, meist nimmt man mindestens so viel, wie der Abguß betrug. Diese Bakterienkochsalzaufschwemmung wird ebenso behandelt, wie die erste Aufschwemmung der Bakterien im Serum. Das Waschen wird mehrmals, etwa 4—5 mal oder noch häufiger wiederholt. Wichtig ist, daß jedesmal das Waschwasser möglichst vollständig abgehebert wird. Dies gelingt nur, wenn die Bakterien durch sehr scharfes Zentrifugieren sich in möglichst dichter Form abgesetzt haben. Es bedarf also immer sehr schnellgehender Zentrifugen. Diese sind auch erforderlich, um Bakterienverlust tunlichst zu vermeiden. Bei nicht genügendem Zentrifugieren enthält die überstehende Flüssigkeit Bakterien, und der nach mehrmaligem Waschen übrig bleibende Bodensatz ist dann erheblich geringer als die Ausgangsmenge.

Die mehrfach gewaschenen sensibilisierten Bakterien werden schließlich in einer abgemessenen Menge steriler Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Zur Austellung des PFEIFFERschen Versuchs wird die einer Öse entsprechende Menge der Aufschwemmung intraperitoneal injiziert, ohne Zusatz von Immunserum. Wenn also 100 ccm Serumverdünnung mit 10 Ösen Kultur versetzt worden sind, so wird die zentrifugierte gewaschene Bakterienmasse in 10 ccm NaCl.-Lösung aufgenommen und von dieser Suspension 1 ccm = 1 Öse injiziert. Der lebhafte körnige Zerfall und das Überleben des Tieres beweisen die Absorption; ein Kontrolltier, das eine geringere Quantität der nicht mit Serum behandelten lebenden Kultur erhalten hat, zeigt kein PEIFFERsches Phänomen und stirbt.

Der Nachweis der Bindung im hängenden Tropfen wird in entsprechender Weise ausgeführt. Ein Tropfen der Aufschwemmung der sensibilisierten Bakterien in Kochsalz wird mit einem Tropfen frischen normalen Serums gemischt. Die Beobachtung des hängenden Tropfens zeigt rasche Bakterienauflösung, während eine Aufschwemmung nicht sensibilisierter Bakterien in Kochsalzlösung, nach Zusatz von aktivem normalem Serum nur geringe Veränderungen aufweist.

Im bakteriziden Plattenversuch läßt sich die Sensibilisierung ebenso zeigen, wie im PFEIFFERschen oder METCHNIKOFF-BORDETschen Versuch.

Die sensibilisierten und gewaschenen Bakterien werden mit einer an sich nicht abtötenden Komplementmenge versetzt und 3 Stunden im Brutschrank belassen. Die dann ausgegossenen Platten erweisen, daß die Bakterien völlig abgetötet oder doch stark vermindert sind.

Die Bindungsfähigkeit der Bakterien ist außerordentlich groß; die Erage, ob alle bindenden Gruppen (Rezeptoren) für eine bestimmte Ambozeptorenart besetzt sind, haben Pfeiffer und Friedberger (Berliner klin. Wochenschr. 1902, pag. 581) auf folgende Weise zu beantworten gesucht.

Nach Ehrlich veranlassen diejenigen Bakteriengruppen, die die Ambozeptoren binden, auch die Bildung und Abstoßung der Ambozeptoren im Tierkörper*). Darnach können Bakterien, deren sämtliche Rezeptoren besetzt sind, nicht mehr immunisierend wirken. Eine weitere Voraussetzung dieses Schlusses ist allerdings, daß die Verbindung Bakterium-Ambozeptor im Tierkörper nicht gesprengt wird.

Von diesen Erwägungen ausgehend, ließen Pfeiffer und Friedberger Choleravibrionen durch größere Mengen Choleraserum in der Meerschweinchenbauchhöhle zur Auflösung bringen. Der die gelösten Bakterien enthaltende Peritonealinhalt wurde mit feinen Pipetten aufgesaugt und Kaninchen intravenös injiziert. Nach 8—10 Tagen wird der bakteriolytische Titer des Kaninchenserums bestimmt.

Als in der Peritonealhöhle des Meerschweinchens 1 Öse Choleravibrionen mit 0,01 g Immunserum aufgelöst wurden, ließ sich durch die Peritonealflüssigkeit ein Serum vom Titer $^2/_{10}$—$^5/_{10}$ mg erzeugen, d. h. das Serum hatte fast maximale Wirksamkeit. Erst als 2 Ösen Choleravibrionen mit 1 ccm Immunserum vorbehandelt wurden, wurde ihre Fähigkeit, Antikörperbildung auszulösen, wesentlich herabgesetzt; der Titer des auf diese Weise erzeugten Serums betrug nur 50 mg.

In anderen Versuchen wurden tote Vibrionen in vitro 2 Stunden lang bei 42°, dann weitere 6 Stunden bei Zimmertemperatur mit inaktivem Immunserum in Kontakt gelassen. Sehr kleine Mengen der abgesättigten Vibrionen ($^1/_{500}$ Öse)**) wurden Kaninchen intravenös injiziert. Der Titer des auf diese Weise erzeugten Serums erwies sich auch hier als abhängig von der Serumdosis. Es bedurfte der 100 000 bis 1 000 000 fachen Menge der einfach lösenden Serumdosis zur völligen Absättigung.

Um eine möglichst vollständige Absättigung zu erzielen, behandelte Fichera (Centralbl. für Bakt., Bd. XLI, Heft 5—7) Vibrionen mehrmals mit Immunserum. Nach jeder Absättigung wurden die Vibrionen abzentrifugiert und dann wieder mit frischem Serum versetzt, zum Schluß wurden die Vibrionen gründlich mit Kochsalzlösung gewaschen. Das mit 3 fach abgesättigten Vibrionen erzeugte Serum hatte einen geringeren Titer, als das mit nur 1 mal oder gar das mit nicht behandelten Vibrionen erzeugte. Eine völlige Aufhebung des antigenen Vermögens gelang nicht.

Überspringen der verankerten Ambozeptoren.

Die Verbindung Bakterium — Immunkörper — Komplement ist nicht unter allen Umständen untrennbar. Aus Untersuchungen über

*) Friedberger u. Moreschi (Berl. klin. Wochenschr. 1905, Nr. 45) haben sich später nach Untersuchungen an Typhusbazillen gegen die unbedingte Richtigkeit dieser Annahme ausgesprochen.

**) Vgl. die Ausführungen über Immunisierung mit kleinen Dosen.

Hämolysine ist bekannt, daß mit Immunkörpern beladene Erythrocyten bei geeigneter Versuchsanordnung einen Teil ihrer Immunkörper an andere unbesetzte Erythrocyten abgeben können. Für Bakterien ist eine solche nachträgliche Abgabe verankerter Ambozeptoren nach diesem Schema zwar nicht bekannt, wohl aber können bereits gebundene Ambozeptoren wieder frei werden, wenn es unter Mitwirkung des Komplements zur Auflösung der Bakterien kommt. PFEIFFER und FRIEDBERGER (Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIV, pag. 70) haben derartige Versuche angestellt. Eine bestimmte Quantität eines Immunserums, das auf seinen Gehalt an Antikörpern im PFEIFFERschen Versuch genau ausgewertet ist, wird mit lebenden Choleravibrionen versetzt, und zwar wird entweder die Serumquantität in einer Bouillonverdünnung mit Cholera infiziert und längere Zeit (2 Tage) im Brutschrank gehalten, oder es wird der Serumverdünnung von vornherein eine größere Vibrionenmenge zugesetzt, etwa 1 Öse pro 1 ccm, und dann die Bindungsdauer kürzer ($^1/_2$ Stunde) bemessen, so daß keine allzu große Vermehrung eintritt.

Aus den Absorptionsversuchen wissen wir, daß bei dieser Versuchsanordnung zunächst ein großer Teil der Ambozeptoren verankert wird. Wenn wir dieses Bakterienserumgemisch nun auf neu zugesetzte virulente Choleravibrionen im PFEIFFERschen Versuch einwirken lassen, so wäre anzunehmen, daß die Wirkung viel geringer wäre, als die des nicht vorbehandelten Serums. Tatsächlich liegen die Verhältnisse anders. Die Menge Bakterienserumgemisch, die eben noch zur vollständigen Auflösung einer gleichzeitig injizierten Öse virulenter Cholera im PFEIFFERschen Versuch ausreicht, ist kaum größer als die des nicht vorbehandelten Serums. Der Gehalt der Bakterienserummischung an verfügbaren Antikörpern ist also völlig oder nahezu der gleiche geblieben. In einem Falle wurde z. B. zu einer 1000fachen Verdünnung eines Ziegencholeraserums vom Titer $^1/_{25}$ mg so viel lebende virulente Choleraagarkultur gesetzt, daß auf je 1 ccm 1 Öse Kultur kam. Nach $^1/_2$stündigem Aufenthalt im Brutschrank wurde diese Mischung im PFEIFFERschen Versuch titriert. Dabei erwiesen sich $^1/_{25}$ ccm dieser 1000fachen Verdünnung gerade fähig, eine Öse zugesetzter virulenter Choleravibrionen aufzulösen. In der Mischung waren also noch ebensoviel I.-E. disponibel, wie vorher im Serum allein. Ein bestimmbarer dauernder Verbrauch von Antikörpern war nicht eingetreten.

Verschiedenheit der Ambozeptoren verschiedener Tierarten.

Nach EHRLICHS Anschauung sind die gegen das gleiche Bakterium gerichteten Ambozeptoren verschiedener Tierarten nicht gleich.

WECHSBERG (Zeitschr. für Hyg., Bd. XXXIX) sucht den Nachweis hierfür zu bringen durch Auffindung von Komplementen, die nur den Ambozeptor der einen Tierart, nicht den der anderen komplettieren. Normales Taubenserum z. B. komplettiert den immunisatorisch erzeugten Ambozeptor der Taube gegen den Vibrio METSCHNIKOFF, dagegen nicht den immunisatorisch erzeugten Ambozeptor des Kaninchenserums, umgekehrt enthält normales Kaninchenserum das Komplement für die Ambozeptoren des Kaninchenserums.

Diese Versuche dokumentieren in gleicher Weise die Differenz der Komplemente verschiedener Tierarten.

PFEIFFER und FRIEDBERGER (Berliner klin. Wochenschr. 1902, pag. 4) haben die Verschiedenheit der gegen die gleiche Bakterienart gerichteten Ambozeptoren verschiedener Tiere mit Hilfe spezifischer

Antiambozeptoren zu erweisen gesucht. Ein durch Immunisierung mit Choleraziegenserum gewonnenes Kaninchenserum wirkt nur gegen jenes, nicht gegen das Cholerakaninchenserum. Es ist aber bereits früher darauf hingewiesen worden, daß besondere Vorsichtsmaßregeln bei der Beurteilung von Versuchen über Antiambozeptorsera erforderlich sind.

Bildungsstätte der bakteriolytischen Ambozeptoren.

1. Um die Herkunft der Ambozeptoren zu bestimmen, hat man die verschiedenen Organe des Körpers auf ihren Gehalt an diesen untersucht. Aus den Organen werden möglichst homogene Suspensionen hergestellt oder nach vorheriger gründlicher Zerkleinerung Extrakte gewonnen und diese nach den üblichen Methoden auf ihren Antikörpergehalt untersucht. Wenn der bakteriolytische Titer eines Organbreis oder Organextraktes dabei höher ist als der des Serums, so kann daraus gefolgert werden, daß diese Organe die Bildungsstätten oder wenigstens Stapelplätze der Antikörper sind, vorausgesetzt, daß die bakteriolytischen Stoffe des Serums und der Organe identisch sind. Die ersten Untersuchungen wurden an immunisierten Tieren angestellt, deren Serum bereits eine maximale bakteriolytische Kraft entfaltete. Hier zeigten sich keine großen Unterschiede im Gehalt des Serums und der Organe. Wohl aber fanden Pfeiffer und Marx (Zeitschr. für Hyg., Bd. XXVII) und Wassermann (Berliner klin. Wochenschr. 1898, pag. 209) bei Tieren im Beginn der Immunisierung erhebliche Unterschiede. Wie bereits früher ausgeführt, steigt der Antikörpergehalt des Serums erst etwa vom 3. Tage nach der Bakterieninjektion an, um dann etwa am 7.—10. sein Maximum zu erreichen. Die genannten Autoren konnten zeigen, daß im Beginn der Immunisierung zu einem Zeitpunkt, wo der Titer des Blutes noch gering war, die Milz bereits einen wesentlich stärkeren Gehalt an Antikörpern aufwies, und daß Knochenmark, Mesenterialdrüsen und Lunge wenigstens den gleichen Titer wie das Blut aufwiesen, während die anderen Organe weniger Antikörper enthielten. Da die Tiere vor der Entnahme der Organe sorgfältig entblutet waren, so folgte daraus, daß nicht nur Milz, sondern auch Knochenmark, Mesenterialdrüsen und Lunge in näherer Beziehung zu den Antikörpern stehen. Die Versuchsanordnung war im Einzelnen folgende:

Pfeiffer und Marx injizierten kräftigen jungen Kaninchen subkutan abgetötete Choleravibrionen. 5 Tage nach der Injektion wurden die Tiere entblutet und das Serum sowie die Organextrakte im Pfeifferschen Versuch auf ihren Gehalt an Bakteriolysinen geprüft. Sie hatten folgende Titer:

Milz	0,75 mg
Mesenterialdrüsen . .	5—10 „
Lunge	5—10 „
Blut	5—10 „
Knochenmark	$<$ 10
alle anderen Organe . .	$>$ 10

Der Titer des Blutes ist in diesen Versuchen nicht direkt bestimmt, sondern gleich dem Zweifachen des Serumtiters angesetzt worden. Wassermann, der die Antikörperproduktion nach der Injektion von Typhusbazillen untersuchte, fand einige Tage nach der Bazilleninjektion, daß Knochenmark, Milz, Lymphdrüsen und Thymus bereits einen starken Antikörpergehalt aufwiesen, während das Blut und alle anderen Organe noch gar keine Titersteigerung erkennen ließen. Castellani (Zeitschr.

für Hygiene, Bd. XXXVII, pag. 381) und Deutsch (Ann. Past. 1899, pag. 689) bedienten sich der gleichen Methode zur Untersuchung des Ursprungs der bakteriolytischen Antikörper.

Die Herstellung der Organextrakte geschieht in folgender Weise: Die Tiere werden sorgfältig aus der Karotis (oder der Femoralis) entblutet, dann die Organe steril entnommen, gewogen, und im Achatmörser mit feinstem Glaspulver ca. 15 Minuten lang zerrieben. Man kann sich auch der üblichen Zerkleinerungsapparate (Latapie etc.) bedienen (s. den Aufsatz von Pick, ds. Handb., Bd. I, pag. 456ff.). Der Organbrei wird mit einer bestimmten Menge Bouillon (etwa mit dem 4fachen des Organgewichts) aufgenommen und 24 Stunden zur Extraktion auf Eis aufbewahrt. Dann wird die Emulsion nochmals geschüttelt und durch Zentrifugieren von dem Glaspulver befreit. Die überstehende Flüssigkeit, die also das Extrakt der abgewogenen Organmenge darstellt, wird im Pfeifferschen Versuch austitriert.

Um Leukocyten-Extrakte zu gewinnen, wandten Pfeiffer und Marx entweder die Buchnersche Methode (siehe Pick, dieses Handbuch, Bd. I, pag. 410) an, oder sie gingen in folgender Weise vor:

Blut wurde steril in einem mit etwas Ammonoxalatlösung gefüllten Glase aufgefangen, dann zentrifugiert. Zuunterst setzen sich die Erythrocyten ab, darüber folgt eine schmale Leukocytenschicht, oben lagert das Plasma. Dieses wird abpipettiert, der aus den Blutkörperchen bestehende Anteil wird in einer Kältemischung zum Gefrieren gebracht, dann werden von dem gefrorenen Zylinder vorsichtig die obersten, die Leukocyten enthaltenden Schichten abgeschabt. Um die Ausbeute etwas größer zu machen, wurde vorher durch intravenöse Sperminiinjektion eine Leukocytose erzeugt, und das Blut erst auf der Höhe der Leukocytose, etwa vier Stunden nach der Injektion, entnommen.

Um die Möglichkeit auszuschalten, daß der Mehrgehalt der Milz an Antikörpern nur auf einer Aufstapelung beruhe, injizierten Pfeiffer und Marx einem Kaninchen hochwertiges Cholera-Immunserum subkutan und prüften nach 24 Stunden den Gehalt des Blutes und der Milz an Antikörpern. Der Titer der Milz erwies sich hierbei als verhältnismäßig gering, er entsprach nur dem Blutgehalt der Milz.

2. Die Frage nach dem Ursprung der bakteriolytischen Antikörper suchten Pfeiffer und Marx ferner in der Weise zu lösen, daß sie einem Tiere vor dem Beginn der Immunisierung die Milz, die nach den früheren Versuchen als Hauptbildungsstätte anzusehen war, aseptisch exstirpierten. Nachdem das Tier sich genügend erholt hatte, wurde eine Injektion von Choleravibrionen verabfolgt. Pfeiffer und Marx erwarteten, daß in diesem Falle die Antikörperbildung ganz oder doch zum Teil ausbleiben würde, tatsächlich war der Titer der so behandelten Tiere aber ebenso groß, wie der anderer nicht operierter. Es mußten also andere Organe die Funktion der Milz übernommen haben.

3. In einer anderen Modifikation führte das eben geschilderte Verfahren zu befriedigenden Resultaten. Deutsch (Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, pag. 689) exstirpiert dem Kaninchen erst am 3. oder 5. Tage nach der Immunisierung die Milz, also zu der Zeit der stärksten Antikörperproduktion. Das einige Tage später geprüfte Serum erwies sich mehrfach weniger wirksam als das der Kontrolltiere.

Die Antikörperproduktion ist nicht beschränkt auf die hämatopoetischen Organe. Durch die Untersuchungen P. Römers (Graefes Archiv für Ophthalmol. 1901, Bd. LII) und von Dungerns (Die Anti-

körper, Jena 1903) war für Antikörper anderer Art — Antiabrin, Präzipitin — nachgewiesen, daß bei lokaler Behandlung eines Auges mit dem Antigen dieses auch die Antikörper produziere. Wassermann und Citron (Zeitschr. für Hygiene 1905, Bd. L) zeigten, daß auch die Bildungsstätte der bakteriolytischen Immunkörper von der Einbringungsart des Antigens abhängig ist.

Kaninchen erhielten Injektionen lebender Typhusbazillen intrapleural, intraperitoneal oder intravenös. Nach gewisser Zeit wurden bei den Tieren durch Injektion von Aleuronat oder Kochsalzlösung Exsudate erzeugt und dann der Gehalt des Serums, des Peritoneal- und des Pleuraexsudates an Ambozeptoren verglichen. Hierbei zeigte sich, daß meist nach intrapleuraler Bakterieninjektion das Pleuraexsudat, nach intraperitonealer Injektion das Peritonealexsudat, nach intravenöser das Serum den höchsten bakteriolytischen Titer hatte. Es ist daraus zu schließen, daß die der Injektionsstelle unmittelbar benachbarten Gewebe sich am reichlichsten an der Antikörperproduktion beteiligen.

Ein Versuchsprotokoll sei kurz mitgeteilt: 3 Kaninchen erhalten je eine Injektion von $^1/_4$ Öse lebender Typhuskultur und zwar das eine intravenös, das andere intrapleural, das dritte intraperitoneal. Am 9. Tage erhalten die drei Tiere je 5 ccm Aleuronat intrapleural und 10 ccm 0,85 $^0/_0$ige Kochsalzlösung intraperitoneal. Am nächsten Tage Entblutung und Entnahme der Exsudate. Bestimmung des bakteriziden Titers im Plattenverfahren (Technik nach Stern und Korte).

Resultate:

Nummer des Kaninchens	IVa intravenöse Vorbehandlung	IVb intrapleurale Vorbehandlung	IVc intraperitoneale Vorbehandlung
Titer des Serums	$^1/_{3500}$—$^1/_{5000}$	$^1/_{500}$	$^1/_{400}$
Titer des Pleuraexsudates . .	$^1/_{1500}$—$^1/_{1800}$	$^1/_{2000}$—$^1/_{2400}$	$^1/_{1200}$
Titer des Peritonealexsudates .	$^1/_{1500}$—$^1/_{2400}$	$^1/_{1200}$	$^1/_{2400}$

Noch eine andere Versuchsanordnung wandten Wassermann und Citron (l. c.) an, um die lokale Bildung der Antikörper zu erweisen. Es kam auch hier darauf an, die Antigene möglichst auf einen beschränkten Bezirk einwirken zu lassen. Einem Kaninchen wurden 2 Ösen abgetöteter Typhusbazillen subkutan in ein Ohr injiziert, sofort danach wurde das Ohr durch einen Gummischlauch für 2 Stunden abgebunden. Nach etwa 10 Tagen wurde der Serumtiter des Tieres bestimmt und dann das Ohr amputiert. Einige Wochen später wurde der Serumtiter aufs neue festgestellt. Fand sich jetzt ein auffallend starker Rückgang des Titers, so war anzunehmen, daß mit der Amputation des Ohres auch die Quelle der Antikörper ausgeschaltet war. Zur Kontrolle wurde der gleiche Versuch an einem anderen Kaninchen ausgeführt, mit dem einzigen Unterschied, daß das Ohr nicht ligiert wurde.

Von 6 derartigen Versuchen fiel allerdings nur einer in der erwarteten Weise aus, die anderen gaben nicht verwertbare Resultate.

Einfluß äußerer Bedingungen auf die Produktion der bakteriolytischen Ambozeptoren.

Der Einfluß, den Änderungen der äußeren Bedingungen, besonders absichtliche Stoffwechselstörungen, auf die Produktion der Antikörper

ausüben, ist häufiger untersucht worden. Diese Fragestellungen sind insofern von besonderem Interesse, als sie die Beziehungen zwischen Disposition und Infektion berühren. Über die Abhängigkeit der Bakteriolysinbildung von äußeren Bedingungen liegen allerdings nur wenig Mitteilungen vor

Friedberger (Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 10) untersuchte den Einfluß der Alkoholdarreichung und der Mischvaccination auf die Bildung von Choleraambozeptoren. Kaninchen erhielten durch die Schlundsonde 6,5—10 ccm Alkohol in 30 $^0/_0$iger Lösung. Auf der Höhe der danach eintretenden Vergiftung wurden sie mit kleinsten Mengen ($^1/_{600}$—$^1/_{100}$ Öse) bei 60° abgetöteter Cholerabazillen intravenös geimpft. Ein gleich schweres Kaninchen derselben Rasse erhielt die gleiche Vaccindosis ohne vorangehende Alkoholverabfolgung. Am 8. Tage nach der Impfung wurde das Serum im Pfeifferschen Versuch auf seine Wirksamkeit geprüft. Das Serum der Alkoholtiere hatte dabei stets einen höheren Titer als das der Kontrolltiere, im Durchschnitt um das 2,5fache.

In anderen Versuchen wurde eine Dosis von ca. 6 ccm Alkohol längere Zeit hindurch gegeben, dann einige Tage nach Aussetzen der Alkoholbehandlung die Vaccination vorgenommen. Die Mehrzahl der Tiere ging unter der dauernden Alkoholdarreichung zugrunde, die überlebenden zeigten bei der Prüfung ihres Serums einen 10—25fach geringeren Titer als die Kontrolltiere. Die langdauernde Alkokolverabfolgung hatte also eine direkt entgegengesetzte Wirkung wie die einmalige.

Eine Beimischung relativ größerer Mengen (1 Öse) anderer abgetöteter Bakterien zu dem Choleravaccin setzte ebenfalls die Bildung von Choleraambozeptoren erheblich herab.

Unterscheidung der bakteriolytischen Ambozeptoren von anderen Antikörpern.

Ein Immunserum kann seine spezifische Wirkung gegen die homologe Bakterienart nach verschiedenen Richtungen hin ausüben; es kann bakteriolytisch, agglutinierend, bakteriotrop, antitoxisch wirken. Es fragt sich, ob es sich hier nur um verschiedene Äußerungen derselben wirksamen Substanz handelt, oder ob die verschiedenen Wirkungen verschiedenen Stoffen zukommen. Am eingehendsten ist die Frage der Verschiedenheit der Agglutinine von den bakteriolytischen Ambozeptoren bearbeitet worden. Die hier angewandten Methoden können als typisch für diese Untersuchungen betrachtet werden. Der Nachweis der Unabhängigkeit der Agglutinine von den Ambozeptoren ist auf folgenden Wegen zu erbringen versucht worden:

1. Die vergleichende Prüfung des Agglutinin- und Ambozeptorengehaltes in Verlauf der Immunisierung.

Der bakteriolytische und der agglutinierende Titer eines Immunserums gehen nicht Hand in Hand. Im Verlauf der Immunisierung kann zeitweise der agglutinierende Titer steigen, während der bakteriolytische fällt und umgekehrt. Die folgende einer Arbeit von Kolle (Klin. Jahrb. 1903, Bd. XI, pag. 415) entnommene Kurve (pag. 434) gibt derartige Beziehungen anschaulich wieder.

Castellani (Zeitschr. f. Hyg., Bd. XXXVII) zeigt in ähnlicher Weise, daß im Serum gegen Dysenterie immunisierter Tiere die Agglutinine sehr viel rascher schwinden als die Lysine. Dementsprechend kann ein Immunserum gelegentlich bei sehr hohem agglutinierenden Titer nur geringe bakteriolytische Wirkungen haben und umgekehrt. Castellani (l. c.)

hebt hervor, daß Injektion von Dysenteriebazillen bei Schafen nur die Bildung von Agglutininen, nicht von Lysinen auslöse.

Schweinerotlaufserum und manche andere Sera sind stark agglutinierend, dabei läßt sich eine eigentliche bakterizide Wirkung überhaupt nicht nach-

Datum	Injektionsweise
1. 9. 02	2 K. abgt. subkt.
11. 9. 02	6 „ „ „
21. 9. 02	12 „ „ „
28. 9. 02	Titer
29. 9. 02	1 K. abgt. intr.
6.10. 02	Titer
6.10. 02	1 K. lebd. intr.
14.10. 02	Titer
15.10. 02	6 K. abgt. intr.
23.10. 02	Titer
24.10. 02	12 K. abgt. intr.
31.10. 02	Titer
1. 11. 02	12 K. abgt. intr.
8. 11. 02	Titer
8. 11. 02	12 K. abgt. intr.
15. 11. 02	Titer
15. 11. 02	12 K. abgt. intr.
27. 11. 02	Titer
29. 11. 02	18 K. abgt. intr.
9. 12. 02	Titer
9. 12. 02	24 K. abgt. intr.
16. 12. 02	Titer
16. 12. 02	24 K. abgt. intr.
27. 12. 02	Titer
8. 1. 03	24 K. abgt. intr.
18. 1. 03	Titer

1:30000
1:27500
1:25000
1:22500
1:20000
1:17500
1:15000
1:12500
1:10000
1:7500
1:5000
1:2500
1:1000
1:750
1:500
1:250
1:100
1:50
1:25

+ + + + + = Agglut.-Titer des norm. Pferdeserums.
+ — + — + = Bakter. Titer „ „ „
— — — — — = Bakter. Titer des immunisierten Pferdes.
———— = Agglut.-Titer „ „ „

Agglutinations- und bakterizider Titer eines Pferdes während der Immunisierung (subkutan bzw. intravenös) mit Cholera.

weisen. Allerdings kann hier auch eine Unempfindlichkeit der Bakterien gegenüber den Bakteriolysinen als Ursache dieser Erscheinung angesehen werden.

2. Versuche, in einem zugleich agglutinierenden und bakteriolytischen Serum eine Komponente auszuschalten.

a) Bei längerer Aufbewahrung schwächt sich mitunter der Agglutinationstiter stark ab, während der bakteriolytische unverändert bleibt. (Mertens, Deutsche med. Wochenschr. 1901, pag. 381.)

b) Versuche, durch physikalische oder chemische Wirkungen eine isolierte Zerstörung eines Antikörpers zu bewirken, sind erfolglos geblieben (cfr. Castellani, Zeitschr. f. Hyg., Bd. XXXVII).

c) Der Versuch, durch spezifische Absorption des Serums mit einem Antigen, das nur agglutinogen, nicht lysinogen wirkt, eine Scheidung zu erzielen, ist ebenfalls gescheitert.

d) Bei hämolytischen Seris hat Sachs (Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 7) eine Trennung des Lysins vom Agglutinin durch Absorption bei 60° erreicht.

3. Versuche, den Impfstoff so zu verändern, daß er nur agglutinogene oder nur lysinogene Wirkung hat.

Mit Hilfe der unter 1 und 2 angeführten Methoden ist eine weitgehende Differenz im agglutinierenden und bakteriolytischen Verhalten eines Serums leicht zu zeigen. Es beweisen aber, wie Wassermann (Zeitschr. f. Hyg. 1903, Bd. XLII, pag. 267) mit Recht hervorhebt, solche Unterschiede noch nicht ohne weiteres, daß die verschiedene Wirkung völlig verschiedenen Körpern zukomme. Es ließen sich diese Unterschiede auch durch folgende Annahme erklären. Der gleiche Antikörper wirkt sowohl agglutinierend wie bakteriolytisch; er besitzt nur eine haptophore Gruppe, mit der er sich an das Bakterium verankert, aber zwei ergophore Gruppen, von denen die eine die agglutinierende Wirkung vermittelt, die andere nach Verbindung mit dem Komplement lytisch wirkt. Diese beiden ergophoren Gruppen sind unabhängig voneinander beeinflußbar, die agglutinierende und bakteriolytische Wirkung brauchen daher nicht parallel zu gehen.

Diesem Einwand zu begegnen, also eine Verschiedenheit auch der haptophoren Gruppe zu erweisen, sind Versuche geeignet, die auf einer Trennung der entsprechenden Antigene, der Agglutinogene von den Lysinogenen, beruhen. Es gelingt auf verschiedene Weise, Bakterien so zu beeinflussen, daß sie nur agglutinogen oder nur lysinogen wirken.

a) Brieger und Meyer (Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 18) haben durch Abtötung von Bakterien mit Ammonsulfat und Extraktion der abgetöteten Bakterien in Wasser einen Impfstoff hergestellt, dessen Injektion ausschließlich die Bildung von Agglutininen, nicht die von Bakteriolysinen veranlaßte.

b) M. Neisser und Shiga (Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 4) fanden bei ihren Immunisierungen mit freien Typhusrezeptoren, daß Erhitzen der Filtrate auf 75° diese fast unwirksam zur Erzeugung bakteriolytischer Antikörper machte, ihr agglutinogenes Vermögen dagegen nicht störte. Defalle (Ann. Pasteur 1902) hatte bereits früher nachgewiesen, daß Erhitzen von Sporen auf 115° sie unfähig machte, komplementablenkende Antikörper zu erzeugen, während die Bildung von Agglutininen dadurch nicht gehindert wurde.

c) Die Art der Verabfolgung zeigt sich von Einfluß auf die Wirkungsweise in Versuchen von Fränkel nnd Otto (Münchener med. Wochenschr. 1897, Nr. 39). Diese verfütterten Typhusbazillen in großen Mengen an junge Hunde und beobachteten, daß dadurch nur die Bildung von Agglutininen, nicht die von Lysinen ausgelöst wurde. Ähnliche Versuche an anderen Tieren haben allerdings abweichende Resultate ergeben. (Friedberger, Kolle-Wassermann, Hdb. Bd. IV; Schwarz, Centralbl. f. Bakt. I, Ref. 1903, Bd. XXXII, pag. 641.)

d) Friedberger und Moreschi (Centralbl. f. Bakt., Bd. XXXIX, pag. 453) haben umgekehrt eine Methode angegeben, die Agglutinogene

der Cholerabakterien zu zerstören, während die Lysinogene fast gar nicht affiziert sind. Die Vibrionenkochsalzemulsionen wurden in Petrischalen einer 20 Minuten dauernden Einwirkung von Chloroformdämpfen ausgesetzt, die einen auf der Innenseite des Deckels befestigten mit Chloroform getränkten Stück Filtrierpapier entströmten. Der so vorbehandelte Impfstoff löste bei Kaninchen die Bildung eines rein bakteriolytischen Serums aus, dessen Agglutinationsvermögen das des normalen Serums kaum übertraf.

e) Wassermann (Zeitschr. f. Hyg. 1903, Bd. XLII, pag. 267) suchte mit Hilfe der Immunitätsreaktionen die agglutinogene Bakteriensubstanz auszuschalten, so daß nur das Lysinogen übrig blieb. Pyocyaneuskulturfiltrate wirken sowohl agglutinogen wie lysinogen. Wurde aber die agglutinable Substanz mit hochwertigem agglutinierendem Serum aus dem Filtrat ausgefällt, so wirkt die von dem Präzipitat durch Zentrifugieren befreite Flüssigkeit fast ausschließlich lysinogen.

Beziehungen zwischen bakteriziden und komplementablenkenden Antikörpern.

Im allgemeinen werden diese Stoffe identifiziert; die Komplementablenkung ist als Methode zum Nachweis der bakteriziden Ambozeptoren angegeben worden.

Erfahrungen von Moreschi (Berliner klin. Wochenschr. 1906, pag. 1243), Neufeld und Hüne (Arb. aus dem K. Gesundh.-Amt, Bd. XXV, Heft 1) und Haendel (Deutsche med. Wochenschr. 1907, pag. 2030) zeigen allerdings, daß die Komplementablenkung bakteriolytischer Sera nicht immer mit dem Schutzwert und auch nicht mit dem im Plattenversuch feststellbaren Gehalt an bakteriziden Substanzen parallel geht.

Die Beziehungen zwischen den bakteriziden Ambozeptoren und den bakteriotropen Substanzen bzw. den Opsoninen bedürfen noch weiterer Untersuchungen, ehe ein genügend gesichertes Urteil möglich ist (s. Levaditi, d. Handbuch, Opsonine).

Bindung der Komplemente.

Die bakteriolytischen Komplemente sind labile Stoffe frischer Sera, die die Fähigkeit haben, unter Mitwirkung von Ambozeptoren Bakterien abzutöten und aufzulösen. Nach Untersuchungen über Hämolyse (s. Sachs, ds. Handb.) bestehen die Komplente aus einem Mittel- und einem Endstück. Bei der weiteren Bearbeitung vieler Fragen über Natur und Herkunft der Komplemente wird anf diese Befunde Rücksicht zu nehmen sein. Da Erfahrungen auf bakteriolytischem Gebiete noch nicht vorliegen, so werden im Folgenden die Komplemente noch als einfache Körper behandelt. Wie die Ambozeptoren gebunden werden, wenn sie in Wirkung treten, so auch die Komplemente, und zwar sowohl wenn sie durch Vermittlung immunisatorisch erzeugter Ambozeptoren auf Bakterien einwirken, wie in dem Falle, wenn normales Serum ohne Zusatz von Immunserum auf Bakterien einwirkt.

Bordet und Gengou (Ann. de l'Inst. Pasteur, Bd. XIV, pag. 257 und ebenda 1901, Bd. XV, pag. 289) ließen Bakterien, spezifisches inaktives Immunserum und aktives Normalserum aufeinander wirken. Wird nach einiger Zeit zu diesem Gemisch eine andere Bakterienart mit dem entsprechenden Immunserum oder werden rote Blutkörperchen mit dem entsprechenden hämolytischen Serum hinzugesetzt, so werden diese frisch hinzugesetzten Bakterien oder Erythrocyten nicht gelöst; das Komplement

ist nicht mehr verfügbar, es ist bereits an die von Anfang an in der Mischung suspendierten Bakterien gebunden. Ausführung des Versuches siehe pag. 441 ff.

Wassermann und seine Mitarbeiter zeigten, daß in gleicher Weise Bakterienextrakte bei ihrem Zusammentreffen mit spezifischem Immunserum das Komplement absorbieren. Gengou (Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Bd. XVI) hatte bereits 1902 gefunden, daß nach der Injektion von eiweißhaltigen Substanzen Antikörper entstehen, die zusammen mit dem Antigen das Komplement bilden. Moreschi (Berliner klin. Wochenschrift 1905, Nr. 37 und ebenda 1906, Nr. 4) und Gay (Centralbl. für Bakteriol. 1905, Bd. XXXIX, Heft 5) wiesen nach, daß ein beliebiges Serum bei seinem Zusammentreffen mit einem durch Injektion dieses Serums erzeugten Antiserum Komplement bindet. Selbst minimalste Mengen des Antigen-Serums (Verdünnung 1:1 000 000 und mehr) sind bereits wirksam.

Der exakte Nachweis der Komplementbindung bei direkter Einwirkung normaler aktiver Sera auf Bakterien ohne Vermittlung von Immunserum ist ebenso zu führen. Zu dem absorbierten Serum werden sensibilisierte Bakterien oder sensibilisierte Erythrocyten hinzugefügt; das Ausbleiben der Bakteriolyse bzw. Hämolyse beweist dann die Komplementabsorption. Die Versuche über Absorption normaler aktiver Sera stammen großenteils aus einer Zeit, wo die komplexe Zusammensetzung auch des normalen Bakteriolysins noch nicht genügend bekannt war. Es geht aus jenen Versuchen nicht immer hervor, ob das Schwinden der bakteriolytischen Wirkung auf der Absorption des Ambozeptors oder des Komplements oder beider beruht.

Man ließ Serum auf Bakterien einwirken, entfernte diese nach einiger Zeit durch gründliches Zentrifugieren, und prüfte, ob der Abguß noch bakterizid auf frisch zugesetzte lebende Bakterien wirkte. Benutzt man hierzu die gleiche Bakterienart wie zur Absorption, so kann das Schwinden der bakteriziden Wirkung auch auf einer Absorption der spezifischen normalen Ambozeptoren beruhen. Wenn z. B. die für Staphylokokken spezifischen Ambozeptoren verankert sind, so kann noch vorhandenes freies Komplement Staphylokokken gegenüber nicht mehr zur Wirkung kommen.

Ein exakter Schluß auf das Schwinden des Komplements ist also bei dieser Versuchsanordnung nicht möglich. Die Komplementabsorption wird dagegen erwiesen, wenn eine andere Bakterienart, die vom normalen Serum deutlich beeinflußt wird, von dem absorbierten Serum nicht mehr abgetötet wird. Zur Prüfung der Bakterizidie wird für diese Untersuchungen das kulturelle Verfahren benutzt.

Ein einer Arbeit von Wilde (Arch. für Hyg., Bd. XLIV, pag. 1) entnommener Versuch über Absorption des „Alexins" sei angeführt:

Einfluß der Menge der absorbierenden Bakterien.

Aktives Rinderserum.

Eine sehr dichte Aufschwemmung von Bac. Megatherium (eine 24stündige Agarkultur in Kollescher Schale wird in 5—15 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, dann durch Erhitzen auf 100° sterilisiert).

Je 2 ccm Rinderserum werden mit fallenden Mengen der Bakterienaufschwemmung versetzt und $1/2$ Stunde bei 37° gehalten. Dann werden die toten Bakterien abzentrifugiert, in jedes Röhrchen wird 1 Tropfen

Typhus-Bouillonkultur eingesät. Die Röhrchen werden wieder in den Brutschrank gebracht. Verschiedene Zeit nach der Einsaat wird aus jedem Röhrchen 1 Öse entnommen und zur Platte verarbeitet.

Inhalt der Röhrchen	Zahl der Typhuskolonien aus 1 Öse nach			
	sofort	3 Std.	7 Std.	24 Std.
2 ccm Rind.-Ser. + 1,0 ccm Meg.-Emuls.	4 400	23 200	sehr viele	∞
2 „ „ + 0,5 „ „ + 0,5 ccm NaCl	3 970	9 830	13 800	ca. 100 000
2 „ „ + 0,1 „ „ + 0,9 „ „	4 110	24	10	0
2 „ „ + 0 „ „ + 1 „ „	4 280	0	0	0
2 „ inaktives Rinderserum + 1,0 „ „	4 250	21 800	sehr viele	sehr viele

Sowohl lebende wie tote Bakterien absorbieren das Komplement. Die Art der Abtötung ist dabei kaum von Einfluß. Sterilisierung durch Hitze, Äther, Chloroform beeinflussen die Absorptionsfähigkeit nicht merklich nach Bail (Archiv f. Hyg., Bd. XXXV, pag. 284). Werden lebende Bazillen benutzt, so müssen sie sehr sorgfältig aus der Flüssigkeit abzentrifugiert werden, da übrig bleibende Keime durch ihre Vermehrung das Resultat der späteren Einsaat verdecken können. Sehr rasch laufende Centrifugen sind erforderlich. Auch dann ist es schwierig, besonders bei Bakterien mit Eigenbewegung, alle Keime zu entfernen.

Das Komplement wird nicht nur durch Bakterien, sondern auch durch andere zellige Elemente (v. Dungern, Münchener med. Wochenschr. 1900, pag. 677; Wilde, l. c.; Hoke, Centralbl. f. Bakteriol., Bd. XXXIV, pag. 692) und selbst durch nicht organisierte feine korpuskuläre Elemente absorbiert. Die meisten Versuche hierüber weisen die Komplementbindung auf hämolytischem Wege nach.

Durch Ausbleiben der Bakterizidie im Plattenversuch zeigt Wilde in Analogie zu den hämolytischen Versuchen v. Dungerns, daß zertrümmerte Organzellen, Hefezellen, Aleuronatsuspensionen Komplement binden.

Eine steril entnommene Kaninchenleber wird zerschnitten und durch ein feines Drahtsieb gepreßt. Der Brei wird mehrmals mit Kochsalzlösung gewaschen, dann mit Kochsalzlösung so verdünnt, daß 1 ccm der entstehenden Suspension $^1/_2$ g des ursprünglichen Organs entspricht. Wilde läßt 2 ccm aktives Kaninchenserum und 1 ccm dieses Organbreies $^1/_2$ Stunde lang bei 37° auf einander einwirken. Das Serum, das dann mit Typhusbazillen versetzt und im Plattenversuch geprüft wird, hat seine bakterizide Wirkung verloren. Allerdings wirken diese Organbreie nicht so gleichmäßig wie Bakterien.

Eine dichte Aufschwemmung von Hefeagarkultur in Kochsalzlösung oder noch besser eine 10 $^0/_0$ige Suspension eines getrockneten durch Aceton abgetöteten Hefepräparates, ferner 10—20 $^0/_0$ige sterilisierte Aleuronataufschwemmung wirken ähnlich. v. Lingelsheim (Zeitschr. f. Hyg., Bd. XLII) benutzt Carrageensschleim zur Absorption.

Ob diese Komplementabsorption immer durch spezifische Ambozeptoren vermittelt wird, oder ob es sich teilweise um rein physikalische Wirkungen der Oberflächenattraktion handelt, ist fraglich.

Auch im lebenden Organismus läßt sich die Absorption des Komplements durch Injektion von Bakterien nachweisen. Bereits Nissen (Zeitschr. f. Hyg. 1889, Bd. VI, pag. 487) Székely und Szanna (Centralbl.

f. Bakt. 1892, Bd. XII, pag. 139) GATTI (zit. nach FRIEDBERGER, Die bakteriziden Sera; KOLLE-WASSERMANN, Bd. IV), BASTIN (La Cellule 1892, Bd. VIII, pag. 383), DENYS und KAISIN (La Cellule 1893, Bd. IX) zeigten, daß nach intravenöser Injektion größerer Bakterienmassen die bakterizide Kraft des Blutes herabgesetzt ist.

NISSEN injizierte Kaninchen intravenös 10—30 ccm einer sehr dichten Aufschwemmung des „Coccus aquatilis" in physiologischer Kochsalzlösung. Das kurze Zeit nach der Injektion entnommene Blut hatte seine bakterizide Kraft gegenüber dem Coccus aquatilis verloren, die Bakterizidie gegenüber anderen Bakterienarten war dagegen nur wenig beeinflußt.

Die Resultate der zahlreichen Nachprüfungen sind nicht übereinstimmend. Wenn auch einzelne Forscher (LUBARSCH, Zur Lehre von den Geschwülsten und Infektionskrankheiten. Wiesbaden 1899 [Bergmann], pag. 218; CONRADI, Zeitschr. f. Hyg. 1900, Bd. XXXIV, pag. 185) eine Verminderung der Bakterizidie durch Injektion von Bakterien gänzlich leugnen, so stimmen doch die anderen Untersucher darin überein, daß nach Injektion größerer Bakterienmengen die bakterizide Kraft herabgesetzt ist, solange reichlich Bakterien in der Blutbahn vorhanden sind. Das Komplement scheint allerdings sehr rasch regeneriert zu werden, so daß mitunter bald wieder das bakterizide Verhalten des Serums normal sein kann.

Die Frage, ob die Bakterizidie spezifisch nur für die injizierte Bakterienart oder ob sie für alle Bakterien herabgesetzt ist, wird sehr verschieden beantwortet. Die Menge der injizierten Bakterien scheint das Resultat wesentlich zu beeinflussen.

Genaue Untersuchungen, wie sich die normalen Ambozeptoren bei diesen Absorptionsversuchen verhalten, liegen kaum vor. Die gelegentlich beobachtete Spezifität der Absorption weist wohl auf eine Mitwirkung der spezifischen, normalen Ambozeptoren hin.

Durch die Komplementbindung ist ein Mittel gegeben, auch im Organismus das Komplement unwirksam zu machen und so indirekt seine Bedeutung für den Ablauf von Infektionen zu prüfen.

WILDE injizierte Meerschweinchen intraperitoneal eine Aleuronataufschwemmung und Bakterien und fand, daß das Komplement bindende Aleuronat die Infektion förderte.

10 %ige, fraktioniert bei 100° sterilisierte Aufschwemmung von Aleuronat in physiologischer Kochsalzlösung.

Aufschwemmung einer 24stündigen Choleraagarkultur in 30 ccm Bouillon.

Meerschweinchen im Gewicht von 210—235 g.

Resultat:

1.	Meerschw.	erhält	2 ccm	Aleur.-Em.	+ 1,0 ccm	Chol.-Aufschw.	intraperit.	†
2.	„	„	2 „	„	+ 0,3 „	„	„	†
3.	„	„	2 „	„	+ 0,1 „	„	„	†
4.	„	„	2 „	„	+ 0,03 „	„	„	lebt
5.	„	„	4 „	„	+ 0,03 „	„	„	†
6.	„	„	2 „	NaCl-Lösg.	+ 1,0 „	„	„	†
7.	„	„	2 „	„	+ 0,3 „	„	„	lebt
8.	„	„	2 „	„	+ 0,1 „	„	„	lebt
9.	„	„	4 „	„	+ 0,3 „	„	„	lebt
10.	„	„	4 „	Aleur.-Em.	+ — „	„	„	lebt

Durch den Zusatz des komplementabsorbierenden Aleuronates wird also eine sonst untertödliche Cholerabazillendosis tödlich (Archiv für Hyg. 1902, Bd. XLIV).

Nach der gleichen Versuchsanordnung wies Wilde die infektionsbefördernde Wirkung von Leberzellenbrei nach. Bail (Archiv für Hyg., Bd. LII) zeigte, daß auch bei Anwesenheit von spezifischem Immunserum durch Leberbrei die Bakteriolyse von Typhusbazillen gehemmt und der Tod herbeigeführt wird.

Wassermann (Zeitschr. für Hyg., Bd. XXXVII, pag. 173 und Deutsche med. Wochenschr. 1901, pag. 4) benutzte zur Komplementbindung ein sogen. Antikomplementserum, d. h. ein Antiserum, das durch Injektion von normalem aktivem Serum einer anderen Tierart erzeugt war. Wie oben erwähnt, wird beim Zusammentreffen des Antigen- und des Antiserums Komplement gebunden. Wassermann gab Meerschweinchen intraperitoneal in 1 ccm Bouillon eine untertödliche Dosis Typhuskultur ($^1/_{25}$ Öse von einer Kultur, deren letale Dosis $^1/_{20}$ Öse betrug) und injizierte gleichzeitig 2—3 ccm Antikomplementserum. Das Tier stirbt innerhalb 24 Stunden, während ein Kontrolltier mit der gleichen Dosis Kultur ohne Antikomplementserum oder mit Kultur + inaktivem Normalserum am Leben bleibt.

Weil (Centralbl. für Bakt., Bd. XLIII, pag. 190) läßt das Komplement im Tierkörper durch das Zusammentreffen von Choleravibrionenextrakt und Choleraimmunserum binden. Einem Meerschweinchen werden 2,5 ccm Extrakt + 5 mg Immunserum intraperitoneal injiziert, eine halbe Stunde später 1 Öse Cholera. Weil sucht mit Hilfe dieser Methodik zu prüfen, welcher Einfluß der Phagocytose bei Ausschaltung der Bakteriolyse zukommt, bzw. wie die Phagocytose durch das Immunserum beeinflußt wird.

Bordet-Gengous Methode zum Nachweis speifischer Immunkörper.

Bordet (Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome XIV, pag. 257) benutzte das Phänomen der Komplementbindung, um auf indirektem Wege die Anwesenheit von Ambozeptoren nachzuweisen. Das Komplement wird nach Bordet — bei Innehaltung gewisser Mengenverhältnisse — vollständig nur dann gebunden, wenn spezifische Ambozeptoren anwesend sind. Aus der Bindung des Komplements kann umgekehrt auf die Anwesenheit spezifischer Ambozeptoren geschlossen werden. Um zu prüfen, ob in der Mischung der Bakterien, des auf Ambozeptoren zu prüfenden Serums und des Komplements noch freies Komplement vorhanden ist, setzt Bordet gewaschene Blutkörperchen + spezifischem hämolytischem Immunserum hinzu. Tritt Hämolyse ein, so ist noch Komplement verfügbar, bleibt sie aus, so ist alles Komplement gebunden. Den Versuch führt Bordet in folgender Weise aus.

Eine frische Choleraagarkultur wird in 5 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. In einem kleinen Reagenzglase wird gemischt: 0,5 ccm der Choleravibrionenaufschwemmung, 0,3 ccm Anticholeraserum von einem immunisierten Kaninchen und 0,5 ccm normales aktives Meerschweinchenserum als Komplement. Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank von 37° werden 2 Tropfen gewaschenes Kaninchenblut und 0,2 ccm spezifisches hämolytisches Serum hinzugesetzt. Die Mischung kommt in den Brutschrank zurück, die Hämolyse bleibt aus.

Zur Kontrolle wird ein zweiter Versuch angestellt, in dem das spezifische Anticholeraserum durch normales Kaninchenserum ersetzt ist. 0,5 ccm Vibrionenaufschwemmung + 0,3 ccm normales inaktives Kaninchenserum + 0,5 ccm normales frisches Meerschweinchenserum.

Nach einstündiger Inkubation bei 37^{0} werden wieder hinzugesetzt: 2 Tropfen gewaschene Kaninchen-Erythrocyten + 0,2 ccm Hämolysin.

Da in diesem Kontrollversuch die spezifischen Ambozeptoren für Choleravibrionen fehlen, wird das Komplement nicht gebunden und es bleibt für die nachträglich zugesetzten Erythrocyten verfügbar. Es tritt innerhalb kurzer Zeit völlige Hämolyse ein.

An Stelle der Blutkörperchen kann zur Prüfung auf freies Komplement auch eine zweite Bakterienart mit ihrem spezifischen Serum verwandt werden. Aus dem Eintreten oder Ausbleiben der Lyse dieser zugesetzten Bakterien wird geschlossen, ob Komplement noch verfügbar war oder nicht. Die beiden angewandten Bakterienarten müssen morphologisch so verschieden sein, daß sie im mikroskopischen Präparat sich leicht unterscheiden lassen.

Die Beurteilung des Versuchs ist allerdings erheblich schwieriger, als bei Anwendung eines hämolytischen Systems. Der Eintritt oder das Fehlen der Hämolyse ist leicht zu erkennen. Hier aber werden in jedem Fall Bakterien aufgelöst; der Untersucher muß sein Urteil darüber abgeben, welche Bakterienart aufgelöst, welche unverändert geblieben ist. Das ist natürlich nur möglich bei Bakterienarten, die morphologisch im mikroskopischen Bilde sich leicht und sicher unterscheiden lassen.

Bordet und Gengou benutzten Proteus- und Cholerabakterien. Ihrer Arbeit (Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome XV, pag. 289) ist folgendes Protokoll entnommen:

Proteusemulsion (eine 24stündige Agarkultur in 6 ccm Kochsalzlösung).
Inaktives bakteriolytisches Antiproteusserum.
Choleraemulsion (24stündige Agarkultur in 6 ccm Kochsalzlösung).
Inaktives Anticholeraserum von einem Meerschweinchen.
Komplement (frisches normales Meerschweinchenserum).

a) 0,2	Komplement	+ 0,3	Proteus-Emulsion	+ 0,6	inaktives	Antiproteus-Serum
b) 0,2	„	+ 0,3	„	+ 0,6	„	normales Serum
c) 0,2	„	—	—	+ 0.6	„	Antiproteus-Serum
d) 0,2	„	—	—	+ 0,6	„	normales Serum

nach 5stündiger Einwirkung bei Zimmertemperatur werden zu jedem Röhrchen 0,2 ccm von einem Gemisch hinzugesetzt, das aus 0,5 ccm Choleravibrionenaufschwemmung und 1 ccm Anticholeraserum besteht.

Nach weiterem $1^1/_2$stündigem Verweilen im Brutschrank werden gefärbte Ausstrichpräparate von den 4 Röhrchen angelegt.

Resultat:

a)	Proteus aufgelöst	Cholera erhalten
b)	„ erhalten	„ aufgelöst
c)	—	„ „
d)	—	„ „

Das Ergebnis wird noch augenfälliger, wenn die Ausstrichpräparate erst am nächsten Tag angelegt werden, nachdem die Röhrchen über Nacht im Zimmer und dann noch 6 Stunden im Brutschrank gestanden haben. In Röhrchen a ist eine starke Vermehrung von Choleravibrionen, in b, c und d von Proteusbazillen eingetreten.

In derselben Weise, wie Bakterien bei Anwesenheit des spezifischen Immunkörpers Komplement binden und seine Einwirkung auf nachträglich zugesetzte Erythrocyten verhindern, binden umgekehrt auch Erythrocyten + spezifischem hämolytischen Serum das Komplement, so daß nachträglich hinzugesetzte sensibilisierte Choleravibrionen ungelöst bleiben.

Choleravibrionenemulsion (1 Agarkultur in 10 ccm Kochsalzlösung). Dazu wird ungefähr ein Drittel Cholerakaninchenserum gesetzt, das vorher eine halbe Stunde auf 55° erhitzt worden ist. Das Gemisch der Vibrionen mit dem Immunserum stellt die „sensibilisierten Vibrionen" dar.

Gewaschenes Kaninchenblut.

Inaktiviertes hämolytisches Serum von einem Meerschweinchen, das mit Kaninchenblut vorbehandelt ist.

Frisches Meerschweinchenserum als Komplement.

a) 0,3 ccm Kaninchenblut + 0,6 ccm inaktives hämolytisches Serum + 0,3 ccm frisches Meerschweinchenserum;
b) 0,3 ccm Kaninchenblut + 0,6 ccm inaktiv. normales Meerschweinchenserum + 0,3 ccm frisches Meerschweinchenserum;
c) 0,3 ccm Meerschweinchenblut + 0,6 ccm hämol. inakt. Serum (gegen Kaninchenblut) + 0,3 ccm frisches Meerschweinchenserum.

In Röhrchen a tritt Hämolyse ein, in b und c nicht.

Nach 1—2 Stunden werden jedem Röhrchen 0,1 ccm sensibilisierte Vibrionen hinzugefügt, die Röhrchen kommen für eine Stunde in den Brutschrank. Dann werden gefärbte Ausstrichpräparate angelegt.

In b und c ist Bakteriolyse eingetreten, in a nicht.

Bordet und Gengou (l. c.) wandten die Methode der Komplementbindung an, um den Nachweis spezifischer immunisatorisch erzeugter Antikörper auch für solche Sera zu führen, die nicht bakteriolytisch wirken. Für die praktische Verwertung des Versuches ist eine Reihe von Kontrollversuchen nötig.

Es ist zu zeigen:

1. daß das Immunserum allein, ohne die homologen Bakterien, das Komplement nicht bindet;
2. daß die Bakterien allein, ohne das homologe Serum, das Komplement nicht binden;
3. daß die Bakterien mit inaktivem Normalserum ebenfalls das Komplement nicht binden.

Bordet und Gengou machen selbst darauf aufmerksam, daß die Bakterien allein bereits eine gewisse — mitunter erhebliche — Hemmung bewirken. Die Mengenverhältnisse sind hier von wesentlicher Bedeutung, vielleicht spielen auch Verschiedenheiten der Bakterienstämme eine Rolle.

Da das Normalserum häufig ebenfalls Ambozeptoren für eine bestimmte Bakterienart enthält, so kann es in diesen Fällen, zusammen mit den Bakterien, eine gewisse Hemmung ausüben. Die Methode der Komplementablenkung ist sogar zum Nachweis von Ambozeptoren in normalem Serum benutzt worden. (S. pag. 412.)

Während eine zu große Bakterienmenge an sich hemmend wirkt, vermag eine zu kleine, auch bei Anwesenheit von spezifischem Immunserum, das Komplement nicht völlig zu binden. Ebenso darf auch die Immunserummenge nicht zu klein gewählt werden, wenn die Komplementbindung vollständig sein soll. Es bedarf meist besonderer Vorversuche, um die günstigsten Mengenverhältnisse festzustellen. Es gelingt nicht immer, den Versuch so zu gestalten, daß im Endresultat komplette Lyse und komplette Hemmung sich gegenüberstehen. Immerhin

müssen markante Unterschiede vorliegen, wenn man das Resultat verwerten will.

Ein Versuchsprotokoll von Bordet und Gengou sei wiedergegeben: Nachweis komplementbindender Antikörper im Antipestserum.

Antipestserum vom Pferd.

Inaktives normales Pferdeserum.

Eine sehr dichte Aufschwemmung von Pestbazillen in physiologischer Kochsalzlösung. Eine 24 stündige Agarkultur wird in einigen Kubikzentimetern Kochsalzlösung aufgeschwemmt).

Normales aktives Meerschweinchenserum als Komplement.

Es werden in kleinen Reagenzgläsern folgende Mischungen a bis f angesetzt:

(Nicht angegeben ist die Kontrolle, die beweist, daß die Pestbazillen für sich nicht bindend wirken.)

a)	0,2 ccm Kompl.	+ 0,4 ccm Bazillenemuls.	+ 1,2 ccm inaktiv.	Pestserum
b)	0,2 „ „	+ 0,4 „ „	+ 1,2 „ „	norm. Pferdeserum
c)	0,2 „ „	—	+ 1,2 „ „	Pestserum
d)	0,2 „ „	—	+ 1,2 „ „	norm. Pferdeserum
e)	—	0,4 ccm Bazillenemuls.	+ 1,2 „ „	Pestserum
f)	—	0,4 „ „	+ 1,2 „ „	norm. Pferdeserum

Nach 5 stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur werden zu jedem Röhrchen hinzugesetzt 0,2 ccm von folgender Mischung; 2 ccm inaktiviertes hämolytisches Serum (von einem Meerschweinchen, das gegen Kaninchenblut immunisiert ist) + 20 Tropfen defibriniertes gewaschenes Kaninchenblut.

Resultat: Innerhalb 5—10 Stunden tritt in den Röhrchen b, c, d komplette Hämolyse ein, die Röhrchen a, e, f bleiben ungelöst.

In ähnlicher Weise sind komplementbindende Antikörper im Rotlaufserum, im Typhusserum (von Tieren, geimpften Menschen und von Rekonvaleszenten) und in manchen anderen Seris nachgewiesen.

Immerhin ist die Anwendung der Methode wegen ihrer Umständlichkeit und ihrer Fehlerquellen beschränkt geblieben. Wassermann und seine Mitarbeiter zeigten in neuerer Zeit, daß die Hauptfehlerquelle des Versuchs, die Komplementbildung, die die Bakterien an sich ausüben, vermindert werden kann, wenn die Bakterien durch Bakterienextrakte ersetzt werden. In dieser veränderten Form ist das Komplementbindungsverfahren neuerdings vielfach angewandt worden. Die genauere Darstellung dieser Methodik findet sich an anderer Stelle (s. Citron, d. Handbuch).

Die Komplementbindung wird im allgemeinen als Methode zum Nachweis von Ambozeptoren betrachtet. Ob aber diese komplementbindenden Antikörper tatsächlich mit den bakteriziden Ambozeptoren identisch sind, muß nach den bereits auf pag. 436 erwähnten Arbeiten fraglich erscheinen. Haendel schlägt deshalb vor, die komplementbindenden Substanzen mit dem besonderen Namen, „Bordetsche Antikörper“ zu bezeichnen.

Vielheit der Komplemente.

Die Frage, ob im Serum nur ein oder verschiedene Komplemente vorhanden sind, findet auch heute noch sehr verschiedene Beantwortung. Es stehen sich gegenüber

1. die unitarische Ansicht von Bordet,
2. die dualistische von Metschnikoff (Makro- und Mikrocytase),
3. die pluralistische von Ehrlich und seiner Schule.

Die Frage ist hauptsächlich mit Hilfe der hämolytischen Technik bearbeitet worden. Es sei deshalb auf den Abschnitt über Hämolysine verwiesen. Zur Differenzierung bakteriolytischer Komplementwirkungen bezw. bakteriolytischer von hämolytischen sind folgende Methoden herangezogen worden.

1. Thermische Einflüsse.

Als Inaktivierungstemperatur der Komplemente gilt eine solche von 55—56° bei $^{1}/_{2}$ stündiger Erhitzung. Daß gewisse hämolytische Komplementwirkungrn schon bei erheblich niedrigeren Temperaturen zerstört werden, ist bekannt. Ebenso weiß man seit langem, daß die bakteriolytische Wirkung vieler Sera auf Milzbrandbazillen im allgemeinen erst durch bedeutend höhere Temperaturen zerstört wird. Allerdings ist nach den Untersuchungen von Pirenne (s. pag. 451) die milzbrandfeindliche Substanz des Rattenserums nicht mehr als Komplement anzusehen. Nach Buxton (Journ. of med. Res 1904, Bd. XIII) und Steinhardt (Journ. of med. Res. 1905, Bd. XIV) erlischt die Komplementwirkung gegen Paratyphus, Bac. coli und Bac. dysenteriae bei etwas niedrigeren Temperaturen als die gegen Typhus.

2. Spontane Abschwächung mit der Zeit.

Nach Steinhardt (l. c.) erlischt die bakterizide Wirkung des Kälberserums gegen Dysenteriebazillen nach 72stündiger Aufbewahrung im Zimmer, während Typhusbazillen noch stark beeinflußt werden.

3. Filtration.

Nach Vedder (Journ. of med. Res. 1903, Bd. IX) passiert das Typhuskomplement das Berkefeldfilter, während andere bakterizide Komplemente zurückgehalten werden. Steinhardt (l. c.) hebt dagegen hervor, daß auch die Ambozeptoren teilweise zurückgehalten werden, daß die Resultate Vedders daher nicht eindeutig sein.

4. Spezifische Absorption.

Bordet stützt seine Ansicht von der Einheit des Komplements besonders auf die Beobachtung, daß bei der Einwirkung eines komplettierenden Serums auf sensibilisierte Bakterien sowohl das bakteriolytische wie das hämolytische Komplement schwinden (s. pag. 436). Wie Ehrlich und Marshal (Berl. klin. Wochenschr. 1902) ausgeführt haben, kann dies Phänomen auch anders erklärt werden (vergl. Sachs, Bd. II). Die Allgemeingültigkeit der Bordetschen Beobachtung ist ferner in letzter Zeit bestritten worden. Besonders Neufeld und Hüne (Arb. aus dem Kais. Ges.-Amte Bd. XXV, Heft 1) heben hervor, daß stark bakteriolytisch wirkende Sera im Bordetschen Komplementbindungsversuch mitunter ganz wirkungslos sind. Sie schließen daraus auf eine Verschiedenheit des bakteriolytischen vom hämolytischen Komplement. Nissen (Zeitschr. für Hygiene Bd. VI, pag. 487), Bail (Arch. für Hygiene Bd. XXV, pag. 284, 1899), M. Neisser (Deutsche Med. Wochenschr. 1900, pag. 790), Vedder (l. c.) zeigten, daß bei geeigneter Versuchsanordnung ein Serum durch Absorption mit einer bestimmten Bakterienart zwar unwirksam gegen diese, nicht aber gegen andere Bakterienarten wird. Die Unwirksamkeit des absorbierten Serums gegenüber der zur Absorption benutzten Bakterienart könnte bei dieser Versuchsanordnung jedoch auf einer Erschöpfung der normalen spezifischen Ambozeptoren beruhen, während vom Komple-

ment noch Reste vorhanden sind. FORSTER (Lancet 1905, pag. 1531) fügt deshalb zu dem normalen aktiven Serum, dessen Komplement absorbiert werden soll. noch 2 Vol. normales inaktives Serum, um so mit Hilfe einer größeren Ambozeptorenmenge eine vollständigere Komplementabsorption zu erhalten. Dieses Gemisch wird mit Typhusbazillen versetzt. Nach einer bestimmten Einwirkungsdauer ($^1/_4$—$^1/_2$ Stunde) bei Brutschranktemperatur werden die Bakterien abzentrifugiert, der Abguß wird weiter untersucht. Da die Typhusambozeptoren ganz oder zum Teil absorbiert sind, so wird dem Abguß zur Prüfung auf den Komplementgehalt wieder inaktiviertes normales Serum zugesetzt (zu 4 Teilen Abguß 1 Teil inaktiviertes Normalserum). Dieses Gemisch wirkt noch bakteriolytisch gegen Choleravibrionen, nicht mehr bakteriolytisch gegen Typhusbazillen. Aber auch bei dieser Versuchsanordnung hält es FORSTER für möglich, daß noch Reste des Komplements ungebunden geblieben sind, die nun zwar nicht mehr auf Typhusbazillen, aber doch noch auf die empfindlicheren Choleravibrionen wirken. Er sieht den Beweis für diese Anschauung in folgendem Versuch: Der Abguß des 15 Minuten mit Typhusbazillen in Berührung gewesenen Serumgemisches wird nochmals mit frischen Typhusbazillen versetzt, die weitere 45 Minuten einwirken. Danach wird zentrifugiert. Der jetzt erhaltene Abguß ist auch gegen Choleravibrionen fast völlig wirkungslos.

5. Einwirkung großer Aderlässe.

Nach STEINHARDT (l. c.) wird dadurch das Dysenteriekomplement abgeschwächt, das für Typhus nicnt.

6. Chemische Einwirkungen.

Nach OTTOLENGHI und MORI (Centralbl. f. Bakt. 1905, Bd. XXXVIII) gelingt es, durch mehrstündige Behandlung von Serum mit Äther das hämolytische Komplement zu zerstören, während die so behandelten Sera noch die Fähigkeit haben, Milzbrand gegenüber komplettierend zu wirken.

BORDET (XIII. Congrès intern. d'hyg. et de démogr. Bruxelles 1903) wendet gegen die Beweiskraft aller dieser Untersuchungen ein, daß sie auch durch die verschiedene Empfindlichkeit der einzelnen Bakterienarten gegenüber dem Komplement zu erklären seien. Wenn das einheitliche Komplement durch die Behandlung geschädigt sei, so wirke es zwar noch gegen die empfindlichen Bakterienarten, aber nicht mehr gegen weniger empfindliche.

7. Herkunft der Komplemente.

METSCHNIKOFF gründet seine dualistische Ansicht vorwiegend auf den Befund, daß die Extrakte der an „Makrophagen" reichen Organe hämolytisch. die „Mikrophagen" und ihre Extrakte bakteriolytisch wirken. Nach KORSCHUN und MORGENROTH (Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 37) sind aber die hämolytischen Organsubstanzen nicht mit den Serumhämolysinen zu identifizieren. Ebenso unterscheiden sich die bakteriziden Leukocytenstoffe von den bakteriziden Serumsubstanzen.

Verbreitung des Komplements im Organismus.

Als Methode zum Nachweis der Komplemente dient meist das Plattenverfahren, das allerdings häufig ohne Rücksicht auf die komplexe Zusammensetzung der Bakterizidine angewandt wird. Das Fehlen der

Bakterizidie beweist streng genommen noch nicht das Fehlen der Komplemente, es könnte auch durch einen Mangel an Ambozeptoren verursacht sein. Nun ist aber allgemein anerkannt, daß die Ambozeptoren, wenn sie überhaupt bei der betreffenden Tierart vorhanden sind, frei im Blute und den Gewebssäften zirkulieren. Deshalb darf man wohl im allgemeinen bei Tieren, deren Serum bakteriolytisch ist, auch aus den einfachen bakteriziden Versuchen Schlüsse auf die Anwesenheit oder das Fehlen des Komplements in einer bestimmten Körperflüssigkeit machen.

Neben der Plattenmethode kommt die direkte mikroskopische Beobachtung der Bakteriolyse im hängenden Tropfen oder im gefärbten Präparat in Betracht. Entweder läßt man die zu untersuchende Flüssigkeit für sich auf normale Bakterien einwirken, oder man führt den exakten Komplementnachweis, indem man statt der normalen sensibilisierte Bakterien (Metschnikoff) benutzt. Schließlich kann auch die mikroskopische Beobachtung von Schnittpräparaten herangezogen werden.

a) Untersuchung des Plasmas.

Die Metschnikoffsche Schule ist der Ansicht, daß in den Körpersäften normalerweise das Komplement nicht frei vorhanden ist, in diese erst unter besonderen Umständen übertritt, die mit einer Leukocytenschädigung einhergehen. Die Mehrzahl der anderen Autoren nimmt dagegen die freie Existenz des Komplements im Blutplasma und dem Gewebssaft an.

Die Methoden zur Gewinnung des Plasmas sind bereits ausführlich von Pick (Dies. Handb., Bd. I) geschildert worden. Hier seien sie nur aufgeführt, soweit sie für bakteriolytische Untersuchungen öfter verwandt sind. Die Fibrinausscheidung aus dem Blute kann verhindert werden:

1. durch Zusatz chemischer Mittel zum entnommenen Blute,
2. durch stärkere Abkühlung,
3. durch Auffangen des Blutes in Gefäßen mit völlig glatten adhäsionsfreien Wänden (paraffinierte Röhrchen nach Freund),
4. durch Aufbewahrung des Blutes in der überlebenden Vene,
5. durch Injektion gerinnungshemmender Substanzen in das zirkulierende Blut.
6. Das Plasma aus Vogel- und Kaltblüterblut kann ohne sonstige Zusätze gewonnen werden, wenn bei der Entnahme die Berührung des Blutes mit Geweben sorgfältig vermieden wird.

1. Die Gerinnung läßt sich aufheben durch Zusatz von Alkaliverbindungen der Oxalsäure, Citronensäure, Flußsäure, von Seifen oder großen Mengen Magnesiumsulfat u. a.

a) Für die in Betracht kommenden Zwecke ist es erforderlich, daß die zugesetzten Stoffe für sich in der entsprechenden Konzentration weder schädigend auf die Bakterien noch auf die bakteriziden Substanzen des Serums wirken. Diese Forderung erfüllen die Oxalate. Nach Pettersson (Arch. für Hyg., Bd. XLIII) wird in das zum Auffangen des Blutes bestimmte Gefäß soviel einer sterilisierten 10 %igen Kaliumoxalatlösung vorgelegt, daß der Gehalt der Gesamtflüssigkeit an Oxalat sich nachher auf 1 % berechnet. Durch Zentrifugierung wird das Plasma gewonnen. Aber auch dies Plasma entspricht in seinen bakteriziden Eigenschaften nicht ganz dem Plasma des zirkulierenden Blutes. Pettersson wies nach, daß die bakterizide Kraft von Serum durch Oxalatzusatz etwas gesteigert wird, obwohl das Salz an sich in der angewandten Konzentration nicht bakterizid wirke.

Löwit und Schwarz (Zeitschr. für Heilkunde 1903) bestätigen bei Verwendung von Typhus- und Colibakterien Petterssons Beobachtungen. Milzbrand- und Cholerabazillen gegenüber wirkt allerdings, wie schon früher Gengou (Ann. de l'Inst. Pasteur 15) betonte, der Oxalatzusatz an sich bakterizid, diese Bakterien werden also zweckmässig nicht für die Versuche mit Oxalatplasma benutzt.

Löwit und Schwarz (l. c.) haben noch eine größere Anzahl anderer gerinnungshemmender Stoffe zu ihren Untersuchungen herangezogen.

b) Fluorplasma. Carotisblut wird in 2—3 %iger sterilisierter Natriumfluoridlösung aufgefangen, so daß die Blutsalzmischung nachher 2—3 ‰ Natriumfluorid enthält.

c) Citratplasma. 9 Teile aus der Carotis entströmenden Blutes werden mit einem Teil 4 %iger Kaliumcitratlösung gemischt. Der Zusatz von Natriumfluorid oder Kaliumcitrat verstärkt die Bakterizidie des Serums (bzw. auch des Plasmas) ein wenig. Andere gerinnungshemmende Zusätze sind nach Löwit und Schwarz weniger geeignet. Kochsalz in der erforderlichen Konzentration bewirkt Hämolyse, Magnesiumsulfat hemmt die Bakterizidie stark, Monokaliumphosphat hebt sie auf.

2. Durch Auffangen des Blutes in eisgekühlten Gefäßen und Aufbewahrung bei 0° ist Pferdeblut mehrere Tage lang ungerinnbar zu halten. Durch Zentrifugierung in der Kälte (die Zentrifugenröhrchen werden in größere mit Eis gefüllte Zentrifugeneinsätze gestellt) läßt sich das Plasma abtrennen. Die ersten Versuche über Bakterizidie in vitro (Grohmann, Diss. 1884 Dorpat) sind mit Hilfe dieser Methode ausgeführt worden. Nissen ließ das Pferdeblut in der Kälte sich absetzen, filtrierte die oberen Teile der Flüssigkeit in der Kälte durch steriles Fließpapier und setzte die Bakterizidieversuche meist bei Zimmertemperatur an. Die Gerinnung blieb dabei gewöhnlich aus (Zeitschr. für Hygiene 1889, Bd. VI, pag. 487). Bei anderen Blutarten gibt aber die Methode weniger gute Resultate, besonders gerinnt das Blut bzw. Plasma leicht, wenn es wieder auf höhere Temperatur gebracht wird.

3. Mit größerer Sicherheit wird die Gerinnung des Blutes hintangehalten, wenn das Blut, ebenfalls bei Eistemperatur, in Röhrchen aufgefangen wird, die durch Eintauchen in geschmolzenes Paraffin mit einer dünnen Schicht dieser Substanz überzogen sind. (Bordet und Gengou, (Ann. de l'Inst. Pasteur, Bd. XV. Gengou, ebenda.)

Die Methode der Paraffinröhrchen ist ursprünglich angegeben von Freund (Jahrb. d. K. k. Ges. d. Ärzte, Wien 1886 und Ber. d. 66. Vers. D. Naturf. u. Ärzte, Wien 1894). Auch alle weiteren mit dem Blute in Berührung kommenden Glasgefäße müssen paraffiniert sein. Aber auch hier tritt beim Erwärmen allmähliche Gerinnung des Plasmas ein.

4. Lambotte (Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIV) benutzt das Ausbleiben der Gerinnung bei Aufbewahren des Blutes im überlebenden Blutgefäße zur Erlangung eines möglichst unveränderten Plasmas (Methode von Frédéricq). Eine mit Blut strotzend gefüllte Vene wird doppelt abgebunden, jenseits der Ligaturen abgeschnitten, aus dem Körper entnommen und im Eisschrank hängend aufbewahrt. Nach 2—3 Stunden haben sich die Blutkörperchen abgesetzt. Durch eine neue Ligatur werden die beiden Schichten, Plasma und Blutkörperchen, von einander getrennt. Nachdem man nochmals die Plasmaschicht eine Stunde hat sedimentieren lassen, wird die klare Flüssigkeit abpipettiert und zentri-

fugiert. Auch dies Plasma gerinnt, sobald es der Brutschranktemperatur ausgesetzt ist.

5. Die Gerinnung des Blutes ist zu verhindern durch Injektion von Pepton- oder Histonlösung oder von Blutegelextrakt in die Vene des lebenden Tieres.

a) Peptonplasma. Buchner (Arch. für Hygiene, Bd. X) spritzte einem Hunde von 10 kg 30 ccm sterile 10 %ige Peptonlösung (Grübler) intravenös ein und entnahm das Blut nach 3 Minuten. Hewlett (Arch. f. exp. Path. und Pharm. 1903, Bd. XLIX) zeigte, daß diese Mengen Pepton die Bakterizidie nicht wesentlich beeinflussen, größere Dosen setzen sie allerdings herab.

b) Durch intravenöse Histoninjektion (0,3 g pro kg) läßt sich beim Hunde ebenfalls die Gerinnung vermeiden. Die hämolytische Kraft wird nach Hewlett durch Histon herabgesetzt.

c) Um durch Injektion von Blutegelextrakt ungerinnbares Hundeblut zu erhalten, verfährt Hewlett nach Bohrs Vorschrift in folgender Weise. Pro Kilogramm Körpergewicht des Hundes werden 4 Blutegelköpfe extrahiert. Diese werden mit Sand und 0,9 %iger Kochsalzlösung verrieben, die entsprechende Aufschwemmung wird durch Zentrifugieren geklärt, dann intravenös injiziert. Löwit und Schwarz (l. c.) stellen ein steriles Blutegelextrakt in folgender Weise her. Die Kopf- und eventuell auch die Schwanzstücke von 10 Blutegeln werden für 24 Stunden in 95 %igen Alkohol eingelegt, der während dieser Zeit 2 mal gewechselt wird. Die gehärteten Stücke werden mit einer Schere zerschnitten und für 4—5 Stunden in absoluten Alkohol übertragen. Aus dem Alkohol werden sie in eine sterile Dose gelegt und für einige Stunden zur Trocknung in den Brutschrank gebracht. Die trockenen Stücke werden in steriler Reibschale zerrieben und mit 20 ccm 1 %iger NaCl-Lösung aufgenommen. Nach dem Absetzen wird durch sterile Glaswolle filtriert. 8—10 ccm genügen, um bei intravenöser Injektion das Blut eines Kaninchens vor der Gerinnung zu schützen.

Das käufliche Hirudin ist ebenfalls anwendbar.

6. Das Plasma der Vögel, besonders der Gänse, läßt sich nach Délézenne (Archives de physiol. 9, 1897) gewinnen, wenn bei der Blutentnahme die Berührung des Blutes mit dem Gewebe sorgfältig vermieden wird. Levaditi (Ann. de l'Inst. Pasteur 1904), Löwit und Schwarz (l. c.) und Hewlett (l. c.) haben diese Methode angewandt. Hewlett sucht mit sauberen glatten Instrumenten unter Vermeidung von Gewebs- und Gefäßverletzungen die Carotis oder Jugularis auf und bindet eine sterile Glaskanüle in das Blutgefäß, das ausströmende Blut wird sofort zentrifugiert.

Bei weitem die Mehrzahl der Untersucher fanden, daß dem Plasma ein annähernd so großes bakterizides Vermögen wie dem Serum zukommt. Daß die Leukocyten bei der Gewinnung des Plasmas nicht wesentlich geschädigt werden, wiesen Lambotte und Stiennon (Centralbl. für Bakt., Bd. XL, Heft 2) nach, indem sie zeigten, daß die Phagocytose durch das Zentrifugieren und einen nicht zu langen Aufenthalt außerhalb des Körpers nicht oder doch nur sehr wenig beeinträchtigt wird. Immerhin konnte eingewendet werden, daß alle diese Plasmen doch nicht völlig dem Plasma des zirkulierenden Blutes entsprechen. Löwit und Schwarz (l. c.) konnten stets Fibrinferment nachweisen (Methode des Nachweises siehe bei den Autoren), dessen Anwesenheit immer auf eine Veränderung gegenüber dem nativen Plasma hindeute.

Schneider (Münchener med. Wochenschr. 1907, pag. 146) gelang es neuerdings, völlig fibrinfermentfreies Plasma zu gewinnen. Auch dieses war ebenso stark bakterizid wie das Serum. Levaditi (Ann. de l'Inst. Pasteur 1904) weist darauf hin, daß das Plasma der Immuntiere extravasal agglutinierend wirken könne, während eine Agglutination innerhalb der Gefäße nicht zu beobachten sei. Auch dieser Umstand spräche in demselben Sinne.

Die direkteste Methode, das Vorhandensein oder Fehlen der Bakteriolyse im strömenden Blut zu untersuchen, ist die Injektion von Mikroben in die Blutbahn und die nachfolgende mikroskopische Beobachtung (s. pag. 387).

b) Untersuchung der Leukocyten auf den Gehalt an Komplementen.

Die Leukocyten sind vielfach als wichtigste Stätte der Komplementbildung angesehen worden. Die Methoden zur Gewinnung der Leukocyten sind bereits von Pick und Levaditi (Dies. Handb.) ausführlich beschrieben worden. Meist werden Exsudatleukocyten benutzt. Aus dem Exsudat ist die Flüssigkeit durch Zentrifugieren und Waschen des Bodensatzes mit Kochsalzlösung sorgfältig zu entfernen; die Anwesenheit von Exsudatflüssigkeit kann infolge ihres Komplementgehalts das Versuchsresultat wesentlich beeinflussen.

Die Leukocyten sind bei Anwendung des bakteriziden Plattenversuches nicht lebend zu untersuchen, da der Versuch dann durch das Auftreten der Phagocytose beeinflußt wird. Sie werden nach Buchner (Münchener med. Wochenschr. 1895, Heft 24 u. 25. Siehe auch Pick, dieses Handbuch, Bd. I) durch Einfrieren getötet. Bail wendet das von Staphylokokken in der Pleurahöhle erzeugte Leukocidin zur Abtötung der Leukocyten an (Berliner klin. Wochenschr. 1897, Nr. 41). Meist ist mit der Abtötung eine Extraktion verbunden. Nach dem Vorgang Buchners (l. c.) läßt man die Leukocyten mit Hilfe einer Kältemischung gefrieren, bringt sie zum raschen Auftauen in den Brutschrank, zerschüttelt oder zerteilt die Klumpen mit einem Glasstab und wiederholt das Einfrieren und Auftauen mehrmals. Bei der Auflösung der Leukocyten durch Leukocidin treten nach Bail ebenfalls die bakteriziden Substanzen der Leukocyten in die Flüssigkeit über. Die entstehende Suspension wird entweder im ganzen untersucht oder vorher durch Zentrifugieren von allen körperlichen Bestandteilen befreit. Latschenko (Archiv für Hyg. 1900, Bd. XXXVII), Gruber und Futaki (Münchener med. Wochenschrift 1907, pag. 249), Schneider (Münch. med. Wochenschr. 1908, pag. 499) extrahieren lebende Leukocyten mit Serum, Gewebs- oder Oedemflüssigkeit und zentrifugieren dann die Zellen wieder ab. Zum exakten Nachweis der Anwesenheit von Komplement in den Leukocytenextrakten ist die Heranziehung des Komplettierungsversuchs unbedingt erforderlich (s. oben), ferner die Untersuchung, ob die etwa gefundenen bakteriziden Stoffe in allen ihren sonstigen Eigenschaften den Charakter der Komplemente tragen. Dies ist vielfach nicht der Fall (s. S. 452).

Die morphologische Beobachtung des Bakterienzerfalls in den lebenden Leukocyten ist seit langem von der französischen Schule zur Untersuchung der vorliegenden Frage benutzt worden. Ein sicheres Urteil ist jedoch nur möglich, wenn die Einwirkung des Serumkomplements auf die Bakterien dabei ausgeschaltet ist. Wenn man die Phago-

cytose im aktiven Serum sich abspielen läßt, so kann das vor der Phagocytose aus dem Serum von den Bakterien aufgenommene Komplement auch weiterhin in den Phagocyten seine Wirkung entfalten. Die Versuche sind daher so anzustellen, daß die Leukocyten in einer komplementfreien Flüssigkeit (Kochsalzlösung, inaktiviertes Serum) mit den Bakterien zusammengebracht werden. Lambotte u. Stiennon, die sensibilisierte Choleravibrionen mit Leukocyten in Kochsalzlösung aufschwemmen (Centralbl. f. Bakt., Bd. XL, Heft 2—4) finden, daß dann die intrazelluläre Bakterienauflösung unter einem anderen Bilde verläuft. Die Bakterien zerfallen nicht rasch in die typischen Granula, sondern bekommen nur allmählich ein gekörntes Aussehen und werden weniger gut färbbar. Der Versuch spricht also nicht für die Anwesenheit von Komplement in den Leukocyten.

Auf indirektem Wege ist die Lösung der Frage versucht worden, indem geprüft wurde, ob und inwieweit der Gehalt des Serums an Komplement von dem Leukocytenreichtum des Blutes abhängt. Eine Leukocytenverminderung erreichte Bordet (Ann. de l'Inst. Pasteur, Tome IX, pag. 462) durch intravenöse Injektion von Karmin. $^1/_{10}$ ccm Karminemulsion (50 cg auf 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung) wurde einem Meerschweinchen in die Jugularis gespritzt. Nach 2 Stunden war die Leukocytenzahl von 11 000 auf 3000 pro cmm gefallen. Bordet fand bei dieser Leukopenie eine geringe Verminderung der Serumbakterizidie. Durch Bakterieninjektion wird ebenfalls zunächst eine Leukocytenverminderung hervorgerufen, auf die nach einigen Stunden eine Leukocytose folgt. Die bakterizide Kraft des Serums in diesem Stadium soll erhöht sein. Eine Leukocytose ist auch zu erzielen durch Injektion von Spermin (Pfeiffer u. Marx, Zeitschr. f. Hyg., Bd. XXVII, pag. 272), Pepton u. a.

Bei derartigen Versuchen ist nicht außer acht zu lassen, daß sehr wohl die gleiche Ursache im Organismus zwei von einander unabhängige Wirkungen haben kann, es braucht ein höherer Komplementgehalt nicht die Folge eines stärkeren Leukocytenreichtums zu sein, sondern kann diesem eventuell koordiniert sein.

Wenn die Komplemente aus den Leukocyten abgegeben werden, so läge es nahe, daß Körperflüssigkeiten, die mit großen Leukocytenmengen in Berührung gewesen sind, besonders reich an Komplement sind, daß andere Flüssigkeiten, die kaum oder gar nicht mit Leukocyten zusammen gekommen sind, sehr wenig Komplement enthalten. So hat man die bakterizide Kraft der von den Leukocyten befreiten Exsudatflüssigkeit mit der des Blutserums verglichen (Lambotte u. Stiennon, l. c.), andererseits das Kammerwasser, das subkutane Ödem auf seinen Komplementgehalt in vitro bzw. auf sein Auflösungsvermögen im Organismus geprüft (s. oben). Wenn diese Flüssigkeiten meist schwächer bakterizid wirken als das Serum, so ist nicht außer acht zu lassen, daß auch in anderer Beziehung weitgehende Unterschiede gegenüber dem Serum bestehen, die wohl bedeutungsvoller für die Bakterizidie sind als die Beziehungen zu den Leukocyten. Der Eiweißgehalt dieser Flüssigkeiten ist recht schwankend und meist viel geringer als der des Serums (Strauss u. Wolff, Fortschr. d. Medizin 1902, pag. 1). In der Annahme, daß die Leukocyten gerade beim Gerinnungsprozeß besonders leicht Komplement abgeben, kam man dazu, die bakterizide Kraft des Plasmas mit der des Serums zu vergleichen. Die Methoden zur Plasmagewinnung sind ebenfalls bereits angegeben (s. pag. 446). Auf die Resultate dieser Untersuchungen ist bereits früher kurz hingewiesen

worden. Nach allen bisher vorliegenden Untersuchungen kann die Abstammung der Komplemente aus den Leukocyten nicht als sicher erwiesen angesehen werden.

Die Untersuchung bestimmter Organe auf ihren Komplementgehalt erfolgt in ganz ähnlicher Weise. Die Organe werden nach sorgfältiger Entblutung des Tieres herausgenommen, zerkleinert und extrahiert (vgl. oben Nachweis der Ambozeptoren in den Organen pag. 431). Die Extrakte werden in derselben Weise wie die Leukocytenextrakte untersucht (Bail u. Pettersson, l. c., Ascher, l. c.).

Um einen Aufschluß über die Bildungsstätte der normalen bakteriziden Substanzen zu erhalten, entnimmt Löwit Kaninchenblut aus verschiedenen Gefäßprovinzen und vergleicht die bakterizide Kraft der hieraus gewonnenen Sera an Typhus-, Cholera- und Milzbrandbazillen im bakteriziden Plattenversuch. Die Serumdosis wählt er so, daß sich eben noch eine deutliche Abtötung zeigt; Unterschiede in der Wirksamkeit der Sera verschiedener Herkunft können so am ersten hervortreten. An dem aufgebundenen Tier werden die Art. und Vena femoral., die Carotis und die Jugularis frei präpariert und dann aus jedem der Gefäße rasch nacheinander ca. 15—20 ccm Blut entnommen. Die Unterschiede des bakteriziden Vermögens, die die Sera verschiedener Herkunft geben, sind nur gering, immerhin glaubt Löwit die Methode verwerten zu können (Centralbl. für Bakt., Bd. XLIII, Heft 3).

Bakterizide Körpersubstanzen nicht komplementärer Natur.

Die Möglichkeit, daß es neben den komplex zusammengesetzten Bakteriolysinen des normalen Serums vielleicht noch andere „einheitliche" Alexine gebe, ist von Gruber dauernd vertreten worden. Nach den Untersuchungen Pirennes (Centralbl. f. Bakt., Bd. XXXVI, Nr. 2, 3 u. 5) trifft dies zu für die milzbrandfeindliche Substanz des Rattenserums. Bereits Behring und Nissen (Zeitschr. für Hyg., Bd. VIII, pag. 412) hatten auf die wesentliche Verschiedenheit dieser Substanz von den sonst bekannten „Alexinen" aufmerksam gemacht. Nach Pirenne unterscheiden sich die gegenüber Milzbrandbazillen, Bac. megaterium, Bac. mycoides wirksamen Stoffe des Rattenserums von den gegenüber Choleravibrionen wirksamen Komplementen in folgender Hinsicht:

1. Sie sind thermostabil.
2. Sie behalten ihre volle Wirksamkeit auch bei längerer Aufbewahrung.
3. Sie passieren Chamberlandkerzen.
4. Sie werden durch Neutralisation des Serums mit Säure zerstört (Behring). Eine nachfolgende Alkalisierung stellt die bakterizide Wirkung nicht wieder her.
5. Sie werden von sensibilisierten Erythrocyten nicht absorbiert.
6. Sie werden durch Antikomplementserum nicht unwirksam gemacht.
7. Sie werden durch Licht nicht abgeschwächt.
8. Sie töten die Bakterien auch bei 0° ab.
9. Sie sind enthalten im Kammerwasser, in der Milz und anderen Organen der Ratte, die frei von Komplement sind.
10. Sie wirken nicht mit Hilfe von Ambozeptoren. Das Rattenserum enthält nach Pirenne keine Ambozeptoren für Milzbrand. Der Bordet-Gengousche Versuch der Komplementbindung fällt negativ aus (als Prüfungsobjekt für die Komplementabsorption wurden sensibilisierte Choleravibrionen benutzt).

Nach Gruber und Futaki (Münchener med. Wochenschr. 1907, pag. 249) ist das blutplättchenfreie Plasma des Kaninchens und der Ratte wirkungslos gegen Anthrax, während es Komplement gegenüber anderen Bakterien enthält. Das „Anthracocidin“ stammt aus den Blutplättchen, die es beim Kontakt mit Plasma, Serum, Ödemflüssigkeit abgeben. Diese bakterizide Substanz der Blutplättchen ist wirkungslos gegen andere Bakterien.

Die Feststellungen mahnen für die Komplementfrage alle jenen Untersuchungen mit Vorsicht zu verwerten, in denen die bakterizide Kraft des Serums am Milzbrandbazillus oder ähnlichen Bakterien geprüft ist. Auch die aus den Leukocyten zu gewinnenden bakteriziden Stoffe (s. weiter oben) unterscheiden sich zum Teil nach Schattenfroh (Arch. f. Hyg., Bd. XXXI u. XXXV), Bail (Berl. klin. Wochenschrift 1897, Nr. 41 und 1898, Nr. 22), Löwit (Zieglers Beiträge, Bd. XXII). Däubler (Centralbl. f Bakt., I. Abt., Bd. XXV, pag. 129) in ikren Eigenschaften von den Komplementen. Sie sind (teilweise) thermostabil. Sie wirken unabhängig vom Salzgehalt der umgebenden Flüssigkeit (Schattenfroh). Sie wirken — auch bei Anwesenheit von hämolytischen Ambozeptoren — nicht hämolytisch (Tarassevitch, Annales de l'Inst. Pasteur, Tome XVI — Landsteiner, Centralbl. f. Bakt., I. Abt. 1899, Bd. XXV, pag. 546 — Gruber, Münch. med. Wochenschr. 1901, pag. 1967). Sie wirken häufig nicht auf Typhus- und Cholerabazillen, während sie im Gegensatz zum Serum auf Staphylokokken stark wirken (Schattenfroh, l. c.).

Antikomplemente.

Wenn man einem Tier aktives normales Serum einer andern Tierart einspritzt. so erhält man, wie erwähnt, ein Antiserum, das die Wirkung des Komplements im Organismus uud im Reagenzglase aufhebt. Ob es sich aber hier um ein echtes „Antikomplement“ handelt, d. h. um einen Antikörper, der gegen die bindende Gruppe des Komplements gerichtet ist, ist durch die Untersuchungen von Moreschi (Berl. klin. Wochenschr. 1905, Nr. 37 und ebenda 1906, Nr. 4) und Gay (Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXIX, Heft 5) zweifelhaft geworden. Wenn ein beliebiges aktives oder inaktives Serum — selbst in kleinsten Mengen — mit einem durch Injektion dieses Serums erzeugten Antiserum zusammentrifft, so wird gleichzeitig vorhandenes Komplement unwirksam gemacht. Wird z. B. aktives Meerschweinchenserum, dem etwas Kaninchenserum beigemengt ist, mit Antikaninchenserum versetzt, so wird dabei das Komplement des Meerschweinchenserums gebunden. Wenn beim Zusammentreffen eines Serums mit seinem Antiserum ein Präzipitat entsteht, so hat auch dieses, selbst nachdem es abzentrifugiert und gewaschen ist, die Fähigkeit, das Komplement zu absorbieren. Alle bisher vorliegenden Erfahrungen über Antikomplemente lassen sich ungezwungen auf diese Erscheinung zurückführen, so daß die Existenz echter Antikomplemente bisher nicht als sicher erwiesen gelten kann. Nähere Ausführungen über die Theorie der Komplementbindung finden sich bei Sachs, Dies. Handbuch, Bd. II.

Antiambozeptoren.

Auf die Untersuchungen über Antiambozeptoren haben Moreschis Entdeckungen ebenfalls einen sehr wesentlichen Einfluß gehabt. Sie haben zum mindesten gezeigt, daß es ganz besonderer Vorsichtsmaßregeln

bedarf, um sich vor Täuschungen durch das Phänomen der Komplementbindung zu schützen.

Sera, die die Wirkung der Ambozeptoren aufheben, erhält man, wenn man einem Tiere ein spezifisches Immunserum einer anderen Tierart ein oder mehrere Male injiziert (Pfeiffer und Friedberger, Berl. klin. Wochenschr. 1902, pag. 4). Auch durch Injektion normalen Serums lassen sich Sera der gleichen Eigenschaft gewinnen (Pfeiffer und Friedberger, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIV, pag. 70). Pfeiffer und Friedberger (Ebenda, Bd. XXXVII, pag. 138) zeigten, daß diese „antiambozeptorhaltigen Sera“ nicht nur die Wirkung der zur Immunisierung benutzten Ambozeptoren, sondern aller Ambozeptoren der gleichen Tierart aufheben. Ein antibakteriolytisches Kaninchenserum, das durch Injektion eines Ziegen-Choleraserums gewonnen war, wirkte hemmend nicht nur gegen dieses, sondern auch gegen ein Ziegen-Typhusserum.

Die ersten Versuche über Antiambozeptoren wurden in folgender Weise angestellt.

Läßt man Ambozeptorserum und Antiambozeptorserum einige Zeit in Kontakt, fügt dann die homologen Bakterien hinzu und injiziert diese Mischung in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens, so bleibt die Bakteriolyse bei geeigneten Mengenverhältnissen aus.

Wie Pfeiffer und Moreschi (Berliner klin. Wochenschrift 1906, pag. 33) später zeigten, läßt dieser Versuch verschiedenartige Erklärungen zu. Die Hemmung kann auch durch Komplementbindung hervorgerufen sein. Bei der Gewinnung des „Antiambozeptorserums“ haben sich Antikörper gegen das injizierte Eiweiß gebildet. Wenn nun das Ambozeptorserum und das Antiambozeptorserum zusammentreffen, so wirkt die entstehende Antigen-Antikörper-Verbindung komplementbindend, die Bakteriolyse kann durch Mangel an verfügbarem Komplement gehemmt werden, braucht nicht auf eine Antiambozeptorwirkung bezogen zu werden. Auch ein bereits ausgefallenes Präzipitat kann noch das Komplement binden, der Versuch ist also nur dann beweisend, wenn Vorsorge getroffen ist, daß das Ambozeptorserum und das Antiambozeptorserum überhaupt nicht zusammentreffen.

Diese erwähnte Fehlerquelle ist bei einer anderen Versuchsanordnung von Pfeiffer und Friedberger (Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVII, pag. 138) vermieden. Der Versuch sei ausführlicher mitgeteilt:

Als Ambozeptorserum dient ein Choleraziegenserum vom Titer $^1/_{10}$ mg, als Antiambozeptorserum das Serum eines Kaninchens, das mit dem Choleraziegenserum vorbehandelt ist. Die Cholerakultur hat eine Virulenz von $^1/_{10}$ Öse.

20 mg des Choleraziegenserums = 300 I.-E. wurden in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und mit 5 Ösen frischer lebender vollvirulenter Cholera versetzt. Die so erhaltene Vibrionenemulsion wurde 50 Minuten bei 0° gehalten, dann auszentrifugiert. Der Niederschlag wurde 4 mal in je 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschüttelt, dadurch gründlich ausgewaschen und dann wieder abzentrifugiert, um auch die letzten Spuren des Serums zu entfernen, und dann in 6 ccm physiologischer Kochsalzlösung durch längeres Schütteln möglichst gleichmäßig verteilt. Unter der Annahme, daß sämtliche Choleraambozeptoren gebunden waren, was wohl nicht in vollem Umfang zutrifft, war die obere Grenze des Immunkörpergehaltes pro ccm der Emulsion 50 I.-E.

Eine abgemessene Menge der so gewonnenen Emulsion wurde mit wechselnden Mengen des Antiserums gemischt, denn wurden in jedem

Versuche $^2/_3$ Ösen lebender hochvirulenter Cholerabakterien in der Mischung verrieben und Meerschweinchen von 200 g Körpergewicht injiziert.

Wie bereits früher erwähnt, werden bei der Bakteriolyse ambozeptorbeladener Vibrionen in der Bauchhöhle die Ambozeptoren wieder frei und können zur Bakteriolyse neu zugesetzter Choleravibrionen verwandt werden. Bei Anwesenheit von Antiambozeptorserum bleibt jedoch die Bakteriolyse aus, wie aus dem Protokoll ersichtlich ist.

Grenzzahl der I.-E. des Choleraziegenserums, an Vibrionen gebunden	Dosis des Antiserums	Infektionsdosis	Resultat	Bemerkungen
10 I.-E. . .	3 mg	$^2/_3$ Öse	lebt	Nach 2 Stunden gleichviel Granula und Vibrionen. Folgenden Tag Prozeß abgelaufen.
10 I.-E. . .	5 „	„	†	Massenhaft Vibrionen in Reinkultur.
10 I.-E. . .	10 „	„	†	„ „ „ „
Kontrollversuche:				
10 I.-E. . .	—	$^2/_3$ Öse	lebt	1 Stunde nach der Infektion nur Granula.
5 I.-E. . .	—	„	„	2 Stunden nach der Infektion abgelaufen.

Die Versuchsanordnung ist so gewählt, daß in dem Augenblick, wo das Antiambozeptorserum zugesetzt wird, freies Ambozeptorserum nicht mehr anwesend ist. Eine Präzipitation bzw. Komplementbindung ist daher nicht wahrscheinlich.

Der Versuch spricht für die Wirkung echter Antiambozeptoren.

Die Untersuchungen über den Angriffspunkt der Antiambozeptoren, also über die Frage, ob es sich um cytophile oder komplementophile oder an noch anderer Stelle angreifende Antikörper handelt, haben noch nicht zu einer einheitlichen Auffassung geführt. Da die Erfahrungen hierüber zum großen Teil an Hämolysinen gewonnen sind, und die hier angewandten Methoden für Bakteriolyse und Hämolyse im Wesentlichen übereinstimmen, so seien nur die in Betracht kommenden Arbeiten kurz angeführt. Im übrigen wird auf den Aufsatz von Sachs über hämolytische Technik verwiesen*).

Bei Besprechung der Antikomplemente und Antiambozeptoren seien auch die „antibakteriolytischen antagonistischen Substanzen normaler Sera“ von Pfeiffer und Friedberger (Deutsche med. Wochenschrift 1905, pag. 6) erwähnt. Diese kommen erst zur Geltung, wenn normale Sera einige Zeit mit Bakterien in Berührung gewesen und dann von diesen wieder getrennt worden sind. Das so vorbehandelte Serum hemmt die Bakteriolyse, wenn es zusammen mit Bakterien der zur Absorption benutzten Art und dem spezifischen Immunserum Meerschweinchen intraperitoneal injiziert wird. Die Hemmung ist spezifisch gegen die zur Vorbehandlung benutzte Bakterienart gerichtet, erstreckt sich nicht auf andere; dagegen ist es für

*) **Literatur:** die genannten Arbeiten von Pfeiffer und Friedberger, ferner Friedberger und Moreschi, Berl. klin. Wochenschr. 1906, pag. 1031; Shibayama und Toyoda, Centralbl. für Bakteriol. 1906, Bd. XL.

die hemmende Wirkung gleichgültig, von welcher Tierart das Immunserum stammt. Im Einzelnen gestaltet sich nach PFEIFFER und FRIEDBERGER der Versuch folgendermaßen:

Ein aktives Normalserum (von Kaninchen, Ziegen oder Tauben, nicht von Meerschweinchen) wird mit einer abgemessenen Menge (etwa 1 Öse pro 1 ccm) einer bestimmten Bakterienart (Typhus oder Cholera) gemischt, nach einiger Zeit (10 Minuten oder länger) durch Zentrifugieren oder Filtrieren von den Bakterien wieder befreit. Die Versuchstemperatur kann zwischen 0 und 50° schwanken, die Bakterien können lebend oder tot sein. Das so vorbehandelte Serum wird nun mit einer genau bestimmten Menge des Immunserums, die eine oder einige I.-E. enthält, zusammengebracht und nach einiger Zeit, zusammen mit der für den PFEIFFERschen Versuch üblichen Bakteriendosis (1 Öse einer Kultur, deren dos. let. min. $^{1}/_{10}$ Öse betrug) einem Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. Die Bakteriolyse bleibt aus. 0,3 ccm, ausnahmsweise auch 0,1 ccm vorbehandeltes Normalserum genügen, um die Wirkung von 2 bis 3 I.-E. aufzuheben. Eine volle Einigung über die Wirkungsweise dieser antagonistischen Substanzen ist bisher nicht erzielt worden (vgl. den Aufsatz von SACHS über hämolytische Sera).

IV. Serumdiagnostik zu klinischen Zwecken.

Der Nachweis der bakteriolytischen Antikörper kann in der menschlichen Pathologie für die Diagnose einer bestehenden oder abgelaufenen Infektion von Bedeutung werden, ferner für die Beurteilung des Schutzes, der in einem Gesunden durch die künstliche Impfung erzeugt worden ist.

Bei dem Nachweis der immunisatorisch — durch die Krankheit oder durch die Vaccination — erzeugten Bakteriolysine kommen hier dieselben Methoden in Betracht wie sonst.

1. Der Tierversuch.
2. Der bakterizide Reagenzglasversuch bzw. der in vitro angestellte bakteriolytische Versuch.

1. Bereits vor Entdeckung des PFEIFFERschen Phänomens wurde der einfache Schutzversuch am Meerschweinchenperitoneum als diagnostisches Mittel, zur Erkennung des Typhus (STERN, Deutsche med. Wochenschr. 1892, Nr. 37. — CHANTEMESSE ET WIDAL, Ann. Past. 1892, Nov. — E. NEISSER, Zeitschr. f. klin. Medizin, Bd. XXIII) und der Cholera (LAZARUS, Berl. klin. Wochenschr. 1892, H. 43/44. — WASSERMANN, Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XIV. — PFEIFFER und WASSERMANN, Zeitschr. f. Hyg., Bd. XIV. — ISSAEFF, Zeitschr. f. Hyg., Bd. XVI) herangezogen. Eine genauere Gestaltung bekam diese diagnostische Methode, als ihr die Technik des typischen PFEIFFERschen Versuchs, die Beobachtung des bakteriolytischen Zerfalls in der Bauchhöhle von Meerschweinchen zugrunde gelegt wurde. Für die Technik gelten hier die Vorschriften, die früher ausführlich auseinandergesetzt sind.

Zur Beurteilung des Ausfalls ist die Kenntnis des Serumtiters normaler bezw. nicht an den betreffenden Krankheiten leidender Menschen notwendig. Ausgedehnte Erfahrungen sind hier besonders anläßlich der Schutzimpfungen gegen Cholera und Typhus gesammelt worden. Nach den übereinstimmenden Untersuchungen von LAZARUS (l. c.), KOLLE (D. m. W. 1897), SERKOWSKI (Centralbl. für Bakt. 41, pag. 255) ist der Titer des normalen Menschenserums gegen Cholera im PFEIFFERschen

Versuch größer als 0,5 ccm. Nach Serkowski (l. c.) beginnt der Titeranstieg bei cholerainfizierten Menschen am 14.—20. Tage, erreicht sein Maximum in der 4.—5. Woche, um nach 2—3 Monaten wieder zu verschwinden.

Der Titer des normalen Menschenserums gegen Typhus liegt oberhalb 0,05 ccm, geht nur ganz ausnahmsweise auf 0,05 ccm herunter (Pfeiffer und Kolle, Zeitschr. f. Hyg., Bd. XXI. — Gaffky, Kolle, Hetsch, Kutscher, Klin. Jahrb. 1905. — Töpfer u. Jaffé, Zeitschr. f. Hyg., Bd. LII).

Der durch den Pfeifferschen Versuch festzustellende Serumtiter ist bei Typhus- und Paratyphuspatienten während der Erkrankung nur wenig oder gar nicht gesteigert und nimmt erst gegen Ende der Erkrankung und in der Rekonvaleszenz höhere Werte an, um dann im Verlauf von Monaten wieder allmählich abzufallen (Pfeiffer und Kolle l. c. — Töpfer und Jaffé l. c.). Sowohl bei Typhus- und Paratyphus-, wie bei Choleraerkrankungen kommt der Pfeiffersche Versuch also mehr zum Nachweis abgelaufener als noch bestehender Erkrankungen in Betracht. Die amtliche Vorschrift über den serologischen Nachweis abgelaufener Cholerafälle ist bereits pag. 377 wiedergegeben worden.

Von Wichtigkeit können derartige Untersuchungen werden, um Aufschluß über die Ausbreitungsweise einer Epidemie zu erhalten. Es können mit Hilfe des Pfeifferschen Versuchs auch „Bazillenzwischenträger" entdeckt werden, die selbst nicht Krankheitserscheinungen dargeboten, die Seuche aber weiter verschleppt haben. (Friedberger, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XL).

Ueber das Verhalten des Serumtiters an Vaccinierten sind bereits an früherer Stelle Mitteilungen gemacht worden.

2. Der bakterizide Reagenzglasversuch ist zu klinisch-diagnostischen Zwecken in ausgdehnterem Maße von Stern und Korte (Berl. klin. Wochenschr. 1904, Nr. 9) benutzt worden. Ihre Technik schließt sich an die von M. Neisser und Wechsberg gegebenen Vorschriften an, in einzelnen Punkten weicht sie mit Rücksicht auf den speziellen Zweck ab. Das Blut wurde meist aus der mit Alkohol und Aether gereinigten Fingerkuppe, gelegentlich aus der Armvene entnommen und in sterilen Zentrifugengläsern aufgefangen. Es bedarf nur sehr kleiner Blutmengen, etwa 0,2—0,5 ccm, da die Bakterizidie, wenn sie diagnostische Schlüsse erlauben soll, noch in sehr hoher Verdünnung zur Geltung kommen muß. Nach Eintritt der Gerinnung wird der Blutkuchen mit der Platinnadel vom Glase abgelöst, um die Abscheidung des Serums zu beschleunigen. Das durch Zentrifugierung geklärte, dann mit steriler Pipette abgehobene Serum wird im Verhältnis 1:10 verdünnt, diese Verdünnung bei 56° $^1/_2$ Stunde inaktiviert. Zur Einsaat wird $^1/_2$ ccm einer Aufschwemmung benutzt, die durch Verdünnung einer 24stündigen Bouillonkultur mit 2%iger Wittepeptonbouillon im Verhältnis 1:5000 hergestellt ist. Stern und Korte arbeiten also mit geringeren Bakterienmengen als Neisser und Wechsberg, brauchen dementsprechend auch weniger Komplement, gießen andererseits nach der Bebrütung den gesamten Röhreninhalt zu Platten aus. Als Komplement dient meist statt normalen Menschenserums das leichter zu beschaffende normale Kaninchenserum. Die für einen Versuch benötigte Menge kann aus der Ohrvene entnommen werden ohne Tötung des Tieres. Die Komplementmenge ist so zu bemessen, daß sie im Kontrollversuch für sich ohne Immunserum zwar eine etwas kleinere Bakterienzahl ergiebt,

als die ohne jedes Serum 3 Stunden im Brutschrank gehaltene Kontrolle, aber doch eine Vermehrung gegenüber der bei Beginn des Versuches gegossenen Kontrollplatte erkennen läßt. $^1/_2$ cc einer Verdünnung 1:12 bis 1:16 ist im allgemeinen zweckmäßig. Die Mischungen werden in der oben geschilderten Weise angesetzt, zu 1 ccm der Verdünnung des Serums kommen $^1/_2$ ccm Kulturverdünnung und $^1/_2$ ccm Komplementverdünnung; die gesamte Serumkulturmischung wird nach dreistündigem Aufenthalt im Brutschrank zu Platten ausgegossen, die Beurteilung der Platten erfolgt schon nach 12 Stunden.

Als Titer des zu prüfenden Serums wird diejenige Serumverdünnung angesehen, die gegenüber der ohne Sera angesetzten und 3 Stunden bei 37° gehaltenen Kontrolle eben noch eine deutliche Keimverminderung erkennen läßt.

Für die Beurteilung des Versuchsergebnisses kommen folgende Momente in Betracht.

Das Serum gesunder oder kranker aber nicht an Typhus leidender Menschen hat in der Mehrzahl der Fälle einen Titer unter 40—80, es kommen aber auch sehr viel höhere Werte bis 1000 und sogar 10000 vor. Nach HAHNS (Deutsch. Arch. für klin. Med., Bd. LXXXII) Zusammenstellung hatten von 100 Gesunden bzw. Nichttyphösen

77	einen Titer	unter	100		
9	„ „	zwischen	100	und	1 000
14	„ „	„	1000	„	10 000.

Beziehungen zwischen der Höhe des bakteriziden Titers und bestimmten nicht typhösen Krankheiten sind bisher nicht bekannt.

Im Serum Typhuskranker läßt sich die bakterizide Reaktion meist in bedeutend höherer, oft bis millionenfacher Verdünnung nachweisen.

Nach der Zusammenstellung von KORTE und STEINBERG (Deutsch. Arch. für klin. Med., Bd. LXXXII), die über 104 nicht typhöse und 60 Typhusfälle berichten, lag der bakterizide Titer

						bei Nicht-typhösen %	bei Typhus-kranken %
unter	100			in . . .		74	0,0
zwischen	100	und	1 000	„ . . .		8,6	3,3
„	1 000	„	10 000	„ . . .		15,4	15,1
„	10 000	„	100 000	„ . . .		2,0	23,3
über	100 000			„ . . .		0,0	58,3

Nur höhere Werte sind also für die Typhusdiagnose zu verwerten, eine bestimmte Grenze, von der ab Typhus mit Sicherheit angenommen werden müßte, besteht nicht; je höher der Titer ist, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit der spezifischen Infektion. Ein geringerer Titer spricht nicht unbedingt gegen Typhus (vergl. auch BRION und KAYSER, Deutsch. Arch. für klin. Med. Bd. LXXXV, pag. 541).

Der bakterizide Titer ist unabhängig von Agglutinationstiter, er weist gelegentlich auf eine Typhusinfektion, wenn der Agglutinationsversuch negativ ausfällt.

Beziehungen zwischen Höhe des bakteriziden Titers und Schwere der Infektion waren nicht nachweisbar. Auch bei hohem bakteriziden Titer können Rezidive auftreten.

Gegen Ende der Erkrankung oder in der Rekonvaleszenz pflegt der Titer zu sinken, das Serum von Menschen, die vor längerer Zeit

Typhus überstanden haben, zeigt meist nur niedrige Werte. Gruppenreaktionen scheinen vorzukommen.

Laubenheimer (Zeitschr. für klin. Med., Bd. LVI, pag. 170) beobachtete, daß das Serum eines Typhuspatienten, das Typhusbazillen nicht abtötete, bakterizid auf die Bazillen des Paratyphus A wirkte.

Der diagnostische Wert, der der Prüfung der Bakterizidie im Plattenversuch zukommt, wird leider durch die Anforderungen, die an Zeit und Übung des Untersuchers gestellt werden, beeinträchtigt. In wichtigen zweifelhaften Fällen ist seine Heranziehung zur Diagnose immerhin wünschenswert und giebt gelegentlich diagnostische Aufschlüsse, wenn alle anderen Methoden versagen. (Brion und Kayser l. c.).

Für die Diagnose des Paratyphus ist nach den Untersuchungen von Töpfer und Jaffé der bakterizide Reagenzglasversuch nicht zu verwerten; eine Serumbakterizidie läßt sich, wie oben erwähnt, nach diesen Untersuchungen den Paratyphusbazillen gegenüber in vitro nicht nachweisen.

Laubenheimer (l. c.) berichtet dagegen über 3 Fälle von Paratyphus B, in denen sämtlich ein höheres bakterizides Vermögen (bis zu Verdünnungen 1:500000) nachzuweisen war. Normalserum wirkt nicht bakterizid. Der Versuch wurde in der üblichen Weise ausgeführt, als Komplement diente Kaninchenserum. Die Einwirkungszeit betrug nur $^1/_2$ Stunde.

Auch zur Prüfung des Vaccinationserfolges ist der bakterizide Reagenzglasversuch wiederholt benutzt worden. (Wright, Kurze Abhandlung über Antityphusinokulationen, Jena, Fischer 1906. — Serkowski, Centralbl. für Bakteriol., Bd. XLI, pag. 255.)

V. Therapeutische Anwendung bakteriolytischer Sera.

Bei der Bewertung der Cholera-, Typhus-, Paratyphus- und Dysenteriesera für therapeutische Zwecke kommen außer ihrer bakteriolytischen noch andere schützende Wirkungen, vor allem antitoxischer Natur, in Betracht. Die Besprechung der praktischen Resultate ist deshalb an anderer Stelle gegeben.

Hier seien nur die Punkte zusammengestellt, die für die Beurteilung der therapeutischen Anwendbarkeit eines rein bakteriolytischen Serums maßgebend sind.

Es ist bereits früher der Unterschied zwischen „Schutz"- und „Heil"-Versuchen hervorgehoben worden. Im Schutzversuch wird der Organismus im Augenblick der Infektion oder bereits vorher mit dem schützenden Serum versehen, im Heilversuch handelt es sich darum, einen Organismus, in dem es bereits zur Vermehrung der injizierten Keime gekommen ist, von der Erkrankung zu heilen. Es bedarf durchweg bedeutend größerer Serumdosen in diesem zweiten Falle. Ist die Bakterienvermehrung bereits bis zu einem gewissen Punkte vorgeschritten, so sind auch die größten Serumdosen wirkungslos.

R. Pfeiffer (Zeitschr. für Hygiene, Bd. XVIII, pag. 1) injizierte einem Meerschweinchen intraperitoneal 1 Öse virulenter Choleravibrionen, $^1/_2$ Stunde später — ebenfalls intraperitoneal — 0,02 g eines Anticholeraserums vom Titer 1—3 mg. Die Vibrionen wurden völlig gelöst, das Tier blieb am Leben. Als Pfeiffer die infizierende Dosis auf $^1/_4$ Öse herabsetzte, das Serum (0,02 g) aber erst $1^1/_2$ Stunde nach der Infektion gab, starb das Tier, obwohl die Vibrionen noch

völlig aufgelöst wurden; es erlag der Wirkung der Choleraendotoxine, die bei der Auflösung der mittlerweile stark vermehrten Vibrionen frei wurden. Wurde der Abstand zwischen Infektion und Serumgabe noch größer gewählt, so waren auch die größten Mengen Serum nicht imstande, die Bakteriolyse und Heilung herbeizuführen. $2^1/_2$ Stunden nach der Infektion mit 1 Öse Cholera injizierte PFEIFFER 0,05 g Anticholeraserum, eine weitere halbe Stunde später nochmals 0,2 g Serum. Die Bakteriolyse blieb aber unvollständig und das Tier starb.

Die Wichtigkeit des Injektionsortes ist ebenfalls bereits hervorgehoben werden. Werden Serum und Bakterien an verschiedenen Stellen des Organismus injiziert — wie es den natürlichen Bedingungen entspricht — so ist die zum Schutze bzw. zur Heilung erforderliche Serumdosis größer als bei gemeinsamer Injektion, wo das Serum sofort in seiner genzen Menge auf die Bakterien einwirken kann.

Die intraperitoneale Infektion läßt sich durch bakteriolytische Sera am leichtesten günstig beeinflussen. Bei intravenöser Infektion werden die Bakterien, soweit sie nicht sofort im zirkulierenden Blut zerstört werden, in den Kapillaren der inneren Organe abgelagert und unterliegen hier sehr viel schwerer der Serumwirkung. BAIL (Archiv für Hygiene 1905, Bd. LII, pag. 272) injizierte intravenös Kaninchen gleichzeitig oder nach einander Immunserum und Bakterien. Nach einiger Zeit wird das Tier durch Entbluten getötet und das Blut, wie die Organe, auf ihren Keimgehalt geprüft. Von den Organen werden möglichst gleich große Stücke steril entnommen — die Größenabschätzung macht BAIL meist nach Augenmaß — in 5 ccm Kochsalzlösung in steriler Reibschale zerrieben, und durch ein feines steriles Drahtsieb gepreßt. Sowohl die Reibschale wie das Drahtnetz werden mit je 5 ccm NaCl-Lösung nachgespült. Von der Gesamtflüssigkeit wird 1 ccm zur Platte verarbeitet. Die Fehler dieser Methode sind natürlich sehr groß, nur große und konstante Differenzen können zu Schlüssen verwertet werden. Als Kontrollen dienen Tiere, die die gleiche Bakteriendosis ohne Serum intravenös erhalten haben. Nach BAIL werden bei der Typhusinfektion die Bakterien in den Organen der Serumtiere kaum stärker abgetötet als in denen der Kontrolltiere. Choleravibrionen verschwinden sowohl bei passiv immunisierten wie normalen Kaninchen sehr rasch.

Bei Injektion von Choleravibrionen mit bzw. ohne Immunserum ins Herz von Meerschweinchen, werden die Keime in den Organen unter Mitwirkung des Serums viel rascher abgetötet als in den Normaltieren.

Der zeitliche Ablauf der Serumwirkung auf die Bakterien wird nach BAIL studiert, indem ein Tier, das mit Serum + Kultur injiziert worden ist, sofort nach der Infektion getötet wird, ein anderes, ebenso vorbehandeltes, mehrere Stunden später. Der Keimgehalt der Organe und des Blutes zu diesen verschiedenen Zeitpunkten wird verglichen. BAIL findet 3 Stunden nach der Injektion von Typhusbazillen + Serum noch massenhaft lebende Bazillen in den Organen, kaum weniger, als wenn einem Normaltier Typhusbazillen intravenös injiziert werden.

In einer anderen Versuchsreihe spritzt BAIL eine Mischung von Vibrionen und Immunserum direkt in die Niere eines lebenden Kaninchens oder Meerschweinchens und bestimmt nach einigen Stunden den Keimgehalt dieser Niere.

Durch die sich dabei einstellenden Gewebszertrümmerungen werden allerdings Verhältnisse geschaffen, die den normalen sehr wenig entsprechen.

Wenn auch die Bailschen Versuche dartun, daß die Wirksamkeit bakteriolytischer Sera im Organismus begrenzt ist, so geht er doch zu weit, wenn er nach seinen Versuchen diese — wenigstens für Typhus — fast völlig leugnet. Friedberger (Centralbl. für Bakt., Bd. XLIV, pag. 32) hebt mit Recht hervor, daß die Infektionsdosen in den Typhusversuchen so groß gewählt waren, daß eine völlige Abtötung nicht zu erwarten war; auch seien die Tiere zum Teil zu früh getötet worden. Die größere Widerstandsfähigkeit der Bakterien im Innern von Organen mag an der Komplementbindung durch die Organzellen liegen; zum Teil ist die Ursache wohl auch darin zu suchen, daß die Serumstoffe hier weniger frei zutreten können, wie im Reagenzglas oder in der Bauchhöhle. Schon Buchner (Centralbl. für Bakt., Bd. X, pag. 708 u. 727. — Archiv für Hygiene, Bd. XVII) wies darauf hin, daß Bakterien im Innern eines sterilen Wattebäuschchens sehr viel schwerer im Reagenzglase durch Blut oder Serum abgetötet werden, als wenn sie frei im Serum verteilt sind.

Für die Wirkung des injizierten bakteriolytischen Serums ist erforderlich, daß die Komplemente des betreffenden Organismus zu den injizierten Ambozeptoren „passen". Bei der Besprechung des bakteriziden Plattenversuches ist dieser Umstand bereits erwähnt worden. Ein Versuch Wechsbergs (Zeitschr. für Hygiene 1902, Bd. XXXIX) zeigt die Wichtigkeit dieser Forderung.

Taubenserum enthält, wie sich im Reagenzglasversuch leicht nachweisen läßt, kein Komplement für die immunisatorisch erzeugten Ambozeptoren des Kaninchens gegen den Vibrio Metschnikoff. Wird einer Taube eine (für sich allein tötliche) Dosis des Vibrio Metschnikoff in den einen Musc. pectoralis injiziert und in den anderen Pectoralis das erwähnte Kaninchenimmunserum, so vermag dieses nicht zur Geltung zu kommen, die Taube stirbt. Wenn aber gleichzeitig mit dem Immunserum normales aktives Kaninchenserum injiziert wird, bleibt die Taube am Leben, da jetzt passendes Komplement zur Verfügung steht.

Nummer des Versuchstieres	Menge der Kultur von Vibrio Metschnikoff injiziert in den rechten Brustmuskel	Menge des Immunserums inaktiv.	Menge des norm. aktiv. Kaninchenserums	Resultat	Bemerkungen
		injiziert in den linken Brustmuskel			
Taube 1	$^1/_{20}$ Öse	1,0 ccm	—	† am 1. Tage	
„ 2	„	0,3 „	—	† „ 1. „	
„ 3	„	0,1 „	—	† „ 1. „	
„ 4	„	0,03 „	—	† „ 1. „	
„ 5	„	0,01 „	—	† „ 1. „	
„ 6	„	0,003 „	—	† „ 1. „	
„ 7	„	0,001 „	—	† „ 1. „	
„ 8	„	1,0 „	1,0 ccm	† „ 1. „	
„ 9	„	0,3 „	1,0 „	† „ 3. „	
„ 10	„	0,1 „	1,0 „	† „ 1. „	
„ 11	„	0,03 „	1,0 „	lebt	
„ 12	„	0,01 „	1,0 „	lebt	
„ 13	„	0,003 „	1,0 „	lebt	
„ 14	„	0,001 „	1,0 „	† am 1. Tage	
„ 15	„	—	—	† „ 1. „	Kontrolle I
„ 16	„	—	1,0 „	† „ 1. „	„ II
„ 17	—	—	1,0 „	lebt	„ III

Aus den Kontrollversuchen geht hervor, daß die angewandte Bakterienmenge tödlich ist, daß ferner 1 ccm aktives Kaninchenserum den Tod nicht verhindert, andererseits, für sich injiziert, für das Kaninchen unschädlich ist:

Die Versuche 1—7 zeigen, daß Immunserum allein das Tier nicht zu schützen vermag. Wenn aber gleichzeitig mit einer mittleren Dosis Immunserum 1 ccm aktives Kaninchenserum als Komplement eingeführt wird, so kann das Tier am Leben bleiben (Versuch 11—13). Bei Anwendung größerer Immunserumdosen stirbt das Tier, eine Erscheinung, die als Komplementablenkung gedeutet wird (s. später).

Die beim Menschen therapeutisch anzuwendenden bakteriolytischen Sera müssen also so gewählt sein, daß ihre Ambozeptoren durch das menschliche Normalserum kompletiert werden können. Nach Ehrlich (Croonian Lecture vom 22. März 1900) wäre dies am sichersten zu erwarten, wenn das Immunserum vom Affen, als einer dem Menschen nahestehenden Tierart, gewonnen wird. Noch einen anderen Weg schlugen Ehrlich und Morgenroth (Berliner klin. Wochenschr. 1901, Nr. 21 u. 22) vor, die Mischung der Immunsera verschiedener Tierarten, in der Erwartung, daß dann unter den verschiedenen Ambozeptoren auch solche sein würden, die im Menschen, bzw. in dem therapeutisch zu behandelnden Tiere passende Komplemente fänden.

Shiga (Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten 1902, Bd. XLI) führte für sein von Pferden gewonnenes Dysenterieserum im bakteriziden Plattenversuch den exakten Nachweis, daß es durch Menschenserum kompletiert wird.

Wassermann (Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 18, pag. 285) versuchte, durch gleichzeitige Injektion eines passenden Komplementes die Wirkung des Immunserums zu gewährleisten. Die Beweiskraft seiner Versuche ist allerdings durch Besredka (Ann. Pasteur 1901, Bd. XV, pag. 209), Carré und Vallée (Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1902, Bd. LIV, Nr. 4) bestritten worden, die mit erhitztem, also komplementfreiem normalem Serum die gleichen Resultate erzielten.

Die Aussicht auf eine Wirkung der „Komplementtherapie" wird zweifelhaft gemacht durch die Erwägung, daß Komplemente auch durch Zellen, ferner durch normale, für die betreffende Infektion nicht in Betracht kommende Ambozeptoren oder immunisatorisch erzeugte Antikörper gebunden werden können. Es bedürfte ferner zu einer erheblichen Komplementzufuhr recht großer Mengen von normalem Serum, die an sich nicht mehr indifferent für den Organismus sind.

Aus den bakteriziden Plattenversuchen ist bekannt, daß ein Überschuß von Ambozeptoren die Bakteriolyse aufhebt. Ähnliche Beobachtungen liegen auch für den Tierversuch vor. Löffler und Abel (Centralbl. für Bakt. 1896, Bd. XIX, pag. 51), Pfeiffer (Zeitschr. für Hygiene 1895, Bd. XX, pag. 198), Leclainche und Morel (Ann. Pasteur 1901, Bd. XV, pag. 1), Wassermann (zittiert nach Friedberger, „Die bakteriziden Sera", Kolle-Wassermann, Bd. IV, pag. 542), Wechsbgrg (Zeitschr. für Hygiene 1902, Bd. XXXIX) beobachteten, daß nur mittlere Dosen das Tier schützten, ganz große nicht mehr. M. Neisser und Wechsberg glauben diese Erscheinung als Ausdruck der im Plattenversuch beobachteten „Komplementablenkung" ansehen zu dürfen, Friedberger (in dem Aufsatz „Die bakteriziden Sera", pag. 542) gibt allerdings eine abweichende Erklärung dafür. Jedenfalls muß mit der Mög-

lichkeit gerechnet werden, daß zu große Dosen eines bakteriolytischen Serums schädigen.

Die einem Tiere passiv zugeführte Ambozeptormenge erhält sich nicht unverändert im Blute. Der Ambozeptorengehalt fällt nach einiger Zeit ab und sinkt schließlich auf die Werte des Normalserums. Durch den Pfeifferschen oder den Plattenversuch läßt sich der Abfall der injizierten Ambozeptoren im Serum des passiv immunisierten Tieres verfolgen. Pfeiffer und Friedberger (Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVII, pag. 131) und Shibayama (Centralbl. für Bakt., Bd. XLI, Heft 5 u. 6) wiesen nach, daß heterologe Ambozeptoren (Ambozeptoren, die von einer anderen Tierart, als der therapeutisch zu beeinflussenden, stammen) rascher wieder aus der Blutbahn schwinden als homologe. Die heterologen Ambozeptoren vermindern sich nach Shibayama (Pferdecholera-Serum, einem Kaninchen injiziert) schon nach 6—8 Tagen, die homologen erst bedeutend später.

Wiederholte Seruminjektionen halten das Absinken nicht oder nur vorübergehend auf; werden sie in sehr kurzen Zwischenräumen wiederholt, so schwinden im Gegenteil die Ambozeptoren sofort.

Ob dies Schwinden der Ambozeptoren durch das Auftreten von Antiambozeptoren bedingt ist, mag dahingestellt bleiben.

(Literaturangaben sind im Text enthalten.)

XX.

Technik der Darstellung des Pestserums.

Von

Prof. Dr. W. Kolle, und **Dr. F. Krumbein,**

Direktor des Institutes zur Erforschung der Infektionskrankheiten und wissenschaftlicher Leiter des Schweizer Serum- und Impf-Institutes

Technischer Leiter des Schweizer Serum- und Impf-Institutes

in Bern.

Die passive Immunität gegen Pest, soweit es sich wenigstens um eine echt spezifische Immunisierung handelt, kann nur durch Pestserum verliehen werden. Die durch Pestserum den Tieren mitgeteilte Immunität ist eine vorübergehende im Gegensatz zur aktiven Immunität, die längere Zeit anhält. Da aber die durch das Pestserum verliehene Immunität sofort nach der Injektion des Serums einsetzt, so hat man versucht, für Zwecke der praktischen Schutzimpfung die passive mit der aktiven Immunisierung zu kombinieren. Es sind die verschiedenen Methoden der aktiven Immunisierung tatsächlich bei Menschen wie bei Tieren in Verbindung mit der Einverleibung des Pestserums ausgeführt worden.

Eine Vorbedingung für das Verständnis der Herstellung des Pestserums ist die Kenntnis

1. der morphologischen und biologischen Eigenschaften des Pestbazillus, namentlich seine für Tiere pathogenen und toxischen Eigenschaften und

2. eine Kenntnis der wichtigsten Tatsachen, welche von den Immunitätsforschern auf diesem Gebiete gewonnen worden sind.

Morphologie und Biologie des Pestbazillus.

Der im Jahre 1894 von Kitasato und unabhängig von ihm gleichzeitig von Yersin während der Pestepidemie in Hongkong entdeckte Erreger der Pest ist ein kleines kurzes Stäbchen. Dasselbe ist an den Enden leicht abgerundet und zeigt häufig an der Seite bauchige Erweiterungen. Der Pestbazillus ist unbeweglich, und es sind bisher auch keine Geißeln an ihm nachgewiesen worden. Auch Sporenbildung kommt nicht vor. Sehr charakteristisch für den Pestbazillus ist die Polfärbung, welche namentlich an den aus dem menschlichen oder tierischen Körper hergestellten Ausstrichpräparaten zu erkennen ist. Die färbbare Substanz findet sich nämlich in diesem Falle

an den Polen angeordnet, während der mittlere Teil des Bazillus weniger gefärbt ist. Der Pestbazillus färbt sich leicht mit allen basischen Anilinfarben, ist dagegen nach der GRAMschen Methode nicht zu färben. Sehr schöne Bilder lassen sich durch Färbung des Bazillus mit verdünnter Karbolmethylenlösung erzielen, die analog der ZIEHLschen Lösung hergestellt und im Verhältnis 1 : 10 mit Wasser verdünnt ist. Es empfiehlt sich, die aus dem Tierkörper hergestellten Präparate zur Erzielung schöner Polfärbung mit Alkohol zu fixieren. Man taucht die Präparate für $^1/_2$ — 1 Minute in Alkohol und entfernt dann den letzteren durch schnelles Verdunstenlassen in der Nähe einer Flamme. GAFFKY hat empfohlen, die aus dem Tier- oder Menschenkörper hergestellten Präparate vor der Färbung $^1/_2$ Minute mit $^1/_2$ % Essigsäure zu behandeln und nach reichlicher Wasserspülung zu trocknen, um sie dann mit dem Farbstoff zu behandeln. Ein Charakteristikum des Pestbazillus ist die große Variabilität der Form, welche die zahlreichen, ihm im Bakteriensystem nahe stehenden Bakterien, namentlich auch die tierpathogenen Bakterien der Schweineseuche und Hühnercholera nicht aufweisen. Die Bildung von ganz eigenartigen Involutionsformen ist geradezu ein Erkennungsmittel des Pestbazillus. Besonders auf Salzagar kommt es zur Entstehung derartiger Involutions- und Degenerationsformen; aber auch in künstlichen Kulturen, sowie im tierischen Organismus treten dieselben bei ungünstigen Wachstums- und Ernährungsbedingungen häufig auf. Es finden sich dann Formen, welche die Farblösung nur noch schwach annehmen, ferner blasen- oder scheibenförmige und hefenzellenähnliche Gebilde, bei denen oft nur ein Teil des Bakterienleibes gefärbt ist, so daß ringförmige und blasenförmige Gebilde entstehen. Kurz nach dem Tode der Menschen und Tiere treten sie in den Organen auf und finden sich mit dem Alter der Leichen in zunehmendem Maße und in stärkerer Ausgestaltung.

Die Züchtung der Pestbazillen gelingt auf verschiedenen Nährboden, sobald die Reaktion eine zusagende ist. Dieselbe muß neutral oder schwach alkalisch sein. Es ist ferner notwendig, nicht zu trockene Nährböden zu benutzen. Die Wachstumstemperaturen liegen zwischen 20 und 42° C, das Optimum befindet sich zwischen 30 und 35° C. Ziemlich charakteristisch ist das Wachstum auf der Agarplatte. Schon nach 24 stündigem Wachstum lassen sich kleine ziemlich durchsichtige Kolonien erkennen; aber erst nach 48 stündigem Wachstum sind die charakteristischen Eigenschaften an ihnen zu erkennen. Es bildet sich eine breite, unregelmäßig ausgebuchtete Randzone um ein dickeres und erhabeneres, leicht granuliertes Zentrum, welches bei durchfallendem Lichte erheblich dunkler als die Randzone erscheint. Ebenso charakteristisch ist das Verhalten der Pestkolonien auf der Oberfläche von Gelatine. Die Bazillen wachsen hier, ohne die Gelatine zu verflüssigen, bei einer Temperatur von 32° C zu kleinen graugelblichen Kolonien aus, bei denen auch Randbildung zu erkennen ist. Auch hier zeigt sich ein leicht granuliertes Zentrum. Die Entwicklung der Pestbazillen geht sehr langsam vor sich und erfolgt in den ersten 24 Stunden, wenn mit bloßem Auge ganz kleine Kolonien eben zu bemerken sind, in Form von Schlingenbildung, welche sich, wie KOSSEL zeigte, durch Klatschpräparate ziemlich leicht demonstrieren läßt. Die Bazillen sind in vielfach verschlungenen Fäden angeordnet, die wirr durcheinander gelagert sind. In älteren Kolonien verschwindet diese eigenartige Anordnung der Bazillen wieder. Das Wachstum in flüssigen Nährmedien bietet makroskopisch wenig charakteristisches dar. Auf der Oberfläche von Bouillon kommt es in Kulturen, die vor jeder Erschütterung bewahrt werden, zur Bildung von kleinen Kammhäutchen. Häufig sieht man von dieser oberflächlichen Schicht kleine Zäpf-

chen, sog. Stalaktiten in die klare darunter befindliche Flüssigkeit eintauchen; daneben bildet sich ein Bodensatz. In älteren Kulturen findet äußerlich eine diffuse Trübung der Bouillon statt.

Mikroskopisch weisen die in flüssigen Nährungsmedien gewachsenen Pestbazillen eine schöne Anordnung in Ketten auf, die lebhaft an Streptokokkenketten erinnnern. Ähnliche Bilder findet man auch bei Präparaten, die aus dem Kondenswasser von Agarkulturen angefertigt werden. Die Bildung solcher Oberflächenhäutchen kann angeregt werden dadurch, daß indifferente Fette auf die Oberfläche der Bouillonkolben gebracht werden, an denen die Pestbazillen haften. Es wird dabei, da die Pestbazillen sehr sauerstoffbedürftig sind, ein viel ausgiebigeres Wachstum erzielt als in Fällen, in welchen eine Kammhautbildung nicht stattfindet.

Die Kulturen der Pestbazillen auf Kartoffeln, auf Blutserum und anderen speziell dafür angegebenen Nährböden, z. B. dem mit Farbstoff versetzten Lackmus-Milchzucker-Fuchsin-Agar und ähnlichen Substraten, bieten nicht sehr viel charakteristisches dar.

Die Pestzellen sind nicht sehr widerstandsfähig gegen äußere schädigende Einflüsse außerhalb des Tierkörpers. Durch Erwärmung auf 70° C lassen sie sich innerhalb einer Stunde abtöten. Durch Sonnenlicht werden sie spätestens innerhalb 24 Stunden abgetötet, ebenso durch vollkommene Austrocknung. In 1%iger Lysollösung werden die Bakterien in 10 bis 15 Minuten, in 1%igem Ätzkalk in 10 Minuten, in 1%iger Sublimatlösung in einer halben Minute getötet. Auch die Kalkmilch wirkt abtötend auf die Pestbazillen. In 1%iger Salzsäure sterben die Pestbazillen in 30 Minuten, in ½%iger Schwefelsäure in 5—10 Minuten. Auch bei Gegenwart von saprophytischen Keimen halten sich die Pestbazillen nicht lange lebensfähig.

Die Giftstoffe der Pestbazillen sind im wesentlichen Endotoxine, d. h. hauptsächlich an die Leibessubstanz der Pestbakterien gebunden. Einige Autoren behaupteten zwar, ein lösliches Pestgift, welches in Analogie mit den echten Toxinen zu setzen war, gefunden zu haben, aber bei Nachprüfungen haben sich lösliche Gifte doch nur sehr inkonstant und in so geringen Mengen in jungen und alten Kulturen nachweisen lassen, daß man zu der Annahme kommen muß, es handle sich auch bei diesen Toxinen vorwiegend nur um ausgelaugte Leibessubstanz der Bakterien. Die Bildung solcher Produkte findet beim Absterben von Bakterien in jeder Lösung statt und erfolgt gerade bei den Pestbakterien in so reichlichem Maße, daß dadurch die Anwesenheit echter Toxine vorgetäuscht werden kann.

Die Pestbakterien sind für eine ganze Anzahl von Tierarten pathogen. Spontane Infektionen scheinen außer beim Menschen und bei der Ratte und Maus, denjenigen Spezies, unter denen epidemische, bzw. epizootische Erkrankungen beobachtet werden, nur noch bei der Katze und dem Affen vorzukommen. Aber der experimentellen Infektion sind außerdem noch Meerschweinchen und Kaninchen zugänglich. Es kommt bei allen genannten Tieren nicht nur zu einer Vermehrung der Pestbakterien an der Einimpfungsstelle und zu primärer Lokalisation in den zugehörigen Drüsen, sondern namentlich auch zu einer septikämischen Verbreitung. Die Art der Infektion und die Menge des einverleibten Infektionsstoffes sind außerdem entscheidend für den Verlauf der Krankheit bei diesen Tieren, die, genügende Virulenz des Infektionsstoffes vorausgesetzt, fast stets tötlich verläuft. Da sowohl Meerschweinchen wie Mäuse und Ratten für die Wertbestimmung des Pestserums und zur Prüfung der Immunität nach Einverleibung der verschiedenen Impfstoffe gebraucht werden, so ist es notwendig, hierauf kurz einzugehen.

Für Mäuse und Ratten kommt vor allen Dingen die Einverleibung mittels subkutaner Injektion wie mittels des sogenannten Schwanzwurzelstichs in Frage.

Die Technik der Subkutaninjektion wird als bekannt vorausgesetzt. Die Infektion mittels Schwanzwurzelstichs nimmt man am besten so vor, daß eine Hohlnadel, wie sie zur Subkutaninjektion benutzt wird, in eine Bakterienaufschwemmung von ganz bestimmter Konzentration eingetaucht wird. Es saugt sich dann, wenn man eine Hohlnadel mit gleichem Lumen benutzt, fast stets die gleiche Menge in das Lumen ein. Die so infizierte Nadel wird nun zweimal unter die Haut in der Gegend der Schwanzwurzel an zwei möglichst nahe aneinander liegenden Stellen eingestochen. Das Tier wird am besten von einem Diener mittels einer Zange fixiert, wobei der Schwanz in gestreckter Stellung gehalten wird. Man kann mittels dieser Methode ebenso genau die Virulenz der Kultur prüfen wie mit Hilfe der Subkutaninjektion, denn in gleicher Weise wie bei dieser, kann man die Dosierung des Infektionsstoffes durch Herstellung der Verdünnung der Bakterienaufschwemmung erzielen.

Bei Meerschweinchen hat sich die Kutaninfektion als die beste Methode zur Bestimmung der Virulenz erwiesen. Bei subkutaner Einverleibung der Kulturmasse treten die Virulenzunterschiede bei weitem nicht so scharf zutage, wie bei dieser, mehr den natürlichen Infektionsvorgang nachahmenden experimentellen Einverleibung des Infektionsstoffes. Verreibt man pestbakterienhaltiges Material auf der von Haaren durch Rasieren oder Epilieren gründlich befreiten Bauchhaut eines Meerschweinchens, so dringen die Pesterreger durch die mikroskopisch kaum sichtbaren oder unsichtbaren Verletzungen, welche durch die Manipulation des Rasierens und Epilierens und bei Einreibung des Infektionsmaterials stets entstehen, in den Körper ein und erzeugen eine schwer hämorrhagische Entzündung des Unterhautzellgewebes mit Entzündung der regionären Lymphdrüsen und hämorrhagischer Infiltration des umgebenden Bindegewebes. Die Tiere sterben je nach der Virulenz des Infektionsstoffes innerhalb 3 Tagen bis 4 Wochen nach der Infektion. Je länger der Krankheitsverlauf ist, desto größer pflegen die Veränderungen an den Drüsen und den inneren Organen zu sein, an denen sich besonders charakteristische Knötchen finden, welche die größte Ähnlichkeit mit den bei Rotz und Tuberkulose vorkommenden Bildungen haben.

Je virulenter der Infektionsstoff ist, desto rascher erfolgt der Tod der Tiere. Die Menge des auf der Bauchhaut verriebenen Materials spielt zwar auch eine Rolle bezüglich des Verlaufes, jedoch keine so große wie bei intraperitonealer oder subkutaner Einverleibung. Man kann aber bei vergleichenden Untersuchungen sehr leicht gleiche Bedingungen dadurch schaffen, daß man eine Verdünnung des Infektionsstoffes herstellt, den man auf der Bauchhaut der Meerschweinchen verreibt.

Spezifische Stoffe des Pestserums.

Ehe wir zur Besprechung der Frage eingehen, wie ein möglichst wirksames Pestserum hergestellt wird und wie sich die Wertbemessung desselben gestaltet, müssen kurz die Arbeiten erwähnt werden, welche sich mit dem spezifischen Stoffe des Pestserums beschäftigen. Der Nachweis dieser Stoffe gibt nicht nur Anhaltspunkte für die Herstellung des Serums, sondern auch für die Wertbemessung desselben. Es sind bis jetzt spezifisch bakterizide, agglutinierende, präzipitierende, opsonische

und komplementverankernde Stoffe nachgewiesen worden. Der Nachweis dieser Stoffe genügt jedch nicht allein zur Erklärung der Wirkungsweise des Pestserums, weshalb Verfasser vorgeschlagen hat, die Wirkungsweise des Pestserums allgemein als eine antiinfektiöse zu bezeichnen. Denn in allen im Handel erhältlichen und jetzt hauptsächlich angewandten Serumprodukten sind die genannten Stoffe in mehr oder minder großer Menge nachweisbar. Dem antiinfektiösen Pestserum kommen verhältnismäßig geringe antitoxische Eigenschaften zu; nur Markl will ein antitoxisches Pestserum hergestellt haben, das auf lösliche, in alten Bouillonkulturen entstehende Gifte des Pestbazillus wirken soll.

Es empfiehlt sich, die einzelnen Stoffe des Pestserums getrennt daraufhin zu betrachten, wie weit sie sich zur Wertbemessung des Pestserums eignen.

Was zunächst die spezifisch bakteriziden Stoffe betrifft, so lassen sie sich, wie Kolle zeigte, bei der Versuchsanordnung des Pfeifferschen Versuchs im Peritoneum von Meerschweinchen und Ratten nachweisen. Aber der Nachweis dieser Stoffe erfordert sehr viel Übung, denn das Phänomen der Bakterienauflösung erfolgt nur langsam. Da außerdem ein großer Teil der Bakterien, wenn die Kulturen nicht ganz virulent sind, von Freßzellen des Peritoneums aufgenommen wird, so erhält man oft ungleichmäßige Resultate. Ferner muß bei diesem Experiment eine ziemlich große Menge von Bakterien verwendet werden, so daß fast stets der Tod der Tiere erfolgt, auch dann, wenn das Phänomen positiv ausgefallen war. Aus allen diesen Gründen empfiehlt sich die Benutzung der spezifisch bakteriziden Stoffe nicht zur Wertbestimmung des Pestserums.

Aus demselben Grunde ist die in der Bauchhöhle von Meerschweinchen und Ratten unter dem Einfluß des Pestserums auftretende Phagozytose, welche Markl zuerst beschrieben hat, nicht zur Wertbemessung des Pestserums brauchbar; denn nach Markl werden nur die vollvirulenten Pestbazillen durch Einwirkung des Serums phagozytiert, während die avirulenten oder die nicht ganz vollvirulenten Bazillen in der freien Peritonealflüssigkeit der Bauchhöhle zur Auflösung gelangen und auch ohne Serum phagozytiert werden.

Was die Verwendung der Agglutinine für die Wertbestimmung des Serums betrifft, so können dieselben insofern als Indikator für den Gehalt des Serums an spezifischen Stoffen benutzt werden, als der Gehalt des Serums an Agglutininen im großen und ganzen dem Gehalt der andern spezifischen Stoffe parallel geht. Wie bekannt, sind unmittelbare Rückschlüsse auf Schutz- und Nachwirkung aus dem Gehalt des Serums an Agglutininen allerdings nicht zu machen. Wir wissen, daß Schutzstoffe und überhaupt Körper, auf den die antiinfektiöse Eigenschaft des Serums beruht, nicht mit der Agglutination zu identifizieren oder überhaupt in nähere Beziehung zu bringen sind.

Die durch den Tierversuch als hochwertig nachgewiesenen Pestsera pflegen allerdings fast stets auch einen hohen Gehalt an Agglutininen zu besitzen und deshalb können die Agglutinine als Anhaltspunkte für eine gutgeleitete Immunisierung oder für den erfolgreichen Gang derselben wohl benutzt werden. Können doch auch Experimente zeigen, daß Tiere, welche mit abgetöteten Pestkulturen vorbehandelt werden, ein viel schwächer agglutinierendes Serum liefern, als die mit lebenden Kulturen immunisierten Pferde. Es empfiehlt sich aus allen diesen Gründen für Pestsera, welche therapeutisch benutzt werden sollen, neben dem Schutzwert auch den Agglutinationstiter zu vermerken.

Die von R. Kraus entdeckten Pestpräzipitine sind spezifischer Natur und in hochwertigem Pestserum nachweisbar. Da jedoch die Präzipitinreaktion viel weniger empfindlich und eindeutig ist als die Agglutinatiosprobe, so ist sie für die Wertbestimmung des Pestserums nicht heranzuziehen.

Auch die bakteriotropen Substanzen Neufelds sind im Pestserum vorhanden. Wenn man Pestserum, gewaschene Leukozyten und Pestbakterien mischt und längere Zeit bei 37 ⁰ in Kontakt läßt, so tritt eine ausgesprochene Phagozytose der Pestbakterien ein, die deutlich spezifischen Charakter trägt. Weder normales Serum, noch andere Serumarten haben die gleiche Fähigkeit wie das Pestserum, die Pestbazillen zur Aufnahme durch Leukozyten vorzubereiten. Zu einer Wertbestimmung des Pestserums möchte ich auch die bakteriotropen Substanzen aus verschiedenen Gründen nicht empfehlen. Zunächst schwankt bei den verschiedenen Peststämmen und auch bei ein und derselben Pestkultur zeitlich die Phagozytierbarkeit; auch spielt die Spontanphagozytose und die Wirkung des Normalserums, wie Löhlein zeigte, eine so große wechselnde Rolle bei der Anstellung derartiger Versuche, daß ich die Verwendung der bakteriotropen Substanzen für die Werbestimmung um so weniger noch befürworten möchte, als die Versuche viele subjektive Fehlerquellen in sich bergen. In dieser Beziehung sei ferner auf die von vielen Seiten geübte Kritik der Versuchsanordnung hingewiesen, welche von Wright für die opsonischen und bakteriotropen Substanzen eingeführt ist.

Der Nachweis spezifisch-bakterizider Substanzen mit Hilfe des Plattenversuchs führt zu keinen Ergebnissen. Es findet in vitro, selbst bei reichlichem Zusatz von Komplement unter dem Einfluß des Pestserums keine Auflösung und Abtötung der Pestbazillen in solchem Maße statt, daß sich diese Ergebnisse zahlenmäßig verwerten ließen. Es sei hier nur auf die Arbeiten des Verfassers, die er in Gemeinschaft mit Otto und Hetsch ausgeführt hat, hingewiesen.

Auch die komplementverankernden Stoffe, für deren Identität mit echten Agglutininen auch beim Pestserum bisher keine Beweise erbracht worden sind, lassen sich, wie die unter des Verfassers Leitung von Krumbein und Schatiloff ausgeführten Versuche zeigen, mittels der Bordet-Gengouschen Versuchsanordnung im Pestserum demonstrieren. Diese Stoffe erweisen sich als spezifisch und eignen sich neben den Agglutininen für die Wertbestimmung des Pestserums. Sie nehmen im Laufe der Immunisierung zu und häufen sich im Blute nur dann in großer Menge an, wenn auch die anderen spezifischen Stoffe reichlich gebildet sind.

Da wir nun aber über die komplementverankernden Stoffe und ihre Natur noch nicht völlig orientiert sind und uns verschiedene Tierarten, die für Pest empfänglich sind, zur Verfügung stehen, so muß für die Wertbestimmung des Serums neben der Festsetzung des Agglutinationstiters und des Gehalts an komplementverankernden Stoffen in erster Linie die Feststellung der Schutzkraft bzw. Heilkraft im Tierversuch bei Mäusen und Ratten verlangt werden.

Ein Hauptgrund, weshalb man das Pestserum nicht zu den rein bakteriziden bzw. bakteriotrop wirkenden Serumarten zählen kann, liegt in den Ergebnissen der Bindungsversuche, wie sie zurzeit von Kolle und Hetsch angestellt wurden. Es erfolgt eine Bindung zwischen den spezifischen Stoffen des Pestserums und den lebenden Pestbakterien,

aber nicht in quantitativem Verhältnis, wie es bei den rein bakteriziden und auch bei den bakteriotropen Serumarten der Fall ist. Bei abgetöteten Kulturen tritt eine Bindung überhaupt nicht ein.

Auf Grund all dieser Ergebnisse muß man die Wirksamkeit des Pestserums auf die kombinierte Wirkung verschiedener Stoffe zurückführen und höchstwahrscheinlich auch auf solche Stoffe, deren biologische Eigenschaften mit den jetzt gebräuchlichen Methoden noch nicht bestimmt werden können. Das gleiche Verhalten zeigen ja auch andere Sera, wie z. B. das Rinderpest- und Milzbrandserum, die aus diesem Grunde am besten mit dem nichtsvorausnehmenden Namen „antiinfektiös“ bezeichnet werden.

Es ist noch kurz die Frage der Multivalenz zu erörtern. Versuche, welche von Hetsch und Rimpau angestellt wurden, haben ergeben, daß ein Unterschied in der Wirksamkeit von Pestserum, welches mit einer großen Anzahl von Stämmen hergestellt wurde und solchem, welches durch Immunisierung mit einem einzigen Stamm gewonnen wurde, nicht besteht. Das mit einem Peststamm erzeugte univalente Pestserum wirkt multivalent fast gleichmäßig in vitro und im Tierversuch auf die verschiedensten Peststämme. Die mit vielen Stämmen hergestellten multivalenten Sera zeigten keine lgeichmäßigere oder stärkere Wirkung.

Methoden der Herstellung des Pestserums.

Wir gehen nun dazu über, die verschiedenen Methoden der Herstellung der antiinfektiösen Sera kurz zu besprechen.

1. Die Immunisierung von Pferden mittels abgetöteter und lebender Pestbakterien. Die Einverleibung der Kulturen, welche durch einstündige Erwärmung auf 70° C abgetötet sind, erfolgt inravenös. Man beginnt mit kleinen Dosen abgetöteter Agarkulturen (zunächst $^1/_4$ Kultur) und steigt in 8tägigen Zwischenräumen nach und nach bis zur Dosis von 10—12 Agarkulturen. Dann wird mit der Injektion lebender vollvirulenter Pestkulturen, zunächst $^1/_{20}$ Agarkultur, dann steigend bis zu 6 Kulturen, begonnen. Auch dieses Material wird intravenös injiziert und zwar in Zwischenräumen von 8 Tagen.

Die Benutzung von Bouillonkulturen für Zwecke der Immunisierung ist im allgemeinen aufgegeben worden, weil man auf Grund der Prüfung des Pestserums im Tierversuch erkannt hat, daß es im wesentlichen darauf ankommt, die Leibessubstanz der Pestbakterien einzuverleiben. Über die Technik der Einverleibung der Kulturen, die dabei zu beobachtenden Kautelen usw. wird unten weiteres mitgeteilt werden.

2. Pestserum nach Lustig. Die Pferde werden behandelt mit den aus Pestkulturen nach der Methode Lustig hergestellten Nukleoproteiden. Es werden Pestkulturen mit 1%iger Kalilauge versetzt und so zur Auflösung gebracht. Aus der homogenen Lösung bringt man durch Zusatz von Essigsäure einen Niederschlag hervor, welcher die sog. Pestnukleoproteide, d. h. aus den Bakteriensubstanzen stammende Proteinstoffe enthält. Der Niederschlag läßt sich trocknen und aufbewahren. Zum Zwecke der Immunisierung werden Verdünnungen dieses Pulvers mit physiologischer Kochsalzlösung, der etwas Alkali zugesetzt ist, hergestellt. Man beginnt mit einer Injektion von 0,1 g des Trockenpulvers und steigt allmählich bis zu 1,5 bzw. 2 g. Die Zwischenräume betragen im allgemeinen 14—25 Tage. Die Reaktionen bestehen in Fieber und Ödemen. Die Injektionen erfolgen subkutan. Die Abnahme

des Serums erfolgt 14 Tage nach der letzten Einspritzung. Das Serum muß zur Erzielung therapeutischer Effekte in Mengen von 60, 80 und 100 ccm einverleibt werden.

3. Herstellung des Pestserums nach Terni-Bandi. Es werden Meerschweinchen mit Pestbakterien intraperitoneal injiziert. Wenn die Tiere schwer krank sind, so werden sie getötet, um das an Pestbakterien reiche Peritoneal-Exsudat zu gewinnen. Dasselbe wird durch Zentrifugieren und Filtrieren von den lebenden Pesterregern befreit. Die klare sterile Flüssigkeit soll nun die aufgelösten Pestbakterien und besondere Stoffe, die sog. Aggressine, welche von Bail näher präzisiert sind, enthalten. Durch Immunisierung von Maultieren und Ochsen wird ein Serum erhalten, welches wirksamer sein soll als die mit abgetöteten oder lebenden unveränderten Pestbakterien an Pferden hergestellten Sera; denn es soll neben den antiinfektiösen Eigenschaften auch noch Antikörper gegen die Aggressine, d. h. gegen die Angriffsstoffe der Bakterien besitzen. Daneben soll das Serum auch antitoxische Eigenschaften gegenüber den Pestgiften, welche nach Terni nur im lebenden Tier- und Menschenkörper erzeugt werden, entfalten.

Es fehlen bisher allerdings Versuche zum Nachweis einer echt antitoxischen Wirkung. Die beim Menschen mit Hilfe des Ternischen Serums erzielten Heilerfolge sind außerdem jedenfalls geringere, als die mit den im Institut Pasteur oder im Berner Institut hergestellten Präparaten.

Die Prüfung der genannten drei Sera erfolgt am besten mit Hilfe des Tierversuchs und zwar am besten an Ratten, da diese sich viel gleichmäßiger gegenüber der Pestinfektion bei gleichzeitiger Seruminjektion verhalten als Mäuse. Das Serum wird intraperitoneal gegeben und gleichzeitig erfolgt Infektion durch den Stich einer infizierten Hohlnadel in die Schwanzwurzel. Um den Wert eines Serums zu ermitteln sind große Versuchsreihen notwendig und es empfiehlt sich von jeder Serumdosis zwei Ratten von 100 g Gewicht zu spritzen.

Es läßt sich auf diese Weise der Schutzwert eines Serums, welches für die Praxis ja die größte Bedeutung hat, da die Heilkraft des Serums bei ausgesprochener Erkrankung eine nicht sehr große ist, ziemlich genau ermitteln.

4. Antitoxisches Pestserum nach Markl. In älteren Bouillonkulturen der Pestbazillen will Markl echte Toxine nachgewiesen haben. Diese Auffassung wird allerdings nicht von allen Seiten geteilt, sondern es wird von mehreren Autoren angenommen, daß es sich nur um ausgelaugte Endotoxine der Pestbakterien handelt.

Markl hat nun mit den löslichen giftigen Stoffwechselprodukten der Pestbazillen Tiere immunisiert und, wie er annimmt, „giftfest“ gemacht. Das 3—4 Wochen nach der letzten Giftinjektion entnommene Serum soll antitoxisch auf die zur Immunisierung benutzten Gifte wirken. Der Wert des Serums war der, daß 0,2 ccm gegen die einfach tötliche Dosis des Giftes wirksam waren. Größere Mengen des Serums (0,5 bis 1,5 ccm) erwiesen sich auch gegen die 3—5fache Giftmenge antitoxisch wirksam. Aber diese Sera ließen vollkommen im Stich, wenn sie zur Heilung pestinfizierte Ratten und Mäuse benutzt wurden. Markl selbst und neuerdings Kraus haben den Schluß gezogen, daß für die Heilung der Pestinfektion antitoxische Pestsera nicht ausreichen. Es ist Kolle und Otto trotz genauer Befolgung der Marklschen Vorschriften nicht gelungen, antitoxische Pestsera herzustellen. Dagegen hat Dean bei Pferden

durch Immunisierung mit Filtraten der Pestbouillonkulturen antitoxische Sera hergestellt. Da er aber gleichzeitig auch lebende Kulturen den Tieren einverleibte, so ist nicht bewiesen, daß die Wirksamkeit seiner Sera auf antitoxische Effekte, ausgelöst durch die Einverleibung von Giften als Antigene, zurückgeführt werden können. Besredka behauptet, im Serum der Pferde, welche mit den Bakterienleibern immunisiert waren, Antikörper nachgewiesen zu haben, welche in Mengen von 0,25 ccm bei Anwendung des Mischungsversuches die 50fach tödliche Dosis der abgetöteten, wesentlich also Endotoxin enthaltenden Pestbakterien neutralisiert. Es folgt hieraus, daß im Gegensatz zu den Angaben von Markl die antitoxische Wirkung des Pestserums nicht auf der Fähigkeit, die gelösten Giftstoffe der Pestbazillen vom Charakter der Toxine zu neutralisieren beruht, sondern auf antiendotoxischen Wirkungen.

Sterilitäts- und Unschädlichkeitsprüfung.

Die, wie für jedes andere in der menschlichen Therapie zur Anwendung gelangende Serum notwendige Prüfung des Pestserums auf Sterilität hat gegenüber anderen z. B. antitoxischen Seris sich speziell mit der Feststellung zu befassen, daß das Pestserum frei ist von lebenden Pestkeimen. Außerdem muß durch den Tierversuch das Vorhandensein von Tetanustoxin ausgeschlossen werden. Demgemäß müssen mit dem frisch gewonnenen Pestserum folgende Prüfungen vorgenommen werden.

Behufs Feststellung der Sterilität des Blutes bei der Entnahme werden einige Kubikzentimeter Blut direkt aus der Ader in Kölbchen mit einer relativ großen Menge Bouillon (60—80 ccm) eingefüllt. Aus der nach Bebrütung in den nächsten Tagen eventuell auftretenden Trübung läßt sich bereits ein Schluß auf die Sterilität des Blutes ziehen. Mikroskopische Präparate aus den Kölbchen führen die Entscheidung herbei, ob wirklich Keime gewachsen sind. Sodann wird nach Abscheidung des Serums in den bei der Blutentnahme gefüllten Probekölbchen am Tage nach der Blutung die subkutane Impfung in der Inguinalbeuge von 1—2 Ratten mit je 3 ccm Serum vorgenommen; die Tiere werden 8 Tage beobachtet und an jedem Tage auf eine etwaige Inguinaldrüsenschwellung (Bubo), welche durch die Anwesenheit infektionstüchtiger Pestkeime hervorgerufen sein könnte, untersucht. Des weiteren erhält ein Meerschweinchen 10 ccm Serum subkutan injiziert zur Prüfung auf Tetanustoxin bzw. etwaige vereinzelte Tetanuskeime. Die Beobachtungsdauer für diese Prüfung hat mindestens zwei Wochen zu betragen und ist namentlich dann rigoros innezuhalten, wenn das serumliefernde Pferd zu Tode geblutet worden ist, oder unmittelbar nach der Blutentnahme geschlachtet oder verkauft wurde. Bekanntlich liegen Beobachtungen (Madsen) vor über das Vorhandensein von Tetanustoxin im Blut von Pferden vor Ausbruch der klinischen Erscheinungen.

Alle diese Proben haben vor der Karbolisierung des Serums stattzufinden; nach dem Zusatz des nötigen Phenols (0,5 %) nimmt man die Prüfung des Serums auf seinen Phenolgehalt vor und injiziert zwei Mäusen von 15 Gramm je 0,5 ccm Serum. Zeigen die Mäuse keine stärkeren Vergiftungserscheinungen (ein leichtes, bald vorübergehendes Zittern nach der Injektion ist von keiner Bedeutung) und bleiben sie am Leben, so überschreitet das Zusatzquantum des Konservierungsmittels die vorgeschriebenen Grenzen nicht.

Außerdem schließt man nun noch eine Sterilitätsprüfung des karbolisierten Serums nach den üblichen bakteriologischen Methoden an, bezüglich Nachweises anderweitiger später etwa hineingelangter Bakterien. Zu dem Zwecke impft man eine Agarplatte, zwei Zuckerbouillonröhrchen und ein Agarröhrchen in hoher Schicht mit je fünf Tropfen Serum; die geimpften Nährböden müssen nach 2—3tägiger Bebrütung im Thermostaten bei 37 ° steril bleiben.

Praxis der Immunisierung.

Zur Immunisierung gegen Pest eignen sich am besten Pferde im Alter von 4—7 Jahren, die sonst gesund und kräftig sind und sich bei der vorausgehenden Malleinisierung als rotzfrei erwiesen haben, sowie vollständig „trockene Knochen“ haben, d. h. absolut fehlerfreie vordere und hintere Extremitäten besitzen. Ferner sollte darauf geachtet werden, daß die Tiere möglichst dunkel in der Farbe sind, da Beobachtungen vorliegen, daß das Serum von Füchsen, Schimmeln, Schecken, überhaupt hellfarbigen Pferden, viel häufiger Serumexantheme bei empfindlichen Personen veranlaßt als das von Rappen und Braunen. Während der vor der Einstellung eines jeden Pferdes notwendigen Quarantänezeit sollte eine kleine Probeblutentnahme an den einzustellenden Tieren vorgenommen werden, um zu sehen, ob das Blut zur Serumdarstellung geeignet ist: gute Abscheidung klaren Serums, feste Blutkuchenbildung, keine Neigung der Blutkörperchen zu schneller Hämolyse usw. Ein außerordentlich wichtiger Faktor bei der Auswahl der Pferde für Pestserumbereitung ist ferner noch der, daß die Tiere sehr ruhig und nicht sehr empfindlich gegen kleine Schmerzen sind: ungeberdige Pferde, Beißer, Schläger usw. sind durchaus als unbrauchbar zu verwerfen.

Als Injektionsmaterial kommen abgetötete und lebende Pestkulturen in Betracht und zwar verwendet man am besten Agarkulturen, da man deren Reinheit am leichtesten kontrollieren kann. Versuche mit univalentem und multivalentem Pestserum haben ergeben, daß letzteres nicht besser wirkt im Tierversuch und daß ersteres durchaus multivalente Eigenschaften hat, indem es die verschiedenen Peststämme gleichmäßig beeinflußt. Demgemäß wird von den in den Pestlaboratorien in Ratten- und Agarpassagen fortgeführten Stammkulturen eine gut virulente zur Herstellung des Injektionsmaterials ausgewählt, verifiziert, Schrägagarkulturen davon anlegt, 48 Stunden bei 30 ° bebrütet, mikroskopisch kontrolliert, mit Kochsalzlösung abgeschwemmt und die so gewonnene Flüssigkeit behufs Zurückhaltung gröberer Partikelchen durch ein feines, sterilisiertes Drahtsieb nebst Trichter in ein sterilisiertes Fläschchen von braunem Glas mit Watteverschluß eingefüllt. Aus dieser Flasche wird bei Verwendung lebender Kulturen das Aufschwemmungsmaterial direkt in den Injektionsapparat eingegossen, oder es erfolgt durch Aufbewahrung desselben während einer Stunde in einem bereits auf 70 ° vorgewärmten Wasserbad die Abtötung der Kultur; eine nachfolgende Kontrollimpfung auf Agar mit $^1/_{10}$—$^1/_4$ ccm dieses Materials garantiert die Sterilität. Bevor man das Material zur Injektion verwendet, sollte man demselben noch eine gewisse Quantität steriler Kochsalzlösung zusetzen und es vorher mehreremal energisch durchschütteln, damit die schleimige Konsistenz, die dasselbe bei der Sterilisation annimmt, verschwindet und das Material sich leicht injizieren läßt. Kommen größere Quantitäten, z. B. 10—15 Kulturen zur Injektion, so stellt man das

Material nach erfolgter Durchschüttelung vorteilhaft in den Brutschrank, um es vorzuwärmen, damit nicht auf einmal eine große Quantität kalter Flüssigkeit in die Blutbahn eingebracht wird.

Die Dosierung des Injektionsquantums hat je nach der Virulenz der verwendeten Kultur sehr vorsichtig zu geschehen. Man beginnt etwa mit $^1/_8$—$^1/_4$ Agarkultur und steigt im weiteren Verlauf der Vorbehandlung auf $^1/_2$, 1, 2, 3, 4, 6 abgetötete Kulturen; ist man bei dieser Dosis angelangt und hat das Tier die Injektionen gut vertragen, so ersetzt man die abgetöteten Kulturen durch lebende, mit Anfangsdosis von $^1/_8$—$^1/_4$ Kultur und Steigerung von $^1/_2$, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 Kulturen. In den meisten Fällen kann man kaum mehr injizieren, ohne daß es schwere Zufälle gibt; es genügt auch dieses Quantum fast immer um eine gute Immunität zu erzielen.

Die Injektionsphasen, d. h. die zeitlichen Intervalle zwischen den einzelnen Injektionen richten sich im großen und ganzen nach dem Ablauf der Reaktion. Man kann indessen sagen, daß bei abgetöteten Kulturen 5—8 Tage nach der vorhergehenden Injektion wieder eingespritzt werden kann. Für lebende Kulturen sollte man zwischen die einzelnen Injektionen a priori je 8 Tage Zwischenraum einschalten, der unter Umständen entsprechend dem Ablauf der Reaktion auf 10—12—14 Tage verlängert werden muß.

Fig. 1.

Als Injektionsmodus wählt man am besten die intravenöse Methode, sowohl für abgetötete wie für lebende Kulturen, da man keine guten Erfahrungen mit den subkutanen Injektionen gemacht hat. Als Injektionsapparat dient für beide Arten Kultur nebenstehender Apparat (Fig. 1), der eine absolut sichere Injektion des so gefährlichen Materials gewährleistet: Eine zylindrische Glasflasche von etwa 4—6 cm Kaliber und 40—60 cm Höhe trägt in ihrer Öffnung einen dreifach durchbohrten Gummistöpsel. Durch die erste Bohrung führt ein nach außen und abwärts gebogenes Steigrohr *a*, welches bis auf den Boden der Flasche reicht, durch die zweite geht ein kurzes mit Watte verstopftes Luftzuführungsrohr *b* und durch die dritte das Ausflußrohr *c* eines Trichters. An dem nach außen mündenden abgebogenen Ende des Steigrohres ist ein etwa 1,20 bis 1,50 m langer Gummischlauch fest angebracht, der in seinem unteren Ende fest eingebunden eine Metallolive mit Ansatz trägt auf den eine tropfsicher eingeschliffene Injektionsnadel von etwa 10 bis 12 cm Länge paßt. Behufs Sterilisation wird die Hohlnadel entfernt,

das untere Ende des Gummischlauches mit Watte umwickelt und mit der Olive in ein Reagenzglas eingesteckt, der Trichter mit einem Pergamentpapier überbunden und das ganze bei 120° im gespannten Dampf 20 Minuten lang sterilisiert. Will man injizieren, so füllt man zunächst durch den Trichter, 1—2 Stunden im Brutschrank auf 37° vorgewärmte Kochsalzlösung ein, saugt durch von oben nach unten gerichtetes sukzessives Zusammenquetschen des Schlauches mit den Fingern die Flüssigkeit im Steigrohr bis über den toten Punkt und setzt, wenn sie dann gleichmäßig ausfließt, dicht über der Olive einen Quetschhahn auf: es befindet sich demgemäß im Steigrohr bis zur Mündung der Olive nur sterile Kochsalzlösung. Hierauf gießt man durch den Trichter das zu injizierende Kulturquantum ein, was ohne jedes Verspritzen von Flüssigkeit ausgeführt werden kann, und spült mit etwas Kochsalzlösung die benetzten Teile des Trichters ab, so daß keine Kultur auf dem Trichter zurückbleibt: die Flasche ist jetzt zur Injektion bereit. Dem Pferde wird unterdessen die Haut über der Jugularis rasiert, eine Maßnahme, die für Pest dringend anzuraten ist, damit man die Injektionswunde nachher gut übersehen, desinfizieren und mit einem Verband bedecken kann. Nach Waschung der Haut mit Seife, Bürste und Wasser und darauffolgender Desinfektion mit 1 $^0/_0$iger Sublimatlösung wird mit einem um den Hals geschnallten Riemen, der an der Stelle der Jugularis einen untergeschobenen, etwa faustgroßen festen Wattebausch auf die Vene drückt, die notwendige Stauung des Blutgefäßes herbeigeführt. Unter Aufheben einer Hautfalte über der Vene sticht man von oben her zentripedal die in schwacher Boraxlösung unterdessen $^1/_2$ Stunde ausgekochte Hohlnadel ein, setzt, wenn es gleichmäßig aus der Nadel blutet, sofort die Olive fest auf dieselbe auf und umwickelt die Verbindungsstelle mit in Sublimatlösung getauchter Watte. Von einem Gehilfen wird dann die Stauungsumschnürung gelöst und nach Öffnen des auf dem Gummischlauch sitzenden Quetschhahns und Hochheben des Apparates fließt nun zunächst die Kochsalzlösung des Schlauches und hinterher die erwärmte Kulturflüssigkeit ein. Kurz bevor alles eingeflossen ist — d. h. das Steigrohr muß noch in Flüssigkeit tauchen, damit keine Luft in das Gefäßsystem eingepreßt wird — schließt man den Quetschhahn, füllt wieder warme Kochsalzlösung auf und injiziert weiter. Durch Wiederholen dieser Spülungen erreicht man es, daß schließlich nur noch wenige Keime in der zuletzt zu injizierenden Flüssigkeit übrig bleiben; man läßt dann noch soweit einfließen, bis die ersten Luftblasen in das Steigrohr einsteigen, die Flüssigkeit also verbraucht ist und schließt den Quetschhahn. Die Hohlnadel wird hierauf unter festem Andrücken eines großen Sublimatbausches direkt aus der Wunde in diesen Bausch zurückgezogen, etwa austretendes Blut sofort sorgfältig mit Sublimattupfern abgetupft, und endlich durch eine kurze Kompression mit einem solchen Tupfer eine weitere eventuelle Blutung gestillt. Nadel, Schlauch und Infektionsapparat werden sofort nach Herausnahme der Nadel in einen untergehaltenen Holzbottich, der mit 2 $^0/_0$ iger Lysollösung gefüllt ist, eingelegt, nachdem man den Gummistöpsel etwas gelüftet und den Quetschhahn abgenommen hat. In diesem Holzbottich verbleibt der Apparat bis zum nächsten Tage worauf er nach sorgfältiger Abspülung des Lysols wieder montiert und für den nächstmaligen Gebrauch sterilisiert wird; man bedarf natürlich für jede Injektion, wenn man ganz sicher arbeiten will, eines frischen sterilen Apparates. Die Einstichstelle am Halse des Pferdes, die bis zu diesem Zeitpunkt von einem Gehilfen mittels Sub-

limatwattebausch komprimiert wurde, erhält dann einen Jodtinkturstrich (Tinctura jodi 1:4 und ein kleines Wattekollodiumverbändchen).

Im allgemeinen ist bezüglich der Technik dieser Injektionen noch folgendes zu bemerken: Bei der Injektion sollen die Pferde so ruhig wie möglich stehen, damit nicht etwa die Hohlnadel aus der Wunde gerissen wird oder die Verbindung zwischen Nadel und Olive sich lockert. Dies erreicht man zunächst durch die schon vorher angedeutete Ankaufsbedingung, daß die Tiere von Natur aus ruhig sind und ferner durch Einstellen in den sogenannten „Notstand" während der Injektion; es ist dies eine kleine, von vier starken in den Boden eingerammten Holzpfählen, gepolsterten seitlichen Planken und einer festen Vorder- und Hintertür gebildete, gerade der Größe des stehenden Pferdes entsprechende Box (Fig. 2). Dies gilt für die kleineren Injektionen; handelt

Fig. 2. Notstand für Pferde bei kleineren Injektionen und Blutentnahmen. (Modell des Schweizer Serum- und Impf-Institutes.)

es sich jedoch um die Einspritzung eines größeren Quantums Kulturmaterial, also etwa acht, zehn und mehr Kulturen, so ist es besser, das Pferd im Isolierstall mittels einer an Flaschenzügen hängenden Schwebevorrichtung (Suspensionsapparat) zu suspendieren, da die nach derartigen voluminösen Injektionen sehr schnell auftretenden akuten Reaktionen das Pferd oft zu Fall bringen. Das muß wegen der leicht vorkommenden blutenden Verletzungen, die ein unkontrollierbares Austreten von lebenden Pestkeimen aus dem Blut in die Außenwelt veranlassen könnten, unter allen Umständen vermieden werden. Wird das Pferd nach der Injektion ohnmächtig, so kann man es mit dem Suspensionsapparat ganz langsam zu Boden lassen, ohne daß es sich verletzt. Der Suspensionsapparat (Fig. 3) ist am zweckmäßigsten folgendermaßen konstruiert: Eine breite, die ganze Brust- und Unterbauchgegend von der Vorder- bis zur Hinterhand stützende Sacktuchgurte ist in zwei hart-

hölzernen, vielfach durchlöcherten, seitlichen Wagebalken mit starken Stricken befestigt, so daß sie in sich fast den ganzen Rumpf des Pferdes faßt. Nach oben haben diese Wagebalken beide eine starke, durch Stricke hergestellte Verbindung mit dem Haken eines 1 : 6 übersetzten Flaschenzuges, der an einem in der Mitte des Pferdestandes in die Decke eingelassenen Eisenträger aufgehängt ist. Um ein eventuell stattfindendes Heruntergleiten des Pferdes nach vorne oder hinten zu verhindern, ist sowohl vorn um die Brust wie auch um die Hinterhand ein Geschirr aus starken Hanfgurten am Suspensionsapparat befestigt. Nach Anlegung dieses Apparates wird der Flaschenzug so stark angezogen, daß das Pferd vollständig unterstützt dasteht: man ist auf diese Weise in der Lage mit 1—2 Gehilfen das Pferd leicht in Suspension zu erhalten

Fig. 3. Suspensionsapparat zur Unterstützung der Pferde bei voluminösen Injektionen.

und, wenn es zu stürzen droht, langsam zu Boden zu lassen. Den Sturz des Pferdes kann man unter Umständen hintan halten, wenn man dem Tier mit einem großen Schwamm kaltes Wasser auf Hinterhaupt und Nacken appliziert; es sollte deshalb vor jeder Injektion ein Eimer mit kaltem Wasser und einem Schwamm bereit gestellt werden, damit diese Kaltwasserbehandlung sofort gemacht werden kann, wenn es nötig ist.

Wie schon oben angedeutet, sind die zunächst nach den Injektionen auftretenden Reaktionen durchaus akuter bezw. allgemeiner Natur, bestehend in starker Dyspnoe, Unruhe, profusem Schweißausbruch, Schwanken und Unfähigkeit, sich auf den Beinen zu halten, die so stark werden kann, daß die Tiere stürzen*). Hie und da beobachtet man eine dem Ohnmachtsanfall vorhergehende zentrifugal verlaufende Pulsation im Venensystem, die mit Zurückgehen der Erscheinungen ebenfalls allmählich abblaßt. Stürzt das Tier, so bleibt es meist 10, 15 bis 20 Minuten unter starken dyspnoetischen Beschwerden am Boden liegen, erholt sich dann

*) Siehe v. Stenitzer u. Doerr, dieses Handbuch über Anaphylaxe.

aber ziemlich schnell wieder, so daß es meist nach einer halben Stunde wieder aufgestanden ist.

Eine zweite Serie von Reaktionserscheinungen tritt nun vom Abend des Injektionstages an auf: Unruhe, Freßunlust, Schüttelfröste, Temperatursteigerungen, profuse Durchfälle und ödematöse Schwellungen der Extremitäten namentlich an den Gelenkpartien. Was die Dauer dieser Erscheinungen anlangt, so können sich dieselben namentlich im Anfang der Immunisierung bis über 2 Wochen erstrecken; mit zunehmender Höhe des Immunitätsgrades werden diese Zeiten immer kürzer und dauern nur noch 3—5 Tage. Trotzdem ist es gut, den Tieren zwischen den Injektionen je nach Maßgabe etwas Erholung zu gönnen, jedenfalls sprechen die bisher gemachten Erfahrungen entschieden für dieses Vorgehen. Eine besondere Erholungszeit muß den Pferden zuteil werden, wenn die wöchentlich vorgenommenen Wägungen der Tiere ein permanentes Sinken des Gewichts ergeben.

Alle intravenösen Injektionen mit lebenden Pestkulturen sollten im Isolierstall vorgenommen werden, dessen Bauart im Prinzip folgende Punkte zu berücksichtigen hätte. Die äußere Konstruktion (Mauern, Türen, Fenster, Ventilations- und Exkrementabfuhröffnungen) sollte eine derartige sein, daß das Einwandern von Ratten nnd andern Tieren möglichst ausgeschlossen ist. Ferner sind im Stalle anzubringen:

1. dunkle, nur künstlich von Innen zu beleuchtende Eintrittsvorräume, die das Eindringen von Fliegen und Bremsen in den eigentlichen Stall hindern, mit Doppeltüren, die sich nicht zu gleicher Zeit öffnen lassen; in diesen Räumen sind zugleich Umkleidegelegenheiten und Desinfektionseinrichtungen für das ein- resp. austretende Personal vorhanden,
2. fliegensichere Fenstervergitterungen und Ventilationsöffnungen,
3. ein System geschlossener Einzelstallungen zur Isolierung injizierter Pferde,
4. Suspensionseinrichtungen in den Stallungen,
5. Große Operationshalle mit Notstand für die Injektionen und großem aufklappbaren Operationstisch für die Entblutungen (siehe Fig. 4).

Ein sehr wesentlicher Punkt, der bei der Anlage eines Isolierstalles für Pestserumpferde in Betracht kommt, ist die möglichst baldige Desinfektion des Mistes und des Urins innerhalb des Stalles. Dies geschieht in einer auszementierten Grube, in welcher Mist und Urin mit Kalkmilch versetzt werden und einige Zeit in Kontakt bleiben. Alle Stände müssen in der Bodenpflasterung ein starkes Gefälle nach hinten zur Stallgassenrinne aufweisen, welch letztere selbst ebenfalls durch starkes Gefälle sich schnell in die Grube entleeren kann. Die Grube selbst hat in einer gewissen Höhe einen Überlauf, der die überschüssige, desinfizierte Flüssigkeit in die Kanalisation ablaufen läßt. Die Streu in den Stallungen sei Torf, auf dem man den abgebauten Mist gut sieht und leicht wegnehmen kann zum Transport in die Grube und der auch noch die gute Eigenschaft aufweist, daß er die Überläufe nicht so leicht verstopft wie Stroh. Futtervorräte dürfen, weil sie Nagetiere anlocken, nicht im Stalle gehalten werden, sondern müssen jedesmal von außen oder besser von oben aus dem ratten- und mäusesicher abgesperrten Dachstock in die isolierte Futterkammer eingebracht werden, von wo die Verteilung an die einzelnen Tiere zu erfolgen hat.

14 Tage bis 3 Wochen nach der letzten Kulturinjektion, also zu einer Zeit, wo man absolut sicher sein kann, daß kein freies Toxin und

keine lebenden Bakterien mehr im Blut zirkulieren, und nachdem man sich vorher durch in gewissen Zwischenräumen eingeschaltete Agglutinations- und Wertigkeitsproben von dem Fortschritt der Immunisation überzeugt hat, wird das Pferd durch Hungern am Morgen zur Blutentnahme vorbereitet, damit keine Darmbakterien, die beim Pferd bekanntlich nach jeder Nahrungsaufnahme ins Blut übertreten, das Blut resp. das daraus zu gewinnende Serum infizieren. Nach Einstellung des Tieres in den Notstand wird die Haut über der Jugularis externa rasiert, mit Seife, Bürste und Wasser gereinigt und mit 1 ‰iger Sublimatlösung desinfiziert. Nach Anlegung eines kleinen Schnittes über der Vene wird durch diesen ein Kanülentroikard in die vorher mittels Riemen und

Fig. 4. Großer aufklappbarer Operationstisch mit angestelltem Pferd für totale Entblutungen.
(Modell des Schweizer Serum- und Impf-Institutes.)

untergelegtem Wattebausch gestaute Vene eingestochen und nach Herausziehen des Troikards an die Kanüle ein Gummischlauch mit Ansatzolive und Ausflußglasrohr (alles vorher in gespanntem Dampf sterilisiert) angesetzt, worauf man das Blut in bereitstehende sterilisierte große Glaßtöpfe einfließen läßt. Die Glastöpfe haben zylindrisches Format mit flachem Boden, 2 Liter Inhalt und tragen oben von innen nach außen folgende Bedeckungen:

1. ein Pergamentpapier, welches fest auf die Öffnung des Topfes aufgebunden ist,

2. einen darüber ziemlich dicht passenden Metalldeckel mit umgebogenem Rand von galvanisiertem Zink mit einer in der Decke seitlich an der Peripherie liegenden, etwa 1.5 cm weiten runden Öffnung,

3. ein Pergamentpapier, welches wieder fest über diesen Deckel gebunden ist.

Um das Blut einlaufen zu lassen, wird das obere Pergamentpapier weggenommen, mit dem Ausflußglasrohr durch die Öffnung im Zinkdeckel

hindurch das untere Pergamentpapier durchstoßen, worauf man das Blut fließen lassen kann, bis der Topf gefüllt ist; er wird dann, je nach Maßgabe des gewollten Quantums, durch einen andern ersetzt, nach vorheriger durch Drehung des Metalldeckels erfolgter Bedeckung der Öffnung im Papier und Überbinden des unter 3. erwähnten Pergamentpapiers.

Unter gewissen Umständen kann es notwendig werden, Pferde total zu entbluten, z. B. wenn die Pferde ihre letzte Immunitätskampagne beendigt haben bzw. nicht mehr geeignet sind zu neuer Immunisierung. Zu diesem Zweck wird das Tier in der vorher desinfizierten Operationshalle des Isolierstalles vermittels des auf- und abklappbaren Operationstisches (siehe Fig. 5) schonend umgelegt und auf dem Tischblatt fixiert. Nach Rasieren, Reinigung und Desinfektion der Halspartie über der Drosselfurche, wie oben schon bemerkt, wird unter Vermeidung der Jugularis externa die von derselben nach innen und oben liegende Karotis aufgesucht, auf etwa 5—6 cm herausgehoben und unter Schonung des abpräparierten Vagus peripherwärts unterbunden (starker Seidenfaden) und zentralwärts in einer Entfernung von 4 bis 5 cm von der ersten Ligatur eine Péansche Klammer angelegt. In das zwischenliegende Stück des Gefäßes (dasselbe hat manchmal etwa Daumendicke) wird nun eine passende Troikardkanüle fest eingebunden und mittels seitlicher Ligaturen ihr Verbleiben im Gefäß gesichert. Nach Aufsetzen des zugehörigen, mit Olive und Ausflußglasrohr montierten Gummischlauches wird der Péan abgenommen und das ausfließende Blut bis zum Tode des Pferdes in Töpfen aufgefangen. Auf diese Weise erhält man in schonendster Weise das Maximum des Körperblutes des Tieres und kann das Blut vollständig aseptisch auffangen.

Das Blut wird sofort in besonders zu diesem Zweck auf etwa 20° C gewärmten Räumen aufgestellt, damit eine gute Koagulation und Abscheidung des Serums stattfindet. Nach 24 Stunden wird das Serum steril abpipettiert und in große Gefäße gebracht. Hier erhält es einen Zusatz von 0,4—0,5 % Phenol und kommt zur Klärung längere Zeit in den Kühlraum. Nachdem der Klärungsprozeß vollendet ist, wird das Serum in sterile Ein- oder Zweiliterflaschen umgefüllt, von wo es in die abschmelzbaren Glaszylinder eingefüllt werden kann. Diese letzteren haben 10 bis 20 ccm Inhalt mit einer Kapillare, die nach Einfüllung des Serums sofort zugeschmolzen wird, was eine keimfreie Aufbewahrung des Serums und seine Transportfähigkeit auch auf weiten Reisen garantiert. Aus den Glasgefäßen kann der Arzt mit Leichtigkeit nach Abbrechen der angefeilten Kapillare das Serum in seine Injektionsspritze aufsaugen.

Literatur.

Deutsch und Feistmantel, Impfstoffe und Sera. Leipzig 1903.

Dieudonné, Immunität bei Pest. Handbuch von Kolle-Wassermann, Bd. IV und Ergänzungsband II.

Ders., Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie. Leipzig 1908 J. Barth.

Dönitz, Wertbemessung der Schutz- und Heilsera. Handbuch von Kolle-Wassermann, Bd. IV.

Friedberger, Die bakteriziden Sera. Handbuch von Kolle-Wassermann, Bd. IV.

Kolle und Martini, Über Pest. Deutsche med. Wochenschr. 1902.

Kolle und Otto, Untersuchungen über die Pestimmunität. Zeitschr. für Hyg. 1904, Bd. XLV.

Kolle, Hetsch und Otto, Weitere Untersuchungen über Pest, im besonderen über Pestimmunität. Zeitschr. für Hygiene 1904, Bd. XLVIII.

Marx, Diagnostik, Serumtherapie und Prophylaxe. Berlin 1902. Hirschwald.
Metschnikoff, Sur la peste bubonique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1897.
Otto, Die staatliche Prüfung der Heilsera. Jena 1906.
Tavel, Krumbein und Glücksmann, Über Pestschutzmaßregeln. Zeitschrift für Hygiene 1902, Bd. XL.
Yersin, Calmette und Borrel, Ann. de l'Inst. Pasteur 1895, Tome IX.
Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1897, Tome XI und 1899, Tome XIII.
Lustig, Sieroterapia e vaccin prev. contro la peste. Turin 1899.
Roux, Sem. med. Paris 1897.
Markl, Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVII und 1903, Bd. XLII; Wiener med. Wochenschr. 1900; Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXIX.
van Ermengem, Bull. de l'acad. de Belg. 1900.
Kolle und Martini, Deutsche med. Wochenschr. 1902.
Report of the Indian plague Commission 1898—1899, Vol. V. London 1901.
Yersin, Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII.
Calmette und Salimbeni, Ann de l'Inst. Pasteur 1900.
Calmette, Hyg. Rundschau 1901, Bd. XI.
Kitasato, Takaki, Shiga und Moriga, Bericht über die Pest in Kobe und Baka. Tokio 1900.
Wyssokowitz und Zabolotny, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897.
Bericht der Deutschen Pestkommission. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 1899, Bd. XVI.
Clemour, The Lancet 1899.
Schottelius, Hyg. Rundschau 1901, Bd. XI.
Kossel und Frosch, Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 1900, Bd. XVII.
Vagedes, Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 1900, Bd. XVII.
Reiche, Münchener med. Wochenschr. 1900.
Gottschlich, Zeitschr. für Hygiene 1900, Bd. XXXV.
Havelburg, Berliner klin. Wochenschr. 1901.
Lignières, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901.
Koch, R., v. Behring, Pfeiffer, R., Kolle und Martin, Berichte über die Wertbestimmung des Pariser Pestserums. Klinisches Jahrbuch 1902, Bd. IX.
Martini, Klinisches Jahrbuch 1902, Bd. X.
Hetsch und Otto, Klinisches Jahrbuch 1903, Bd. XI.
Polverini, Münchener med. Wochenschr. 1903.
Kolle und Otto, Zeitschr. für Hygiene 1902, Bd. XL.
Choksy, Transact. Bombay Med. soc. 1900. Ref. Münchener med. Wochenschr. 1901.
Hahn, Berliner klin. Wochenschr. 1901.
Tavel, Krumbein und Glücksmann, Zeitschr. für Hygiene 1902, Bd. XL.
Kolle, Festschrift zu R. Kochs 60. Geburtstag. Jena 1903. Gustav Fischer.
Kraus, Wiener klin. Wochenschr. 1897.
Zabolotny, Arch. des sciences biol. de St. Petersbourg 1901.
Madsen, Centralbl. für Bakt., Bd. XLVI, Nr. 3. Original.
Choksy, Report on the treatment of plague during 1905. Bombay 1906.
Terni, Zeitschr. für Hygiene 1906, Bd. LIV.
Bannermann, Scientific Memoirs by officers of the Med. and 8 au Dep. of the Governement of India. Nr. 20. Calcutta 1905.
Kitasato, Philippine Journal of Science 1906. Ref. Münchener med. Wochenschrift 1907.
Mallauah, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLII. Original.
Markl, Zeitschr. für Hygiene 1903, Bd. II.
Löhlein, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XXXVIII. Referat.
Otto, Charité-Annalen 1904, Bd. XXVIII.

XXI.

Streptokokkenserum.

Von

Dr. Josef Schwoner

in Wien.

Bei der großen Anzahl von schweren Erkrankungen, welche durch Streptokokken hervorgerufen werden, war es natürlich, daß sich nach der bedeutenden Entdeckung BEHRINGS über das Diphtherieserum eine Anzahl von Forschern mit dem Studium der Streptokokkenimmunität und mit der Gewinnung eines Streptokokkenheilserums beschäftigte. BEHRING und MARMOREK waren die ersten, welche das Auftreten von spezifischen Immunstoffen im Serum von mit Streptokokken vorbehandelten Tieren nachweisen konnten. MARMOREK behandelte seine Pferde mit einem Streptokokkus, von Scharlachkranken gewonnen, welcher durch Kaninchenpassage hochvirulent gemacht wurde. Dieses Serum repräsentiert den Typus des „monovalenten Streptokokkenserums" und wurde von MARMOREK zur Behandlung sämtlicher Streptokokkenerkrankungen empfohlen. Die Resultate, die mit diesem Serum gewonnen wurden, waren wechselnd und auch von Mißerfolgen begleitet, so daß das MARMOREKsche Serum speziell in Deutschland nach kurzer Zeit der Vergessenheit anheimfiel. MARMOREK vertrat die Lehre von der Arteinheit sämtlicher für den Menschen pathogenen Streptokokken und suchte im Jahre 1902 neue Beweise für seine Anschauung zu erbringen. Zu diesem Zwecke studierte MARMOREK das hämolytische Verhalten, das Wachstum in Streptokokkenfiltraten, und die Wirkung des antitoxischen Serums, welches mit dem Toxin seiner virulenten Kultur gewonnen war. Hierbei fand MARMOREK, daß sich sämtliche untersuchten Streptokokkenstämme, herrührend vom Erysipel, Wochenbettfieber, Scharlachangina, Masernpneumonie, Phlegmone, Tuberkulose, ganz gleich verhielten, nur der Streptokokkus von Scharlach zeigte geringe quantitative Unterschiede, der Streptokokkus der Druse zeigte dagegen ein ganz anderes Verhalten, so daß MARMOREK denselben von den menschlichen Streptokokken absondert. Im Gegensatz zu MARMOREK vertrat DENYS den Standpunkt, daß die zur Immunisierung verwendeten Streptokokkenstämme möglichst frisch dem menschlichen Körper entnommen sein sollen und sein Schüler VAN DE VELDE, der die Anschauung von der Verschiedenheit der menschlichen Streptokokken vertritt, immunsierte ein Pferd mit möglichst verschiedenartigen, virulenten

Streptokokken und gewann auf diese Weise ein „polyvalentes Streptokokkenserum“. Jedoch auch dieses Serum konnte sich in der Praxis keine Anerkennung verschaffen und auch die experimentellen Ergebnisse führten zu keinem befriedigenden Resultate. Aronson unterzog das Mamorek sche Serum einer Nachprüfung und fand es hierbei seinen Streptokokken gegenüber völlig unwirksam, dagegen gelang es ihm mittels virulenter (durch Tierpassage) Streptokokken ein Serum vom Pferd zu gewinnen, welches in der Dosis von 0,2—0,4 ccm präventiv eingespritzt, ein Kaninchen von 1000 g gegen die 10fach letale Streptokokkendosis schützte. Dieses Serum wurde von Baginsky in Berlin und von Bokay in Pest bei Scarlatina angewandt und die damit erzielten Resultate bezeichnet Aronson als „durchaus ermutigende“. Petruschky konnte gleichfalls im Serum Marmorek keine Schutzwirkung gegenüber 3 Streptokokkenstämmen, darunter der Originalstamm Marmorek, nachweisen und spricht demselben jede Berechtigung zur Anwendung am Krankenbette ab. Baginsky behandelte mit dem Marmorek schen Serum 57 Fälle von Scharlach, wobei kein günstiger Einfluß auf den Verlauf der Krankheit zu bemerken war. Im Jahre 1901 berichtet Tavel gemeinsam mit Krumbein über ein neues Streptokokkenserum, das sich von den bisher genannten dadurch unterscheidet, daß zur Immunsierung der Tiere möglichst viele verschiedene, direkt vom Menschen stammende Streptokokkenstämme verwendet wurden. Nach den Beobachtungen von Koch und Petruschky hatte der durch Tierpassage für das Kaninchen hochvirulente Streptokokkus für den Menschen jede Pathogenität verloren, so daß Tavel und sein Mitarbeiter vermuteten, daß die mit tierpassierten und tiervirulenten Stämmen gewonnenen Sera wohl eine Schutzwirkung für das Tier, aber nicht für den Menschen besitzen. Auf demselben Prinzipe beruhend ließ Menzer 1902 sein Serum herstellen, welches mit Anginastreptokokken von frischem Gelenkrheumatismus gewonnen wird. Beiläufig um dieselbe Zeit nahm Aronson seine im Jahre 1896 begonnenen Versuche wieder auf und berichtet über ein Antistreptokokkenserum, das er von Pferden durch Behandlung mittels hochvirulenter, tierpassierter Scharlachstreptokokken gewann. Dieses Serum wurde von Marmorek an weißen Mäusen und Kaninchen geprüft und erwies sich sowohl prophylaktisch als auch kurativ hoch wirksam. Dieses Serum beruht wieder auf dem Prinzipe der Arteinheit sämtlicher Streptokokken und wurde von Aronson zur Behandlung sämtlicher Streptokokkenerkrankungen empfohlen. Baginsky hat dieses neue Aronson sche Serum bei scharlachkranken Kindern angewendet und über seine Ergebnisse auf der Karlsbader Naturforscherversammlung berichtet, die damit erzielten Resultate waren vollständig unbefriedigend. Baginsky hebt hauptsächlich gewisse Nachteile und Gefahren (Milz- und Leberschwellung, Gelenkaffektionen bei hohem Fieber, Albuminurie) hervor, die die Verwendung von größeren Dosen mit sich brachte. 3 Monate später sind die Ansichten Baginskys über die Anwendung des Aronson schen Serums bei Scharlach etwas hoffnungsfreudiger, wobei er als günstige Wirkung die langsame Entfieberung, das rasche Verschwinden der Pharynxsymptome und das Abblassen des Exanthems hervorhebt. Beinahe zur selben Zeit, auf der Karlsbader Naturforscherversammlung 1904, publiziert Moser die Darstellung und Anwendung eines neuen Streptokokkenserums, des Scharlachstreptokokkenserums. Moser verwendete zur Behandlung der Pferde zahlreiche, aus dem Herzblut Scharlachkranker gezüchtete Streptokokken, die keinen Tierkörper passierten. Diesem Serum schreibt Moser eine

spezifische Heilwirkung auf den Scharlachprozeß zu und hebt als sichtbaren Effekt bei rechtzeitiger Serumanwendung und genügender Dosis Abfall von Puls und Temperatur, rasches Schwinden des Exanthems und Besserung des Allgemeinbefindens sowie ein Schwinden der nervösen Erscheinungen hervor. Von der Ansicht der strengen Spezifität der Streptokokken ausgehend, immunisierte PIORKOWSKY Pferde mit Drusenstreptokokken und berichtet über günstige Erfolge bei Anwendung dieses Serums bei der Pferdedruse, eine durch Streptokokken hervorgerufene kontagiöse eitrige Affektion des Nasenrachenraumes. Auf dem TAVELschen Prinzip fußend, ließ PALTAUF im Jahre 1903 ein Antistreptokokkenserum herstellen, das durch Behandlung eines Pferdes mit verschiedenen frischen von Puerperalprozessen und anderen menschlichen Streptokokkeninfektionen herrührenden Streptokokkenkulturen gewonnen wurde. Mit diesem Serum behandelte PEHAM an der CHROBAKschen Klinik Puerperalinfektionen und hatte glänzende Resultate zu verzeichnen. Bei der Nachprüfung der MOSERschen Versuche fand ARONSON die Tatsache, daß Pferde, die bereits mit hochvirulenten Streptokokken immunisiert waren, auf die Einspritzung größerer Mengen menschlicher Streptokokken noch reagieren und zog daraus den Schluß, daß neue Antikörper gebildet werden. Er behandelte danach seine Pferde zum Teil mit passierten, hochvirulenten, zum Teil mit unpassierten direkt vom Menschen stammenden Streptokokken. Von ähnlichen Gedanken geleitet erzeugt RUPPEL in Höchst ein Antistreptokokkenserum für den Menschen und ein Druseserum sowie BESREDKA im Institut Pasteur. In allerletzter Zeit sind in Rußland nach den Angaben MOSERs verschiedene Scharlachstreptokokkensera dargestellt worden (GABRITSCHEWSKY).

Wenn man die angeführten Tatsachen überblickt, so sind zur Gewinnung von Streptokokkensera 4 verschiedene Wege eingeschlagen worden. Die einen (MARMOREK und ARONSON) benutzten nur einen einzigen Stamm — monovalentes Serum, die anderen, und zwar die Mehrzahl (DENYS, VAN DE VELDE, ARONSON, TAVEL, MOSER, MENZER, RUPPEL) eine große Anzahl verschiedener Streptokokken — polyvalente Sera. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist, daß die einen direkt von Menschen stammende, in künstlichen Nährböden gezüchtete Kulturen (TAVEL, MOSER, MENZER), die anderen durch Tierpassage künstlich virulente Stämme (MARMOREK, ARONSON, DENYS) zur Immunisierung der Pferde verwenden. Diese verschiedenen Methoden finden ihre Erklärung in der Streitfrage, ob alle Streptokokken als gleichwertig, als eine Einheit aufzufassen sind oder ob eine Unterscheidung in einzelne Streptokokkenarten zulässig ist. Zur Entscheidung dieser Frage wurde ursprünglich das Wachstum, die Bildung langer oder kurzer Ketten, sowie die Virulenz für Tiere herangezogen, ohne daß es zu einem abschließenden Urteil gekommen wäre. Es war daher sehr natürlich, daß die feineren biologischen Reaktionen, wie die Agglutination und die Hämolysinproduktion, zur Klärung dieser Frage herangezogen wurden. Als erster studierte VAN DE VELDE die Agglutination der Streptokokken und fand, daß das Serum des immunisierten Tieres nur den homologen Stamm agglutiniert, er betonte daher die Notwendigkeit eines polyvalenten Serums. ARONSON prüfte sein mit einem hochvirulenten, tierpassierten Streptokokkus gewonnenes Serum an verschiedenen Stämmen und fand, daß sein Serum alle untersuchten Stämme in gleicher Verdünnung (1:30) vollkommen agglutiniert. Zu einem ganz entgegengesetzten Resultat kam MEYER, der mittels der Agglutination die Strepto-

kokken der Anginen von denen der pyogenen Infektion trennt und mit dem Serum Aronson nur den Originalstamm Aronson und seine Stämme nach einigen Tierpassagen agglutinieren konnte; auf letztere Tatsache werden wir später nochmals zurückkommen. Moser und v. Pirquet konnten mit Hilfe eines Immunserums, das durch Scharlachstreptokokken gewonnen war, Streptokokken aus Scharlachblut in spezifischer Weise agglutinieren, Streptokokken anderer Herkunft dagegen in denselben Verdünnungen, wie mit normalem Pferdeserum. Nach den Versuchen von Neufeld spielt die Virulenz der Streptokokken eine große Rolle bei der Agglutination. Neufeld beobachtete, daß ein hochvirulenter Stamm, der von Moserschem Serum bei der Verdünnung 1:500 vollständig agglutiniert wurde, nach wochenlangem Stehen im Laboratorium seine Virulenz einbüßte und jetzt bei der Verdünnung 1:20000 vollständige Agglutination aufwies. Aus diesem Versuch schließt Neufeld die Folgerung, daß durch Agglutinationsversuche die Spezifität der Scharlachstreptokokken nicht erwiesen ist. Fischer neigt zu der Anschauung, daß die Agglutination den Beweis für eine große Multiplizität der Streptokokkenstämme erbringt, wogegen Zelenski eine Trennung und Unterscheidung der Streptokokken mit Hilfe der Agglutination nicht für richtig hält. Piorkowski agglutinierte mit seinem Druseserum die homologen Streptokokken bei 1:100, die Streptokokken von Anginen gar nicht, andere pyogene Streptokokken bei 1:25. Ruppel dagegen erklärt, daß seine 3 Streptokokkensera, die in ihrer Darstellung, wie oben angedeutet, grundverschieden sind, in bezug auf ihr Agglutinationsvermögen keine Unterschiede aufweisen. Silberstrom versuchte die von Schottmüller gemachte Einteilung der Streptokokken — Streptococcus pyogenes-mitior-mucosus — mit Hilfe der Agglutination zu stützen, was ihm aber nicht gelang, da ein mit einem Streptococcus pyogenes gewonnenes Serum nur diesen Stamm und nicht andere Kulturen von Streptococcus pyogenes agglutinierte.

Nach meinen eigenen, gemeinsam mit Moser ausgeführten Agglutinationsversuchen komme ich zu dem Endresultat, daß die Agglutination, makroskopisch ausgeführt, eine strenge Spezifität der einzelnen Streptokokken nicht zuläßt. Es ist darauf zu achten, daß sich ein und derselbe Stamm gegenüber ein und demselben Serum zu verschiedenen Zeiten verschieden verhält, daß ein Streptokokkus, frisch aus dem Tierkörper gezüchtet, schwer agglutinabel ist und nach längerer Züchtung in künstlichen Nährböden bei hohen Verdünnungen Agglutination gibt. Gleichzeitig konnten wir die Angaben Meyers bestätigen, daß ein Streptokokkus, der von einem Serum bei der Verdünnung 1:10000 vollständig agglutiniert wurde, nach mehreren Tierpassagen sich demselben Serum gegenüber vollständig refraktär verhält.

Nach einem wirksamen Toxin der Streptokokken ist schon lange von allen Bearbeitern der Streptokokkenfrage gefahndet worden, aber eigentlich bis zum heutigen Tage ohne Erfolg. Nur Marmorek, Simon und in letzter Zeit Sawtschenko in Kasan berichten über Giftstoffe in den bakterienfreien Filtraten von Streptokokken. Marmorek empfiehlt zur Toxingewinnung folgenden Nährboden: 0,4 g Leucin werden zu 150 g Bouillon gesetzt, letztere auf 60° erwärmt und durch Porzellanfilter filtriert; hierauf werden 100 g Bouillon mit 0,5 g Glykokoll vermischt, ebenfalls erwärmt und filtriert; von diesen beiden Lösungen kommen je 10 g auf 250 g Peptonbouillon. Nach 8tägigem Verweilen im Brutofen wird die Kultur filtriert, wovon 0,25—0,5 ccm Kaninchen töten. Simon bekam ein schwaches Toxin in den Filtraten anaerober

Bouillonkultur, welcher leukocytenhaltiges Exudat beigemischt war. Manfredi und Traversa beschreiben ein Toxin, welches sie von Erysipelstreptokokken nach 10—30tägigem Wachstum bei 25—30° gewinnen konnten und welches bei Meerschweinchen und Kaninchen paralytische Erscheinungen hervorrief, außerdem berichten Roger, Schenk, v. Lingelsheim, Baginsky und Sommerfeld, sowie Mannier über toxische Wirkung von Streptokokkenfiltraten. Des weiteren wurde von v. Lingelsheim, Aronson und Simon nach ungelösten toxischen Substanzen der Kokkenleiber gefahndet, ohne daß diese Untersuchungen immer ein positives Resultat ergeben hätten. Ein Hämolysin der Streptokokken beschrieben Schlesinger, Rieke, Marmorek, Kerner, Besredka und Schottmüller. Dieses Lysin ist nach den meisten Autoren an die Bakterienzelle gebunden, steht in gewissen Beziehungen zur Virulenz und wird nicht von allen Streptokokken gebildet. Besredka gewann aus Streptokokken, die in auf 55° erhitztem Kaninchenserum kultiviert waren, ein hämolytisch wirksames Filtrat, das auf Tiere nicht toxisch wirkt und kein Antihämolysin erzeugt. Moser und ich haben eine große Anzahl von Scharlachstämmen nebst anderen Streptokokken in bezug auf ihr hämolytisches Verhalten geprüft und fanden, daß die untersuchten Stämme gar keine Gesetzmäßigkeit zeigten. Wir konnten in den Filtraten das Hämolysin nicht nachweisen und die verschiedenen Scharlach- und Streptokokkensera zeigten kein Antilysin.

Zangemeister und Meissl versuchten mit Hilfe der Immunisierungsmethode den Beweis für die Arteinheit der Streptokokken zu erbringen. Es gelang ihnen auch, mit jedem saprophytischen Vaginalstamm Tiere gegen jedweden pyogenen Streptokokkus zu schützen. Die Frage der Einheit oder Vielheit der Streptokokken ist also auch auf diesem Wege nicht mit Sicherheit zu entscheiden, die angeführten Tatsachen sprechen nur für meine bereits früher auseinandergesetzte Anschauung, daß alle Streptokokken eine Arteinheit bilden, wobei aber einzelne Stämme, ätiologisch gleichwertig, verschiedene Eigenschaften besitzen können. Von diesen Anschauungen ausgehend, müssen wir die Forderung aufstellen, daß zur Behandlung der Streptokokkenerkrankungen nur polyvalente Sera verwendet werden, d. h. Sera, welche durch Immunisierung der Pferde mit möglichst vielen Streptokokkenstämmmen gewonnen werden.

Eine weitere wichtige Frage ist die, ob zur Immunisierung durch Tierpassage virulent gemachte Stämme verwendet werden sollten. Wir haben bereits früher erwähnt, daß nach den Beobachtungen von Koch und Petruschky der durch Tierpassage hochvirulente Streptokokkus beim Menschen selbst in großen Dosen (10 ccm) keine Reaktion hervorrufen konnte; weiter haben wir mitgeteilt, daß sich tierpassierte Stämme einem agglutinierenden Serum gegenüber beinahe vollständig refraktär verhalten haben, und schließlich haben wir die Tatsache zu verzeichnen, daß das mit dem hochvirulenten Stamm gewonnene Serum wohl Schutzstoffe für das gleiche Tier, aber nicht für den Menschen enthielt. Diese Tatsachen lassen wohl die Vermutung zu, daß durch die Tierpassage das Bakterium gewisse Veränderungen erleidet. Meyer glaubt, daß es sich um eine Änderung chemischer Natur handelt, daß die Rezeptoren der Bakterienzelle umgestaltet werden und dementsprechend die gewonnenen Immunkörper auf den ursprünglichen Rezeptorenapparat nicht passen. Daher forderte Tavel und nach ihm Moser und Menzer die Anwendung direkt vom Menschen stammender Streptokokken zu Immunisierungs-

zwecken, und wie wir oben gesehen haben, hat sich auch Aronson zum Teil dieser Anschauung angeschlossen. Simon nimmt zwischen den beiden Lagern — passierte und nicht passierte Streptokokken zur Immunisierung zu verwenden — eine Mittelstellung ein. Nach seinen Versuchen ist es notwendig, Stämme zur Immunisierung zu verwenden, welche zwar Tiere passiert, dabei jedoch „immunisierende Substanzen von menschen pathogener Form besitzen“. Diese Sera können auch experimentell geprüft werden, da sie sich im Tierversuch als wirksam erweisen.

Was die Art der Serumwirkung betrifft, sind die Ansichten darüber noch sehr geteilt und lassen die diesbezüglichen experimentellen Arbeiten keine eindeutige Lösung zu. Mit dem Mechanismus der Streptokokkenimmunität hat sich besonders die französische Schule beschäftigt und auf die wichtige Rolle der Phagocyten hingewiesen. Denys u. Leclef fanden im Blutserum immunisierter Kaninchen antiinfektiöse Eigenschaften, daß heißt es werden die Streptokokken sowohl im Tierkörper wie im Reagenzglase abgetötet und die Leukocyten haben die Aufgabe, die abgetöteten Bakterienleiber fortzuschaffen. Nach den Arbeiten von Denys u. Marchand, Denys, Bordet übt das Streptokokkenserum auf die Leukocyten eine stimulierende Wirkung in der Art aus, daß sie die Infektionserreger durch Phagocytose vernichten. Aronson läßt die Frage der Serumwirkung offen, vermißte auch bei seinem Serum eine direkte Einwirkung auf die Streptokokken und glaubt aus der großen Widerstandsfähigkeit des Serums gegenüber hohen Temperaturen (60°) auf die Zugehörigkeit der betreffenden Antikörper in die Gruppe der Ehrlichschen Amboceptoren schließen zu dürfen. Meyer und Menzer haben die von Pfeiffer für die Cholera und Typhusbazillen gefundene Endotoxinlehre auf die Streptokokkenimmunität übertragen. Demzufolge verbinden sich die im Streptokokkenserum vorhandenen Immunkörper mit den Bakterien, schädigen dieselben und bewirken dadurch ein freiwerden der intracellulären Gifte, welche von den Antitoxinen des Serums und den Leukocyten gebunden werden; gleichzeitig übernehmen die Leukocyten die Aufgabe, die Leiber der abgetöteten Bakterien fortzuschaffen. Neufeld und Rimpau konnten mit Hilfe des Absorptionsversuches nach Ehrlich-Morgenroth den Beweis erbringen, daß das Serum nicht auf die Leukocyten, sondern die Kokken verändernt einwirkt. Das Serum geht mit den Bakterien eine spezifische Bindung ein, wodurch dieselben der Phagocytose zugänglich gemacht werden. Die Autoren bezeichnen solche Sera als „bakteriotrope“. Wright hat dasselbe Phaenomen beobachtet und nennt diejenige Substanz, welche die Phagocytose befördert, „opsonische“ Substanz und die entsprechenden Elemente im Serum „Opsonine“ (von opsono = ich mache schmackhaft). (Siehe Opsonine Levaditi.)*)

Von theoretischen Interesse sind die Versuche Gabritschewskys Menschen und Tiere mit einem Streptokokkenvaccin aktiv zu immunisieren. Gabritschewsky verwendet als Vaccin eine konzentrierte Bouillonkultur von Streptokokken, durch Erhitzen bis auf 60° C abgetötet und mit 0,5 %igen Phenol versetzt. Als Dosis wird 0,5 cm steigend bis auf 1,5 cm in Intervallen von 7—10 Tagen angewendet. Dieses keimfreie Vaccin versuchte Langowoy bei 134 Kindern mit äußerst günstigem Resultate und hebt die vollstänge Gefahrlosigkeit des Vaccins hervor.

---

*) Siehe Bd. II, pag. 342.

Nachdem ich jetzt die Geschichte der Streptokokkenserumtherapie nebst den dazu gehörigen theoretischen Fragen besprochen habe, komme ich nun zur Darstellung und Auswertung desselben; bevor ich damit beginne will ich nochmals die derzeit wichtigsten, im Handel vorkommenden Streptokokkenseren zusammenstellen:

1. Serum MARMOREK, monovalent, mit tierpassiertem Stamm gewonnen, dargestellt im Institut Pasteur-Paris;
2. Serum DENYS-VAN DE VELDE, mono- und polyvalent, mit tierpassierten Stämmen gewonnen, erzeugt in Louvain-Belgien;
3. Serum ARONSON, mono- und polyvalent, mit tierpassierten und unpassierten Stämmen gewonnen, dargestellt bei Schering-Berlin;
4. Serum TAVEL, polyvalent, mit unpassierten Stämmen gewonnen, dargestellt in der Schweiz:
5. Serum MENZER, monovalent, mit unpassierten Stämmen gewonnen, erzeugt bei Merk-Darmstadt;
6. Serum MOSER, polyvalent, mit unpassierten Scharlachstreptokokken gewonnen, erzeugt im Seruminstitut Wien;
7. Serum PALTAUF, polyvalent, mit unpassierten Stämmen gewonnen, erzeugt im Seruminstitut Wien;
8. Serum HÖCHST, polyvalent, mit passierten und unpassierten Stämmen gewonnen, erzeugt in den Höchster Farbwerken.

Serumdarstellung.

Zur Gewinnung der Streptokokkenseren für praktische Zwecke werden derzeit nur Pferde verwendet.

Die zur Immunisierung der Pferde zu verwendenden Streptokokken werden aus den jeweiligen Organen (Rachen, Blut, Eiter usw.) auf Agar rein gezüchtet, dann in Bouillon verimpft und jedesmal auf ihre Virulenz gegenüber weißen Mäusen geprüft. Hierbei ereignet es sich leider sehr häufig, daß sich ein Streptokokkus nach der ersten Überimpfung nicht mehr weiter entwickelt, wenn auch für seine Züchtung die geeignetsten Nährböden in Anwendung kommen. Zur Fortzüchtung der Streptokokken werden hauptsächlich flüssige Nährmedien und zwar eine leicht alkalische (5—7,5 ccm Normallauge pro ein Liter) Fleischbouillon mit 1 % Pepton angewendet, wobei einzelne Streptokokken zu ihrem Wachstum bald einen größeren Alkaligehalt (10—15 ccm Normallauge), bald einen weiteren Peptonzusatz (bis auf 5 %) benötigen. Ein für Streptokokken besonders vorteilhafter Nährboden ist die sogenannte „Druckbouillon“ (ein Kilo fein gehacktes Fleisch mit zwei Liter Wasser bei Zusatz von 20 g Pepton und 10 g NaCl im Autoklaven bei 150° C gekocht). Zur Erhaltung der Virulenz und anderer spezifischen Eigentümlichkeiten empfehlen viele Autoren den Zusatz von Blutserum zur Bouillon; und zwar für die menschenpathogenen Menschenserum, eventuell Exudat- und Ascitesflüssigkeit, für die Tierpathogenen, Kaninchen-, Pferde- und Eselserum, Ich selbst habe mich von dem Wert des Serumzusatzes zur Erhaltung der Virulenz nicht überzeugen können und muß gestehen, daß ich nach monatelanger Züchtung in der oben angegebenen leicht alkalischen Bouillon die Virulenz bei gewissen Stämmen ebenso erhalten fand wie bei Kultivierung in Serumbouillon.

Die Immunisierung beginnt mit der Einverleibung kleinster Dosen, die dann allmählich gesteigert werden, und wird auf subkutanen Wege vorgenommen. v. LINGELSHEIM empfiehlt, mit abgeschwächten wenig virulenten Kulturen zu beginnen, geringe lokale Reaktionen hervorzurufen und dann erst virulentes Material einzuverleiben. Die Abschwächung der Streptokokken geschieht durch einstündiges Erwärmen der Kulturen auf 70°, durch Zusatz von Jodtrichlorid oder durch Mäusepassage (nach

Knorr). Marmorek verwirft den Beginn der Immunisierung mit abgeschwächten Bakterien und verwendet nur die virulenten Kulturen, nach deren Injektion stets eine energische Reaktion ausgelöst wird.

Neufelds Methode zur Immunisierrung gegen die Streptokokken ist folgende:

1. Man macht stets nur eine einzige Injektion von abgetöteter Kultur, um etwa 10 Tage darauf sofort zu lebender vollvirulenter überzugehen.

2. Zu dieser Injektion werden nur die Bakterienleiber benützt.

3. Bei den Injektionen mit lebenden Bakterien werden nur die zentrifugierten Bazillen verwendet und mit den Dosen rasch und stark in die Höhe gegangen. Zangemeister fordert für eine kräftige Immunkörperproduktion, daß die Streptokokken für das zu immunisierende Tier virulent sind, daß der Streptokokkus lebend injiziert wird und daß die Tiere nach Einverleibung der Streptokokken schwer erkranken.

Außer der subkutanen Applikation ist von mehreren Seiten unter anderen in letzterer Zeit von Besredka die intravenöse Immunisierung bei Streptokokken empfohlen worden. Nach Angaben von Lingelsheim und Ruppel treten jedoch hierbei sehr unangenehme Zufälle auf, wie: Gelenkschwellungen, Endokarditiden, die in den meisten Fällen den Tod der Tiere herbeiführen. Im staatlichen Seruminstitut in Wien wenden wir stets nur die subkutane Einverleibung mit direkt vom Menschen stammenden oder durch Mäuse passierten Streptokokken an. Die Kulturen sind meistens 2—8 Tage alt (Bouillon-Kulturen) und werden wöchentlich in steigenden Dosen den Pferden einverleibt. Die der Injektion folgende Reaktion war meist mäßig und bestand in leichten Fiebersteigerungen, Eiterungen aus dem Stichkanal und Abszeßbildung an der Injektionsstelle. Die Anfangsdosis betrug gewöhnlich 0,5 ccm Bouillonkultur und wuchs allmählich bis zu 100 ja sogar 200 ccm. Nach etwa sechsmonatlicher Immunisierung wird der erste Aderlaß vorgenommen und das Serum nach stattgehabter Prüfung zu je 50 oder 100 ccm ohne konservierenden Zusatz in Fläschchen verfüllt und in den Handel gebracht. Als Beispiel einer Immunisierung diene nachfolgende Kurve des Pferdes „Egmont", welches mit direkt vom Menschen stammenden Scharlachstreptokokken immunisiert wird. (Fig. 1.)

Auswertung des Serums.

Während wir das Diphtherie- und Tetanusserum gegenüber einer bestimmten Giftmenge nach dem Vorgange Ehrlichs genau bemessen können, entbehren wir für das Streptokokkenserum bis zum heutigen Tage, eine genau fundierte, allgemein anerkannte und angewandte Prüfungsmethode. Die Gründe hierfür liegen in der bereits auseinandergesetzten Tatsache der verschiedenen Immunisierungsmethoden und in dem Mangel eines Testgiftes. Je nach der Darstellung des Antistreptokokkenserums haben die Autoren verschiedene Methoden der Auswertung angegeben. Menzer wollte ursprünglich sein mit unpassierten Stämmen gewonnenes Serum mittels Antihämolysinen auswerten, zieht aber ein Jahr später die Prüfung am Menschen vor, welche Methode auch Moser bei seinen Seris zur Anwendung bringt. Menzer bezeichnet als Normalserum dasjenige, welches in der Menge von 1 ccm bei chronischen Streptokokkeninfektionen eine sichtbare lokale und allgemeine Reaktion hervorzurufen im Stande ist. Die meisten Autoren verwenden zur Prüfung der Sera das Tierexperiment und zwar weiße Mäuse. Aronson, Ruppel, Besredka immunisieren die Tiere, wie bereits früher erwähnt,

Fig. 1. Temperaturkurve des Pferdes „Egmont", behandelt mit Scharlachstreptokokken.

mit einem Gemenge von unpassierten, direkt dem Menschen entstammenden Streptokokken und einem künstlich für Mäuse hochvirulenten Stamm. Dieses Serum enthält Schutzstoffe gegenüber der Maus, welche sich genau bestimmen lassen und einen Indikator bilden für die Schutzstoffe, die die Originalstämme erzeugt haben. Meyer verwirft diese Methode der Serumauswertung und verlangt, daß zur Prüfung von Sera, die am Menschen angewendet werden sollen, nur menschenpathogene und nicht durch Tierpassage erst virulent gemachte Streptokokken verwendet werden. Wright versucht nach dem Gehalt an Opsonien die Wertigkeit eines Serums zu bestimmen. Die Prüfung an weißen Mäusen ist jedenfalls die derzeit einzig brauchbare Methode und sind hierbei zwei Wege eingeschlagen worden. Aronson benutzt den von Marx zur Prüfung des Schweinerotlaufserums angegebenen Modus, indem einer Zahl weißer Mäuse abgestufte Mengen des Serums subkutan injiziert werden, worauf nach 24 Stunden die intraperitoneale Infektion mit der 10—100fachen tödlichen Minimaldosis erfolgt. Nach Neufeld erhalten die Mäuse eine konstante Serummenge und 24 Stunden später abgestufte Kulturmengen (0,00001—0,1 ccm). Im Wiener Seruminstitut bedienten wir uns ausschließlich der Methode nach Aronson. Ich will jetzt den Prüfungsversuch genau beschreiben und gleichzeitig auf einige sich daraus abzuleitende Tatsachen hinweisen.

Die Auswertung eines Streptokokkenserums wird mittels eines genau bestimmten, virulenten Stammes an weißen Mäusen vorgenommen; diese Forderung erscheint auf den ersten Blick als ganz einfach, erweist sich in Wirklichkeit aber als sehr schwer. Lingelsheim sagt: „Die aus Krankheitsprozessen beim Menschen stammenden langen Streptokokken sind, ohne daß eine Tierpassage vorausgegangen ist, in ihrer überwiegenden Mehrzahl für Kaninchen und Mäuse pathogen.“ Dieser Ansicht gegenüber will ich bemerken, daß ich in einem Zeitraum von 5 Monaten bei Untersuchung eines großen Materials einen einzigen für Mäuse hochvirulenten Stamm gefunden habe, da wir ja einen Streptokokkus, der eine Maus in Menge von 0,5 ccm tötet, nicht als virulent bezeichnen können. Um die Virulenz solcher Stämme zu steigern, bedienen wir uns der fortlaufenden Tierpassage, d. h. das Herzblut des mit der geringsten Dosis getöteten Tieres wird in entsprechende Bouillon verimpft, diese Kultur wieder passiert usw.; auf diese Weise gelingt es, hochvirulente Stämme zu erhalten, die in Dosen von 1 Millionstel oder $^1/_{10}$ Millionstel Kubikzentimeter weiße Mäuse innerhalb 48 Stunden töten (Aronson, Marmorek). Hierbei muß ich erwähnen, daß ein solcher für Mäuse hochpathogen gemachter Stamm auch gegenüber anderen Tierarten (Kaninchen, Katzen) eine hohe Virulenz besitzt. Auf einen wichtigen Punkt muß ich hier noch aufmerksam machen; bei Virulenzbestimmungen von ein und demselben Streptokokkenstamm, in dem gleichen Nährmedium weitergezüchtet, ergeben sich innerhalb kurzer Zeit sehr starke Schwankungen. Ich will als Beispiel hierfür folgenden Versuch anführen.

Virulenzbestimmung des Stammes Schabhübl (puerperale Sepsis) nach der IV. Passage:

a) am 23. XII.		b) am 30. XII.	
0,00001	† 26. XII.	0,000001	leben
0,00005	† 26. XII.	0,000005	leben
0,0001	† 26. XII.	0,00001	leben
0,0005	† 26. XII.	0,00005	† 5. I.
0,001	† 25. XII.	0,0001	† 1. I.

Es folgt daraus, daß man die Virulenz eines Stammes sehr oft be stimmen muß, bevor man einen Stamm als „Teststamm“ einstellt, un auch da ist vor jeder Serumauswertung die Virulenzbestimmung z wiederholen.

Vor der Prüfung muß die Virulenz des betreffenden Streptokokken stammes genau bestimmt werden. Es werden zu diesem Zwecke mehrer Röhrchen der früher beschriebenen Bouillon mit dem Streptokokkus ge impft und durch 48 Stunden im Brütofen gelassen. Dann wird die gu gewachsene und auf ihre Reinheit geprüfte Bouillonkultur gut durchge blasen und 1 ccm davon mit 9 ccm physiologischer Kochsalzlösung ge mischt, von da aus werden die weiteren Verdünnungen gemacht un dann 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001 usw. weißen Mäuse intraperitoneal injiziert. Diejenige Dosis, bei der das Tier innerhal 4 Tagen gerade eingeht, bezeichnen wir als einfach letale Dosis, zu Serumprüfung verwendeten wir aber gewöhnlich die 10fach letale.

Auswertung von drei Scharlach- und einem Streptokokkenserum gegen über einem durch Passage virulenten Scharlachstreptokokkus:

Vorbehandelt am 19. V. 05 mit		Infiziert am 20. V. mit	Resultat
0,00001	Scharlach-serum Serie 2	0,00001 ccm Stamm 35 P.	† 23. V.
0,0001		do.	† 23. V.
0,001		do.	leben.
0,01		do.	
0,1		do.	
0,00001	Scharlach-serum Serie 14	do.	† 23. V.
0,0001		do.	† 23. V.
0,001		do.	leben.
0,01		do.	
0,1		do.	
0,00001	Strepto-kokken-serum Elis	do.	† 24. V.
0,0001		do.	† 23. V.
0,001		do.	leben.
0,01		do.	
0,1		do.	
0,00001	Scharlach-serum Serie 16	do.	† 22. V.
0,0001		do.	† 22. V.
0,001		do.	† 24. V.
0,01		do.	leben.
0,1		do.	

Auswertung anderer Scharlachsera und eines zweiten Streptokokken serums gegenüber demselben tierpassierten Scharlachstamm:

Vorbehandelt am 30. V. 05 mit		Infiziert am 31. V. 05 mit	Resultat
0,00001	Scharlach-serum Serie 7	0,00001 ccm 35 P.	† 2. VI.
0,0001		do.	† 3. VI.
0,001		do.	leben.
0,01		do.	
0,5		do.	

Vorbehandelt am 19. V. 05 mit		Infiziert am 20. V. mit	Resultat
0,00001	Scharlachserum Serie 6	do.	† 2. VI.
0,0001		do.	† 2. VI.
0,001		do.	† 3. VI.
0,01		do.	† 3. VI.
0,1		do.	lebt.
0,00001	Scharlachserum Serie 5	do.	† 2. VI.
0,0001		do.	† 2. VI.
0,001		do.	leben.
0,01		do.	
0,1		do.	
0,00001	Scharlachserum Serie 1	do.	† 2. VI.
0,0001		do.	† 3. VI.
0,001		do.	leben.
0,01		do.	
0,1		do.	
0,00001	Streptokokken-Serum Grisette	do.	† 2. VI.
0,0001		do.	† 2. VI.
0,001		do.	† 4. VI.
			4. VI. krank, erholt sich u. bl. a. Leben.
0,01		do.	
0,1		do.	lebt.
	Kontrolltiere	0,00001 ccm 35 P.	† 2. VI.
		0,00001 „ 35 P.	† 3. VI.
		0,000001 „ 35 P.	† 3. VI.
		0,0000001 „ 35 P.	lebt.

Ein in derselben Weise mit normalem Pferdeserum angestellter Versuch ergab ein vollständig negatives Resultat. Ich muß gleich hier bemerken, daß das Pferd „Grisette“ erst kurze Zeit immunisiert wurde, während Serie 6 von einem Pferde stammt, das schon lange, über ein Jahr, mit Streptokokken behandelt wurde.

Auswertung der Scharlachsera gegenüber einem virulenten, nicht passierten Scharlachstreptokokkus:

Vorbehandelt am 21. V. 06 mit		Infiziert am 22. V. 06 mit	Resultat
0,0001	Scharlachserum Serie 2	0,001 ccm Louisnig	† 31. V.
0,001		do.	leben.
0,01		do.	
0,1		do.	
0,5		do.	
0,0001	Scharlachserum Serie 16	do.	† 25. V.
0,001		do.	leben.
0,01		do.	
0,1		do.	
0,5		do.	
0,0001	Scharlachserum Serie 17	do.	† 27. V.
0,001		do.	leben.
0,01		do.	
0,1		do.	
0,5		do.	

Vorbehandelt am 21. V. 06 mit		Infiziert am 22. V. 06 mit	Resultat
0,0001	Scharlach-serum Serie 5	do.	† 25. V.
0,001		do.	† 25. V.
0,01		do.	leben.
0,1		do.	leben.
0,5		do.	leben.
0,0001	Strepto-kokken-serum Grisette	do.	† 25. V.
0,001		do.	† 25. V.
0,01		do.	
0,1		do.	leben.
0,5		do.	
		Kontrolltiere 0,00001	† 30. V.
		Kontrolltiere 0,0001	† 25. V.
		Kontrolltiere 0,001	† 23. V.
		Kontrolltiere 0,001	† 23. V.

Wenn wir diese drei Tabellen miteinander vergleichen, so sehen wir, daß die Wertigkeit der einzelnen Sera keine großen Unterschiede aufweist; des weiteren ist daraus zu entnehmen, daß man mittels eines polyvalenten Streptokokkenserums die Tiere gegen die Infektion mit einem Scharlachstreptokokkus schützen kann, und zwar in Mengen, die denen eines spezifischen Scharlachserums nicht viel nachstehen. Nach den an einer früheren Stelle auseinandergesetzten Tatsachen über die Tierpassage der Streptokokken hätte man a priori erwarten müssen, daß unsere mit unpassierten Streptokokken gewonnenen Sera gegenüber den tierpassierten Stämmen keine Schutzkraft besitzen werden oder mindestens gegenüber einem nichtpassierten Streptokokkus bedeutend höhere Werte ergeben werden. Tabelle III zeigt aber, daß diese Voraussetzung nicht zutrifft, und daß beinahe sämtliche untersuchten Sera sich gegenüber den beiden Arten von Streptokokken annähernd gleich verhalten.

Das Serum Serie 17 wurde nach der Methode Aronson-Besredka-Ruppel mit passierten und nichtpassierten Scharlachstreptokokken gewonnen und natürlich auch gegenüber dem Stamm 35 P. ausgewertet, wobei sich dieselbe Schutzkraft wie gegenüber dem Stamm Louisnig (0,001 ccm) ergab. Es würde den Rahmen und Zweck dieses Aufsatzes überschreiten, wenn ich noch weitere Auswertungen mittels verschiedener Stämme mitteilen wollte; ich muß aber noch der wichtigen Tatsache Erwähnung tun, daß ein Serum mit einem bestimmten ziemlich hohen Schutzwert gegenüber einem Tierpathogenen, unpassierten Streptokokkus gegenüber einem anderen ätiologisch gleichwertigen gar keine Schutzkraft besitzen kann. Dieses Verhalten gibt uns die Erklärung für die vielen Mißerfolge der Serumtherapie am Menschen und bekräftigt die Ansicht von der Vielheit der Streptokokken und der Unrichtigkeit, dieselben in einzelne Gruppen trennen zu wollen.

Aronson bezeichnet nach der Berechnung des Schweinerotlaufserums ein Serum, von welchem 0,01 ccm eine Maus vor der 10 fachen tödlichen Dosis der virulenten Kultur schützt, als einfach normal. 1 ccm eines solchen Serums enthält eine Immunisierungseinheit. Ruppel bedient sich derselben Bezeichnung, und das von ihm in den Handel gebrachte Streptokokkenserum enthält 20—40 I.-E. in 1 ccm, daß heißt

$^1/_{2000}$ respektiv $^1/_{4000}$ ccm schützt eine Maus vor der 10—100fachen tödlichen Dosis einer virulenten Kultur. Ich glaube, daß es zweckmäßiger wäre, diese Bezeichnung für die Wertigkeit eines Streptokokkenserums fallen zu lassen und dafür ganz einfach zu sagen: Serum schützt gegen Stamm a, b, c, d in Dosen von $^1/_{100}$, $^1/_{1000}$ ccm usw. Schließlich muß ich noch erwähnen, daß wir mit unseren Seren auch Heilversuche angestellt haben, wobei wir die infizierten Tiere 6—8 Stunden nach der Infektion mit Dosen von 0,5—0,001 ccm am Leben erhalten konnten. Noch darauf muß ich hinweisen, daß man sich natürlich nicht mit der einmaligen Prüfung eines Serums begnügen darf, da besonders bei der Auswertung mit hochvirulenten Stämmen leicht Versuchsfehler unterlaufen, auf die schon v. Lingelsheim aufmerksam gemacht hat. Wenn man nämlich eine größere Anzahl von Mäusen mit 0,000001 ccm Kultur infiziert, so kann es wohl vorkommen, daß die eine oder andere Maus gesund bleibt, während alle übrigen eingehen; es ist eben bei den Streptokokken sehr schwer, eine völlig gleichmäßige Verteilung zu erzielen. Aus diesem Grunde versuchte v. Lingelsheim als Testvirus das Herzblut frisch eingegangener Mäuse zu verwenden. Das Blut wird mit einer graduierten Kapillare aufgesaugt und mit Kochsalzlösung verdünnt.

Anwendung des Streptokokkenserums.

a) Beim Menschen.

Hier kommen der Scharlach, das Erysipel, die Puerperalinfektion und der Gelenkrheumatismus in Betracht.

Obwohl die Frage, ob der Streptokokkus der Erreger der Scarlatina ist oder ob demselben nur die Rolle einer Sekundärinfektion zukommt, bis zum heutigen Tage nicht gelöst ist, ist der Einfluß desselben auf die Erkrankung beinahe von allen Forschern anerkannt, und es war daher natürlich, daß speziell der Scharlach eines der ersten Versuchsobjekte für die Serotherapie war. Nachdem das Serum Marmorek sich als unwirksam erwiesen hatte, gebührt eigentlich Baginsky das Verdienst, die Versuche mit dem Aronsonschen Serum wieder aufgenommen zu haben. Ich habe bereits an früherer Stelle seine Erfahrungen besprochen und muß noch hinzufügen, daß in letzter Zeit Mendelsohn, ein Schüler Baginskys, bei der Behandlung von 165 Scharlachfällen mit Aronsons Serum keine Beeinflussung der eigentlichen Scharlachsymptome wahrnehmen konnte, dagegen auf etwaige schädliche Folgen der Serumanwendung (Exantheme, Gelenkschwellungen) aufmerksam macht; ebenso lauten die Berichte von Ganghofner und Heubner. Im Gegensatz hierzu hat sich nach den Angaben Mosers, Escherichs, Bokays, Schicks, Zuppingers, Bukowskys, Kollys und Winocouroffs, Egis-Langowoys und Moltschanoffs das Mosersche Streptokokkenserum bei Scharlach glänzend bewährt. Alle Autoren rühmen den günstigen Einfluß auf Puls und Temperatur, welch letztere 4—12 Stunden nach der Seruminjektion ohne Schweiß und Kollapserscheinungen deutlich abfällt. Hand in Hand damit bessert sich das Allgemeinbefinden, schwinden Somnolenz und Delirien, und die Kinder nehmen Nahrung zu sich und haben für ihre Umgebung Interesse. Escherich nennt die Wirkung des Moserserums „zauberhaft“ und verweist auf die Notwendigkeit einer frühzeitigen Serumanwendung. Bei 112 injizierten Fällen ergaben die am ersten und zweiten Krankheitstage injizierten keinen Todesfall, wogegen nachher das Mortalitätsprozent von 13 auf 50 ansteigt. Moser

injiziert 200 ccm seines Serums in die Bauchhaut; zu Beginn seiner Versuche bediente sich Moser einer entsprechend großen Asbeststempelspritze, später hat D. v. Pirquet mit Hilfe der Wulfschen Flasche eine eigene Spritze konstruiert, die bei der Firma Löblich und Dohnal (Wien IX) käuflich ist und das Ausgießen des Serums unnötig macht. Die Injektionsstelle wird mit Jodoformkollodium überdeckt und ein Druckverband angelegt. Als klassisches Beispiel der Serumwirkung diene die beistehende Fieberkurve, welche der Arbeit Mosers entnommen ist (Fig. 2). Eine kleinere Anzahl von Autoren, Baginsky, Ganghofner, Garlipp,

Fig. 2. Fieberkurve eines mit Scharlachserum behandelnden Kindes.

Quest, Jassny und Mizkewicz verhält sich diesen enthusiastischen Berichten gegenüber ablehnend; Ganghofner, Garlipp und Quest beobachteten auch Temperaturabfall, wollen aber dem Moserschen Serum keinen spezifischen oder günstigen Einfluß auf den Scharlachprozeß zugestehen.

Die Erfolge der Serumanwendung beim Erysipel scheinen nicht sehr ermutigend zu sein; Marmorek berichtet zwar von guten Erfolgen seines Serums, während Meyer die Anwendung eines Streptokokkenserums nur bei Erysipelas migrans und bei den Erysipelen der Wöchnerinnen und frisch Operierten empfiehlt. Die meiste Anwendung findet das Streptokokkenserum bei der puerperalen Wundinfektion und wie es scheint auch mit den besten Erfolgen. Hier sind zunächst die Arbeiten von Bumm und Walthard zu nennen. Bumm verwendete die Sera von Marmorek, Tavel, Menzer und hauptsächlich das Aronsonsche und empfiehlt zur Behandlung mit Serum diejenigen Fälle, „bei welchen die Streptokokken noch nicht über die Eingangspforte am Endometrium hinausgelangt sind oder doch nur vereinzelt in Blute kreisen", die Fälle von septischer Endometritis.

Bumm verwendet zur Einspritzung 50 ccm, wiederholt dieselbe eventuell 2—3 Tage hintereinander und fordert eine möglichst frühzeitige Anwendung des Serums. Bei Einhaltung dieser Indikationen hat Bumm unzweifelhaft Erfolge gesehen, ebenso Walthard, der das polyvalente Serum Tavels zur Anwendung brachte. Walthard rät zur Anwendung des Antistreptokokkenserums bei frischen Infektionen und prophylaktisch bei der Ausräumung infizierter Placentarreste und am Ende der Geburt bei Fieber sub partu. Burkhard hatte mit Menzers Serum günstige Resultate aufzuweisen, Mainzer, Hanel, Opfer, Grochtmann und Hoffmann berichten über Heilungen von puerperaler Sepsis durch Aronsonsches Serum. Das im Wiener serotherap. Institut dargestellte Streptokokkenserum wurde von Peham an der Klinik Chrobak mit gutem Erfolge angewendet, und in einer in letzter Zeit erschienenen Arbeit Burkards aus der Klinik Knauer (Graz) werden die Befunde Pehams bestätigt. Burkard verfügt über ein Material von 50 Fällen, darunter 29 reine Streptokokkeninfektionen ohne Todesfall. Die Wirkung des Serums äußert sich in Temperaturabfall, Abnahme der Pulsfrequenz, Besserung des Allgemeinbefindens und Wiederkehr von Appetit und Schlaf. Ein besonderes Verhalten zeigte der Temperaturabfall, welchen Burkard als ganz typisch bezeichnet. Die Temperatur sinkt nach der Seruminjektion innerhalb 24 Stunden um 2—3°, von 39° bis 40° auf 37° bis 38°, um in den nächsten 24 Stunden wieder in die Höhe zu gehen, worauf dann entweder unmittelbar oder allmählich die Temperatur zur Norm zurückkehrt. Dieses charakteristische Verhalten des Temperaturabfalls zeigt große Ähnlichkeit mit den Temperaturkurven der Scharlachkinder, die mit Moserschem Serum behandelt wurden. Auch Burkard hebt die Wichtigkeit einer möglichst frühzeitigen Serumanwendung hervor, empfiehlt große Dosen, 100 ccm.

Meyer hatte Gelegenheit, bei 6 Fällen von puerperaler Sepsis das in Höchst dargestellte Streptokokkenserum anzuwenden und beobachtete als Folge der Serumeinspritzung Herabsetzung der Temperatur, Besserung des Pulses und Eintreten von Schlaf. Tavel prüfte allein und gemeinsam mit Krummbein sein Serum bei den verschiedensten Streptokokkenerkrankungen und berichtet über günstige Erfolge; Tavel injiziert am ersten Tage 20—30 ccm und an folgenden Tagen je 10 ccm.

Beim Gelenkrheumatismus rät speziell Menzer die Anwendung eines Serums, welches durch Vorbehandlung von Pferden mittels Streptokokken gewonnen wird, die von den Tonsillen Rheumatismuskranker stammen. Dieses Serum wird bei Merk hergestellt und wurde von Menzer bei akutem und chronischem Gelenkrheumatismus, sowie bei Tuberkulose mit Mischinfektion mit gutem Erfolg angewendet.

Über die prophylaktische Anwendung der Streptokokkensera sind noch zu wenig Erfahrungen bekannt, um darüber ein Urteil zu fällen. Moser injizierte 39 Kinder präventiv mit seinem Scharlachserum, davon erkrankten 4 an Scharlach, der aber auffallend leicht verlief. Pinard, Bumm und Krönig machten den Vorschlag, das Streptokokkenserum vor Operationen und Entbindungen zum Zwecke der Immunisierung anzuwenden. F. Meyer geht sowohl von praktischen Erfahrungen als auch von theoretischen Erwägungen über die Streptokokkenimmunität aus und sieht in der immunisatorischen Anwendung des Streptokokkenserums den einzig richtigen Weg, um bedeutende Erfolge aufweisen zu können.

Die Technik der Seruminjektion ist beim Streptokokkenserum wohl die gleiche wie bei allen andern, und es erscheint daher überflüssig, die

einzelnen Maßnahmen anzuführen; es erübrigt nur, den Vorschlag F. Meyers zu erwähnen, das Serum mit der fünffachen Menge physiologischer NaCl-Lösung verdünnt zu injizieren. Meyer behauptet, auf diese Weise starken Lokal- und Allgemeinreaktionen, sowie den Serumexanthemen vorbeugen zu können.

Als Kontraindikationen für die Anwendung eines Streptokokkenserums haben Menzer und Meyer Herzaffektionen, Pleuritis und Perikarditis und besonders abgeschlossene Eiteransammlungen (Empyem) aufgestellt.

b) Beim Tier.

Die bei Tieren am längsten und besten gekannte Streptokokkenerkrankung ist die Druse, welche Pferde, Esel und Maultiere befällt und sich als eine fieberhafte, infektiöse Affektion der Nasenschleimhaut mit nachfolgender Abszedierung der retropharyngealen Lymphdrüsen charakterisiert. Gegen diese Erkrankung erzeugte Piorkowski gemeinsam mit Jess ein Serum, über dessen Wirkung er im Jahre 1902 auf dem Karlsbader Naturforschertag berichtete. Die erkrankten Tiere bekamen 10—30 ccm Serum nebst einer gewissen Dosis Normalserum, und die damit erzielten Erfolge bezeichnet Piorkowsky als recht gute. Ruppel erzeugt ein Drusenserum in Höchst, indem er Pferde mit einem Gemisch von Drusestämmen nebst einer durch Tierpassage hochvirulenten Streptokokkenkultur immunisiert. Dieses Serum schützt Mäuse in Dosen von 0,0005 bis 0,00025 ccm gegenüber der 10—100fach tödlichen Dosis einer virulenten Streptokokkenkultur. Mit diesem Serum wurden 44 Fälle von Druse behandelt, wobei in 36 (81,8 %) Fällen eine ausgesprochene Heilwirkung zu beobachten war. Als prophylaktisches Mittel wurde dieses Serum in den Stallungen zu Höchst a. M. zur Anwendung gebracht, und hierbei wurden sehr günstige Resultate erzielt, indem seit dieser Zeit eine Übertragung der Druse auf frische, gesunde Pferde nicht erfolgt ist.

Literatur.

Aronson, Berliner klin. Wochenschr. 1896.
Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 42 und 43.
Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 25.
Baginsky, Berliner klin. Wochenschr. 1896.
Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 48 und 49.
Behring, v., Centralbl. für Bakt. 1892.
Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1904.
Bokay, Deutsche med. Wochenschr. 1904.
Ders., Jahrbuch für Kinderheilkunde 1905, Bd. LXII.
Bordet, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897.
Bornemann, Wiener klin. Wochenschr. 1896.
Bukowsky, Wiener klin, Wochenschr. 1905, Nr. 48.
Bumm, Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 44.
Burkard, Zeitschr. für Geburtshilfe 1905, Bd. LIII.
Burkard, Archiv für Gynäkologie, Bd. LXXIX.
Denys, Bull. de l'Acad. Belge 1896.
Egis-Langowoy, Jahrbuch für Kinderheilkunde 1907.
Escherich, Wiener klin. Wochenschr. 1903.
Fischer, Centralbl. für Bakt. 1905.
Gabritschewsky, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. 41.
Ganghofner, Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 14 und 15.
Garlipp, Med. Klinik 1905, Nr. 51.
Grochtmann, Deutsche med. Wochenschr. 1904.

Hanel, Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 45.
Heubner, Deutsche med. Wochenschr. 1903.
Hoffmann, Deutsche med. Wochenschr. 1904.
Kerner, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII.
Langowoy, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. 42.
Lingelsheim, v., Kolle-Wassermann, Handbuch der pathog. Mikroorgan. 1904.
Marmorek, Ann. de l'Inst. Pasteur 1895.
Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1896.
Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 14.
Mendelsohn, Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 12.
Menzer, Zeitschr. für klin. Med. 1902.
Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1902.
Ders., Münchener med. Wochenschr. 1903.
Meyer, Zeitschr. für physik. Therapie 1902.
Ders. Berliner klin. Wochenschr. 1902.
Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1902.
Ders., Zeitschr. für klin. Med. 1902.
Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1903.
Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1905.
Ders., Therapie der Gegenwart 1906.
Meyer-Michaelis, Zeitschr. für klin. Med. 1903.
Moser, Wiener klin. Wochenschr. 1902.
Ders., Jahrbuch der Kinderheilkunde 1903.
Moser-v. Pirquet, Centralbl. für Bakt. 1903.
Neufeld, Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten, Bd. XLIV.
Ders., Ebenda 1905.
Neufeld-Rimpau, Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 40.
Peham, Wiener klin. Wochenschr. 1904.
Petruschky, Centralbl. für Bakt. 1895, Bd. XVII.
Ders., Centralbl. für Bakt. 1896, Bd. XX.
Ders., Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten 1894.
Piorkowsky, Berliner klin. Wochenschr. 1902.
Pospischill, Wiener klin. Wochenschr. 1904.
Quest, Deutsche med. Wochenschr. 1905.
Ruppel, Med. Klinik 1905.
Schenk, Wiener klin. Wochenschr. 1897.
Schick, Deutsche med. Wochenschr. 1905.
Silberstrom, Centralbl. für Bakt. 1906.
Simon, Centralbl. für Bakt. 1907.
Simon, Centralbl. für Bakt. 1903.
Sawtschenko-Metschnikoff, Ref. Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 35.
Tavel, Klin. therap. Wochenschr. 1902.
Ders., Deutsche med. Wochenschr. 1903.
Tavel-Krumbein, Korrespond. für Schweizer Ärzte 1901.
Velde, van de, Arch. de médicine 1897.
Walthard, Zeitschr. für Geburtshilfe, Bd. LI.
Winocouroff, Jahrbuch für Kinderheilkunde, 3. Folge, Bd. XII.
Wright, Ref. Centralbl. für Bakt. 1905.
Zangemeister, Monatsschr. f. Geburtshilfe u. Gynäk. 1906.
Ders., Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 21.
Zangemeister und Meissl, Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäk. 1906.
Zuppinger, Wiener klin. Wochenschr. 1905.
Zelenski, Wiener klin. Wochenschr. 1904.

XXII.

Milzbrandserum.

Von

Prof. Dr. G. Sobernheim

in Berlin.

Die ersten Untersuchungen über die Gewinnung und die besonderen Eigenschaften eines wirksamen Milzbrandserums wurden von SCLAVO und etwa zu gleicher Zeit von MARCHOUX angestellt. Durch die Arbeiten von MENDEZ, DETRE-DEUTSCH, BAIL, CARINI, Verfasser u. a. sind diese Studien weiter gefördert worden, und in letzter Zeit hat sich namentlich ASCOLI um die Erforschung dieses Gebietes außerordentlich verdient gemacht.

Spezifische Schutzstoffe lassen sich in dem Blute von Individuen, die eine Milzbrandinfektion überstanden haben, im allgemeinen nicht nachweisen. So besitzt das Serum von Rindern, welche von einer Spontanerkrankung genesen sind, keine immunisierenden Eigenschaften, und auch das Serum von Menschen, die an Milzbrand erkrankt waren, äußert im Tierexperiment keinerlei schützende Wirkung. Ebensowenig ist die Vaccination nach der PASTEURschen Methode oder die Serovaccination imstande, trotz der hierdurch bedingten ausgesprochenen Immunität, im Blute der geimpften Tiere immunisierende Schutzstoffe entstehen zu lassen. Um dies zu erreichen und ein wirksames Milzbrandserum zu erhalten, ist es vielmehr nach allgemeiner Erfahrung erforderlich, den Tieren einen ungewöhnlich hohen Grad aktiver Immunität zu verleihen. Erst nach langdauernder Vorbehandlung mit ziemlich erheblichen Virusmengen gelingt es, von Tieren ein Serum von deutlich spezifischer Schutzwirkung zu erlangen.

So äußert z. B. das Serum von Kaninchen, deren aktive Immunisierung geglückt ist, unter Umständen stark immunisierende Fähigkeiten, und zwar dann, wenn die Tiere in ihrer Immunität so weit gebracht worden sind, daß sie die subkutane Infektion mit $^1/_2$—1 Agarkultur virulenten Milzbrandes vertragen. Für praktische Zwecke kommt indessen nur die Immunisierung größerer Tiere in Betracht.

Darstellung des Serums.

Zur Immunisierung und zur Erzeugung eines wirksamen Milzbrandserums können Rinder, Pferde, Esel, Maultiere, Schafe mit Erfolg benutzt werden, auch Ziegen und Hunde scheinen brauchbar zu

sein. Sclavo, Carini u. a. bevorzugen Esel zur Serumgewinnung, Detre-Deutsch erzeugt das Milzbrandserum von Pferden und Eseln, während Verfasser in der Regel ein Mischserum benutzt, das von Rindern, Pferden und Schafen gewonnen wird.

Die Immunisierung der zur Serumgewinnung bestimmten Tiere erfolgt in der Weise, daß die Tiere auf dem Wege der Serovaccination oder auch nach der Pasteurschen Methode vorbehandelt und alsdann in gewissen regelmäßigen Zwischenräumen in steigenden Dosen mit virulenter Milzbrandkultur infiziert werden. Sie erhalten zu diesem Zwecke etwa 10—14 Tage nach der vorbereitenden Impfung eine Injektion von $^1/_{200}$ bis $^1/_{1000}$ Öse virulenter Kultur. Bei Schafen empfiehlt sich größere Vorsicht und namentlich bei der ersten virulenten Impfung die Verwendung einer recht geringen Kulturmenge, während man bei Rindern und Pferden nicht unter $^1/_{200}$ Öse herunterzugehen braucht. Die erste Impfung mit virulenter Kultur ist gewöhnlich von einer stärkeren Reaktion gefolgt, indem die Tiere mehrere Tage zu fiebern pflegen. Die weiteren Impfungen werden alsdann in Zwischenräumen von 2—3 Wochen ausgeführt, und zwar so, daß man die Dosis bald auf 1 Öse, dann auf mehrere Ösen steigert und allmählich zu mehreren Agarkulturen und schließlich zu einer und selbst mehreren Massenkulturen (nach Kolle) übergeht. Bei Rindern und Pferden gelingt das verhältnismäßig leicht, und man kann dazu kommen, daß diese Tiere nach 3—4 Monaten die subkutane Impfung mit 2—3 Massenkulturen ohne nennenswerte Reaktionserscheinungen überstehen. Sie bekommen unter Umständen nach der Impfung ziemlich ausgedehnte lokale Infiltrate, die jedoch nach kurzer Zeit wieder zurückgehen und das Allgemeinbefinden der Tiere nur wenig beeinträchtigen. Bei Schafen bereitet die Immunisierung wegen der großen Empfindlichkeit dieser Tiere etwas größere Schwierigkeiten, und es läßt sich nicht vermeiden, daß von einer größeren Reihe von Tieren, die zur Serumgewinnung eingestellt werden, doch immer ein nicht ganz geringer Prozentsatz im Laufe der Immunisierung eingeht. Immerhin gelingt es aber auch bei Schafen, die Immunität so hoch zu treiben, daß die Injektion mehrerer Massenkulturen leicht überstanden wird.

Je virulenter der Milzbrandstamm ist, der zur Behandlung der Tiere benutzt wird, desto vorsichtiger muß natürlich der Gang der Immunisierung gehandhabt werden, um so wirksamer pflegt aber auch schließlich das Milzbrandserum zu sein. Man benutzt daher am zweckmäßigsten Milzbrandstämme, die möglichst frisch von tödlich verlaufenen Infektionen gewonnen worden sind. Auch empfiehlt es sich, Stämme verschiedener Herkunft zur Immunisierung zu verwenden. Ob Bouillonkulturen oder Aufschwemmungen von Agarkulturen benutzt werden, dürfte im Prinzip gleichgültig sein, doch ist es aus äußeren Gründen praktischer, die letztere Art des Impfmaterials zu wählen, weil hierbei das zu injizierende Flüssigkeitsquantum auf ein verhältnismäßig geringes Volumen beschränkt werden kann. Mengen von 500—1000 ccm einer Bouillonkultur bereiten, wie leicht begreiflich, der Injektion große technische Schwierigkeiten, wohingegen der Bakterienrasen von 4—5 Massenkulturen sich ohne Mühe auf ein Flüssigkeitsquantum von 50—60 ccm verteilen läßt. Frische Kulturen, die ca. 24 Stunden bei 37° gezüchtet worden sind, dürften sich im allgemeinen zur Verimpfung am meisten eignen; ältere Kulturen mit vorgeschrittener Sporenbildung besitzen zum mindesten gegenüber den jüngeren Kulturen keine Vorzüge. Die Impfungen werden am besten subkutan ausgeführt. Intravenöse Injektionen, wie sie anfänglich z. B.

von Sclavo versucht wurden, sind weniger empfehlenswert. Die Wirksamkeit des Milzbrandserums wird durch diese Art der Immunisierung keineswegs erhöht, zudem besteht die Gefahr der Embolie, wenn es sich im späteren Stadium der Immunisierung darum handelt, den Tieren große Mengen von Kulturmaterial einzuverleiben. Tiere, welche mit subkutanen Impfungen behandelt werden, liefern schließlich ein außerordentlich hochwertiges Milzbrandserum.

In der Regel lassen sich schon bei Tieren, welche mit 1—2 Agarkulturen vorbehandelt worden sind, spezifische Schutzwirkungen des Serums nachweisen, doch empfiehlt es sich für praktische Zwecke das Serum zu dieser Zeit noch nicht zu verwenden. Erst wenn die Tiere $^1/_2$—1 Massenkultur vertragen, pflegt der Schutzwert ihres Serums ein genügend starker zu sein. Wie auch bei anderen Infektionen, machen sich bei den Tieren gewisse individuelle Unterschiede sehr deutlich bemerkbar, in dem Sinne, daß das eine Individuum schon verhältnismäßig frühzeitig ein wirksames Serum liefert, während ein anderes bei der gleichen Behandlungsweise erst ziemlich spät größere Mengen von Schutzstoffen im Blute erkennen läßt. Im allgemeinen liefern nach den Beobachtungen des Verfassers Schafe das wirksamste Serum, und zwar pflegen hier die individuellen Unterschiede sehr zurückzutreten, so daß man fast von jedem Tiere ein gutes Milzbrandserum erhält. Pferde geben gleichfalls meist wirksame Sera, doch kann man hier gerade bei einzelnen Individuen arge Enttäuschungen erleben. Das Milzbrandserum von Rindern ist recht wirksam, steht aber gewöhnlich hinter der Schutzkraft des Pferde- und Schafserums etwas zurück.

Die Blutentnahme wird am besten 14—16 Tage nach der letzten Impfung vorgenommen. Eine frühere Blutentnahme ist zu vermeiden. Einmal nämlich ereignet es sich nicht selten, daß Tiere nach scheinbarer Überwindung der Impfreaktion und nach einem fieberfreien Stadium plötzlich am 8. oder 9. Tage von neuem Temperatursteigerung aufweisen, wie schon von Sclavo und anderen bei ihren ersten Versuchen festgestellt werden konnte; dann aber haben wiederholte regelmäßige Blutuntersuchungen gelehrt, daß zu dieser Zeit und selbst noch später, bis zum 10. und 11. Tage nach der Impfung, gelegentlich im Blute der Tiere Milzbrandbazillen in größerer Zahl auftreten können. Die Blutentnahme wird in der üblichen Weise ausgeführt, und das Blut in großen sterilisierten Glaszylindern oder ähnlichen Gefäßen von zirka 6 Litern Inhalt aufgefangen. Rindern kann ein Quantum von 7—8 Litern Blut, Pferden etwa die gleiche Menge und Schafen höchstens 1—1 $^1/_2$ Liter entnommen werden. Nach zwei Tagen folgt eine abermalige Blutentnahme, jedoch darf hierbei den Tieren nur ein geringeres Quantum entzogen werden. Die Tiere überstehen diese Eingriffe außerordentlich leicht und sind etwa 14 Tage später schon wieder für eine neue Impfung bereit, der dann 14—16 Tage später die nächste Blutentnahme folgt. So kann man einem und demselben Tiere im Laufe eines Jahres 10—11 mal Blut entziehen, und es gibt Tiere, die in dieser Weise mehrere Jahre hindurch abwechselnd mit Milzbrandimpfungen und Blutentziehungen behandelt werden können, sich dabei in ausgezeichnetem Ernährungs- und Gesundheitszustande befinden und andauernd ein wirksames Serum liefern.

Das aufgefangene Serum läßt man in den Glaszylindern in schräger Lage zur Gerinnung kommen, worauf sich bei Aufbewahrung in kühlem Raum innerhalb von 24 Stunden eine große Menge völlig klaren Serums abscheidet. Dieses wird abgegossen oder abpipetiert, und der zurück-

gebliebene Blutkuchen nunmehr mit sterilen Instrumenten möglichst fein zerstückelt, abermals 24 Stunden sich selbst überlassen, das alsdann noch ausgeschiedene Serum wiederum abgegossen, und der Rest des Blutkuchens ausgepreßt. Die verschiedenen Serumpartien werden nunmehr zusammengegossen; man erhält in der Regel eine Ausbeute von 50 % Serum bei Rinderblut, 50 bis 60 % und ausnahmsweise selbst mehr bei Pferde- und Schafblut. Um die dem Serum etwa beigemischten Blutkörperchen zu entfernen und zu Sterilisierungszwecken wird das Serum hierauf zentrifugiert, bei zirka 2500 Umdrehungen. Das für die Anwendung bei Menschen bestimmte Serum wird durch Berkefeldkerzen filtriert. Das Serum wird alsdann mit 0,5 %iger Karbolsäure versetzt und in sterilisierte, mit Gummistopfen verschlossene Flaschen eingefüllt. Es folgt nunmehr die wichtige Prüfung des Serums.

Prüfung des Milzbrandserums. Die Prüfung hat sich nach verschiedenen Richtungen hin zu erstrecken. Vor allen Dingen kommt es darauf an, den spezifischen Schutzwert des Serums zu ermitteln. Leider stehen für diesen Zweck exakt arbeitende Methoden, wie etwa bei antitoxischen oder selbst exquisit bakteriziden Serumarten nicht zur Verfügung. Im besonderen gelingt es nicht, bei kleineren Laboratoriumstieren, die für diesen Zweck ja so gut wie ausschließlich in Betracht kommen, nämlich bei Kaninchen, Meerschweinchen oder Ratten und Mäusen, genaue quantitative Werte zu erhalten. Die außerordentlich große Empfänglichkeit dieser Tierarten für Milzbrand trägt hieran die Hauptschuld.

Immerhin ist es möglich, sich in einer für praktische Zwecke ausreichenden Weise über die Schutzwirkung eines Serums auf Grund des Laboratoriumsexperimentes ein Urteil zu bilden. Die meisten Untersucher stimmen darin überein, daß Kaninchen hierfür am geeignetsten sind. Sclavo hat als Erster darauf hingewiesen, daß man die besten Resultate erhält, wenn man das Serum intravenös injiziert und die Infektion der Tiere später subkutan vornimmt. Die von ihm weiter aufgestellte Behauptung jedoch, daß es bei dieser Versuchsanordnung möglich sei, ein Milzbrandserum quantitativ genau auszutitrieren und völlig glatte Reihen zu erhalten, ist entschieden etwas zu optimistisch. Verfasser hat im Laufe der Jahre durch zahlreiche Experimente, die auch von anderer Seite, namentlich durch Schubert, bestätigt worden sind, den Beweis liefern können, daß selbst das hochwertigste Milzbrandserum in dieser Hinsicht keine völlig eindeutigen Resultate liefert. So pflegt z. B. von einer größeren Anzahl von Kaninchen, welche die gleiche Serummenge injiziert erhalten und in der gleichen Weise später mit Milzbrand infiziert werden, immer nur ein bestimmter Teil die Infektion zu überstehen, ein anderer Teil aber zugrunde zu gehen. Selbst durch große Serummengen läßt sich an diesem Resultat in der Regel nichts ändern, wenn auch der Schutzwert des Serums stets darin zum Ausdruck gelangt, daß die vorbehandelten Tiere später als die Kontrolltiere der Infektion erliegen. Infolgedessen ist es auch nicht möglich, durch abgestufte Dosierung die Schutzgrenze eines Serums genau zu ermitteln, so daß es nur als ein glücklicher Zufall bezeichnet werden kann, wenn man einmal vollkommen glatte Reihen erhält. Die Regel ist, daß in einem derartigen Experimente die Tiere außerhalb der Reihe sterben bezw. mit dem Leben davonkommen. Trotzdem ist es empfehlenswert, mit fallenden Serummengen zu arbeiten und die Prüfung in der Weise vorzunehmen, daß man eine Anzahl von Kanin-

chen mit Dosen von etwa 2—6 ccm Serum vorbehandelt. Der Prüfungsmodus, der sich dem Verfasser seit längerer Zeit noch als der beste bewährt hat, besteht darin, daß 5 Tiere mit Serummengen von 2, 3, 4, 5 und 6 ccm intravenös behandelt und 5—10 Minuten später mit $^1/_{1000}$ Öse virulenter Kultur subkutan infiziert werden. Gleichzeitig erhält ein Kontrolltier die gleiche Virusmenge. Der Sicherheit wegen kann das Kontrolltier vorher 6 ccm normales Rinder-, Pferde- oder Schafserum injiziert bekommen, doch ist dies nicht unbedingt erforderlich, da zahlreiche Versuche immer wieder auf das deutlichste dargetan haben, daß normales Serum in dieser Dosis bei Kaninchen ohne jeglichen Einfluß auf eine virulente Milzbrandinfektion bleibt. Ein Serum wird auf Grund vielfacher Erfahrungen dann als spezifisch wirksam und brauchbar angesehen, wenn von den vorbehandelten Tieren mindestens 2 mit dem Leben davonkommen und die übrigen erst später als das Kontrolltier sterben. Bleiben mehr Tiere am Leben oder kommen gar sämtliche 5 Tiere mit dem Leben davon, während das Kontrolltier nach ca. 48 Stunden eingeht, so handelt es sich um ein außerordentlich wirksames, hochwertiges Serum. Die überlebenden Tiere sind, um dies nochmals hervorzuheben, keineswegs immer diejenigen, welche die größten Serummengen erhalten haben, es kann sich vielmehr ereignen, daß z. B. die Tiere mit 3 und 5 ccm Serum die Infektion überstehen, die übrigen aber sterben.

Mendez benutzte anfänglich zur Titrierung des Serums Kaninchen, denen Serum und Virus subkutan an verschiedenen Stellen des Rückens injiziert wurden. Während große Mengen eines wirksamen Milzbrandserums stets halfen, sowohl bei vorheriger als auch bei gleichzeitiger oder nachträglicher Einspritzung, sollten kleinere Dosen sich am besten nach der Infektion bewähren. Mendez empfahl daher, die Tiere zunächst zu infizieren und 24 Stunden später mit Serum zu behandeln, und behauptete, auf diese Weise den Schutzwert des Serums genau austitrieren zu können. Offenbar waren die Resultate aber doch nicht ganz befriedigend, denn der neuere Prüfungsmodus, den Mendez vorschlägt, weicht von dem älteren erheblich ab. Er besteht darin, daß Mischungen von Serum und Kultur Meerschweinchen subkutan injiziert werden. Zu diesem Zwecke wird die tausendfach tödliche Dosis einer mäßig virulenten Milzbrandkultur mit fallenden Serummengen vermischt. Diejenige Serumdosis, welche das Leben des Tieres um 6—8 Stunden gegenüber dem des Kontrolltieres verlängert, stellt $^1/_2$ I.-E dar. Ob das Verfahren tatsächlich die ihm nachgerühmte Exaktheit sichert, erscheint nach anderweitigen Erfahrungen zweifelhaft.

Detre-Deutsch nimmt die Wertbestimmung des Milzbrandserums an Kaninchen vor und bezeichnet ein Serum als normal, von dem 2 ccm bei intravenöser Injektion ausreichen, um ein 1,5 kg schweres Kaninchen gegen eine nach 18 Stunden vorgenommene Impfung mit virulenter Kultur zu schützen. Das Kontrolltier muß nach $2^1/_2$—3 Tagen sterben. Die besten Sera sollen eine Titergrenze von 0,5 ccm erreichen. Die Art der Prüfung schließt sich somit dem auch vom Verfasser geübten Verfahren eng an. Detre-Deutsch glaubt, auf diese Weise eine Titergrenze und ein „Normalserum“ genau ermitteln zu können.

Es ist trotz vielfacher darauf gerichteter Versuche bisher nicht geglückt, den Prüfungsmodus an Kaninchen noch sicherer und exakter zu gestalten; weder Änderungen der Art und Dosierung der Seruminjektion, noch solche des zwischen Serum- und Kultureinspritzung ge-

lassenen Zeitraumes beeinflussen die Ergebnisse in irgendwie entscheidender Weise. Die in größerem Umfange namentlich von SCHUBERT angestellten Ermittelungen haben dies in einwandfreier Weise dargetan; auch die neueren Experimente von ASCOLI bestätigen diese Erfahrungen. Im besonderen wird der Ausfall der Prüfung auch nicht dadurch beeinflußt, ob man die Tiere mit sporenfreiem oder sporenhaltigem Milzbrandmaterial infiziert. Die günstigeren Resultate, welche von anderer Seite berichtet worden sind und in der Tat auch gelegentlich erzielt werden können, sind lediglich bei einer schwächeren Infektion, d. h. bei Impfung der vorbehandelten Tiere mit einer nicht hochvirulenten Milzbrandkultur zu erreichen. In diesem Falle aber werden auch sofort die Kontrollen ungenau, insofern, als die unbehandelten oder aber mit normalem Serum injizierten Kaninchen mitunter erst sehr spät, nach 4—5 Tagen, der Infektion erliegen oder selbst mit dem Leben davonkommen. So erklärt es sich eben, wenn manche Untersucher mit dem von ihnen hergestellten Milzbrandserum besonders gute Wirkungen an Kaninchen erzielt haben wollen und behaupten, daß geringe Mengen von 0,5 ccm, und selbst darunter, die Tiere sicher schützen und damit das Serum als ein besonders hochwertiges und anderen Serumarten überlegenes charakterisieren. Daß in der Tat derartige Schlußfolgerungen nicht berechtigt sind, ist neuerdings auch durch ein anderes Prüfungsverfahren gezeigt worden, das ASCOLI ausgearbeitet hat und als sehr exakt empfiehlt.

ASCOLI nimmt die Prüfung des Serums nicht an Kaninchen, sondern an Meerschweinchen vor und benutzt zur Infektion der Tiere an Stelle einer virulenten Kultur einen abgeschwächten Milzbrandstamm in Gestalt eines von ihm dargestellten Sporenvaccins. Dieses letztere tötet Meerschweinchen gewöhnlich in $2^1/_2$—$3^1/_2$ Tagen, besitzt hingegen für Kaninchen, Esel und Ziegen keine Pathogenität. Der Prüfungsmodus gestaltet sich dabei so, daß das Serum intraperitoneal, die Kultur 24 Stunden später subkutan unterhalb der Achselhöhle eingespritzt wird. Die Kulturmenge beträgt stets $^1/_4$ ccm einer 16—20stündigen Bouillonkultur. Die von ASCOLI mitgeteilten, in zahlreichen Tabellen zusammengestellten Versuchsergebnisse, welche sich auf sehr verschiedene Milzbrandsera (ASCOLI, SCLAVO, DETRE-DEUTSCH, CARINI, SOBERNHEIM) erstrecken, lassen diese Prüfungsform als brauchbar erscheinen. ASCOLI erblickt in seiner Methode ein namentlich für vergleichende Untersuchungen zweckmäßiges Verfahren. Wird das Serum nicht intraperitoneal, sondern subkutan injiziert, so muß mit der nachfolgenden Infektion etwas länger, nämlich 2—3 Tage gewartet werden, will man einigermaßen sichere Resultate erhalten. Indessen steht diese Art der Prüfung der ersterwähnten an Exaktheit bedeutend nach, so daß nur einige Sera, wie aus den SCLAVOschen Mitteilungen ersichtlich ist, in dieser Weise ausgewertet werden konnten.

Eigenschaften und Wirkungsweise der Milzbrandantikörper.

Worauf die immunisierende Wirkung des Milzbrandserums zurückzuführen ist, kann noch nicht mit völliger Sicherheit entschieden werden. Zwar liegen eine große Reihe einschlägiger Untersuchungen vor, die sich mit der Erforschung der immunisierenden, sowie etwa vorhandener agglutinierender, bakteriolytischer, bakteriotroper Stoffe des Serums be-

schäftigen, doch sind die erhaltenen Resultate teils widersprechender, teils wenig eindeutiger Natur und jedenfalls von einer befriedigenden Klärung der komplizierten Verhältnisse weit entfernt. Das Milzbrandserum fügt sich, wie sich nach den bisherigen Erfahrungen sagen läßt, dem Schema sonst bekannter Immunsera nicht ohne weiteres ein.

Die immunisierende Substanz des Milzbrandserums stellt einen recht widerstandsfähigen Antikörper dar, da die Wirksamkeit des Serums lange Zeit erhalten zu bleiben pflegt, selbst wenn bei der Aufbewahrung ohne besondere Vorsicht verfahren wird. Verfasser konnte feststellen, daß ein mit Karbol versetztes Milzbrandserum, das dem Zutritt von Luft und Licht oft ausgesetzt war und wiederholt größere Temperaturschwankungen zwischen 5 und ca. 45° durchzumachen hatte, noch nach mehreren Jahren seinen Schutzwert anscheinend unvermindert bewahrt hatte. Auch durch Erwärmen auf 60—70° wird das Milzbrandserum gewöhnlich nicht abgeschwächt. Wohl aber übt, wie es scheint, das Gefrieren einen nachteiligen Einfluß auf die Schutzkraft des Serums aus.

Bezüglich der Filtration haben neuere Versuche von Ascoli gezeigt, daß die Immunsubstanz das Berkefeldfilter zu passieren vermag. Prüfung der Filtrate von drei verschiedenen Milzbrandseris ergab den gleichen Schutzwert wie vor der Filtration. Die Abschwächung der Wirkung, welche Verfasser demgegenüber bei filtriertem Serum an Schafen konstatieren konnte, scheint daher darauf hinzudeuten, daß die Beschaffenheit der Filterkerzen eine gewisse Rolle spielt. Es dürfte sich jedenfalls empfehlen, in denjenigen Fällen, wo filtriertes Serum zur Anwendung gelangen soll, also bei der Bekämpfung des Milzbrandes beim Menschen, die Prüfung des Serums erst nach der Filtration vorzunehmen.

Durch fraktionierte Sättigung des Serums mit Ammoniumsulfat läßt sich nach Ascoli feststellen, an welchen Eiweißbestandteil des Serums die Schutzwirkung gebunden ist. Das Verhalten ist bei verschiedenen Tierarten kein ganz gleiches. Beim Milzbrandserum vom Esel und von der Ziege wird die Immunsubstanz zum größten Teile in der Pseudoglobulinfraktion, bei der Ziege zum geringeren Teile auch in der Euglobulinfraktion wiedergefunden; das wirksame Pseudoglobulin des Eselserums büßt in wässeriger Lösung mit der Zeit seinen Schutzwert ein.

Der Immunkörper des Milzbrandserums kann kein antibakterieller bzw. bakteriolytischer der gewöhnlichen Art sein und besitzt nicht die Eigenschaften eines bakteriolytischen Ambozeptors. Das Milzbrandserum äußert, wie Reagenzglasversuche ohne weiteres lehren, keine spezifisch erhöhten bakteriziden Fähigkeiten im Vergleich mit einem normalen Serum der gleichen Tierart. Geringe Differenzen zugunsten des Immunserums, wie man sie gelegentlich tatsächlich wahrnehmen kann, sind gegenüber dem hochgradigen Schutzwert des gleichen Serums geradezu verschwindend und treten gewöhnlich nur in stärkeren Konzentrationen zutage. Der Mangel spezifisch-bakterizider Wirkungen läßt sich sowohl bei einem frisch gewonnenen komplementhaltigen Serum nachweisen, wie auch bei einem solchen Serum, das zunächst durch Erhitzen inaktiviert und späterhin mit frischem Komplement versetzt worden ist. Die abweichende Beobachtung von Ottolenghi, wonach die bakterizide Wirkung des normalen Eselserums weniger prompt sein soll als die des Immunserums, bei beiden Serumarten durch einstündiges Erwärmen auf 57—58° zerstört und durch Zusatz normalen Serums wiederhergestellt werden soll, dürfte für normale und spezifische Sera anderer Tierarten beim Milzbrand keine Gültigkeit haben.

Auch innerhalb des Tierkörpers läßt sich eine Ambozeptorwirkung als entscheidende Eigenschaft des Milzbrandimmunkörpers nicht erkennen. Versuche, welche von Verfasser wiederholt in der Weise angestellt worden sind, daß Mischungen von Serum und Kultur Kaninchen und Meerschweinchen intraperitoneal injiziert wurden, um die hier etwa unter dem Bilde des PFEIFFERschen Phänomens auftretenden Veränderungen zu studieren, ergaben im großen und ganzen ein negatives Resultat. Eine Einschmelzung der Bakterien zu Granula oder gar eine rasche Auflösung der Bakterien läßt sich nicht beobachten. Auch eine erhöhte Phagocytose kann — wie schon an dieser Stelle bemerkt sei — bei der eben erwähnten Versuchsanordnung keineswegs als spezifische Wirkung des Milzbrandserums konstatiert werden. Dementsprechend versagen auch nach den Feststellungen von SCHUBERT alle Bemühungen, die immunisierende Wirkung des Milzbrandserums bei kleineren Tieren, wie Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten, etwa durch Komplementzusatz zu erhöhen. Die immunisierende Kraft des Milzbrandserums kann eben nach alledem wohl nicht auf die kombinierte Wirkung von Ambozeptor und Komplement im gewöhnlichen Sinne zurückgeführt werden.

Die Immunsubstanz des Milzbrandserums wird anscheinend auch nicht wie ein Ambozeptor an ihr Antigen verankert. Wird der Milzbrandrasen einer Agarplatte in einer größeren Menge (70 ccm) Milzbrandserum fein verteilt, so daß eine homogene Emulsion der Bakterienleiber im Serum entsteht, und diese einige Stunden im Brütschrank und hierauf über Nacht im Eisschrank gehalten, so zeigt sich, daß das von den Bakterien durch Filtration befreite Serum nunmehr genau den gleichen Schutzwert besitzt wie vorher; andererseits erweisen sich die auf dem Filter zurückgebliebenen, vom Serum befreiten Milzbrandbazillen von unveränderter Virulenz (ASCOLI). Die Immunsubstanz des Serums zeigt somit nicht das Verhalten eines Ambozeptors und ist jedenfalls verschieden von Stoffen, welche CLER nach der Methode der Komplementbindung (BORDET) im Milzbrandserum nachgewiesen und als spezifische Ambozeptoren erkannt haben will. Schon BORDET und GENGOU hatten übrigens auf diese Weise spezifische Reaktionen erhalten, doch scheint es sich dabei um einen mehr unregelmäßigen Befund zu handeln. Wenigstens konnte Verfasser bisher mit verschiedenen Proben wirksamer Milzbrandsera unter Benutzung von Milzbrandkulturen, Kulturextrakten und Milzbrandödem als Antigen eine Komplementfixation nicht erhalten. Daß das Milzbrandserum mit Milzbrandödem (BAIL) und mit Milzbrandbazillenextrakten (GRUBER und FUTAKI) spezifische Präzipitate gibt, sei demgegenüber hervorgehoben.

Über die Agglutination gehen die Beobachtungen beim Milzbrandserum etwas auseinander. Während Verfasser in Übereinstimmung mit verschiedenen Untersuchern angegeben hatte, daß eine spezifisch-agglutinierende Fähigkeit dem Milzbrandserum gewöhnlich fehle, hat CARINI bei einer größeren Reihe verschiedener Serumarten eine starke Agglutinationswirkung konstatieren können. Er fand, daß manche Sera noch in 50 000—150 000, ja selbst 500 000facher Verdünnung virulente Milzbrandstämme deutlich agglutinierten. Eine erneute Nachprüfung dieser Verhältnisse durch GOTTSTEIN hat gezeigt, daß frisch gewonnenes, hochwertiges Milzbrandserum nahezu jeder agglutinierenden Fähigkeit entbehren kann. Bei Vermischung verschiedener Milzbrandsera vom Pferde, Rinde und Hammel mit Kochsalzaufschwemmungen virulenter und abgeschwächter Milzbrandkulturen trat so gut wie niemals eine makroskopisch oder mikro-

skopisch erkennbare Agglutination ein. Selbst das unverdünnte Serum wirkte in der Regel nicht, obwohl alle geprüften Sera von hochimmunisierten Tieren stammten und im Tierversuch starke Schutzkraft äußerten. Bail spricht dem Milzbrandserum gleichfalls besondere agglutinierende Fähigkeiten ab. De Nittis hat angegeben, daß normales Taubenserum Milzbrandbakterien nicht agglutiniere, während dasjenige künstlich immunisierter Tauben — in Verdünnungen von 1:50 — deutliche Wirkung äußere. Sawtschenko fand Pferdeserum in jedem Falle agglutinierend, gleichgültig, ob es von normalen oder präventiv geimpften Tieren stammte, während umgekehrt Hundeserum beider Kategorien niemals diese Fähigkeit besaß. Rissling konstatierte gleichfalls die agglutinierende Wirkung des normalen Pferde- und Rinderserums. Nach Gengou werden die abgeschwächten Kulturen des Vaccin I schon durch normales Meerschweinchen-, Rinder-, Hunde- und Menschenserum agglutiniert. Werden die Tiere (Meerschweinchen, Hund, Ziege) aber durch einmalige oder wiederholte Injektion mit Vaccin I behandelt, so gewinnt deren Serum für Vaccin I erheblich stärker agglutinierende Eigenschaften, während eine Impfung der Tiere mit virulentem Milzbrand die Agglutinationskraft ihres Serums für Vaccin I nicht zu steigern vermag. Nach anderweitigen Beobachtungen ist indessen diese von Gengou festgestellte spezifische Agglutinationswirkung, welche immer nur den zur Vorbehandlung benutzten Bakterienstamm treffen soll, keineswegs konstant. Die Agglutination bleibt oft genug auch bei Prüfung des Serums gegenüber der homologen Kultur vollständig aus.

Nach alledem läßt sich soviel erklären, daß die Agglutinationswirkung des Milzbrandserums eine ziemlich inkonstante Erscheinung darstellt, die zwar mitunter nachweisbar ist, häufig aber auch dem hochwertigsten Serum fehlen kann und somit jedenfalls keinen Maßstab für den Gehalt des Serums an Immunsubstanzen abgibt. Selbst in denjenigen Fällen, wo noch in stärkeren Verdünnungen des Serums Agglutination beobachtet wird, kann es vorkommen, daß andere Milzbrandstämme durch das gleiche Serum gar nicht oder höchst unvollkommen agglutiniert werden.

Wohl läßt sich nachweisen, daß Milzbrandbakterien, welche mehr oder minder lange Zeit mit dem Serum in Berührung gewesen sind, gewisse morphologische Veränderungen erfahren. Bringt man Milzbrandbazillen in karbolfreies, bei 56° inaktiviertes Serum und läßt sie hierin bei 37° zur weiteren Entwicklung gelangen, so kann man sich leicht überzeugen, daß sie schon nach kurzer Zeit des Wachstums (10—12 Stunden) diese charakteristischen Zeichen darbieten. Sie erscheinen aufgequollen, lassen eine scharf abgesetzte äußere Hülle erkennen, zeigen Plasmolyse und nehmen Farbstoffe nicht mehr gut an. Alle diese Veränderungen treten bei längerem Aufenthalt in dem Serum, nach 2—3 Tagen, gewöhnlich noch deutlicher hervor. Wenn sich etwas derartiges zwar in dem Immunserum meist in besonders rascher und ausgesprochener Weise entwickelt, so ist doch die gleiche Wirkung auch in dem normalen Serum zu konstatieren. Pferdeserum, Rinderserum und Hammelserum rufen die geschilderten morphologischen Veränderungen bei Milzbrandbazillen hervor, gleichgültig, ob diese Sera von normalen oder hochimmunisierten Tieren gewonnen werden.

Bei nicht zu geringer Aussaat können die Milzbrandbakterien in dem Serum längere Zeit lebensfähig erhalten und fortgezüchtet werden. Die Vermutung, daß derartige Bakterien nun etwa eine Abschwächung

ihrer Virulenz erfahren, hat indessen durch weitere experimentelle Ermittlungen nicht bestätigt werden können. Werden Milzbrandbazillen in dem Serum kultiviert, am besten in der Weise, daß man in regelmäßigen Zwischenräumen von etwa 2—3 Tagen einige Tropfen der Serumkultur in neue Serumröhrchen überträgt, so ist selbst nach wochenlanger Fortzüchtung eine Abschwächung der Bakterien nicht zu konstatieren. Eine Agarkultur, welche aus dem Serum frisch angelegt wird, besitzt in der Regel zum mindesten die gleiche Virulenz wie vorher. Es gewinnt sogar eher den Anschein, als würden die Bakterien durch den längeren Aufenthalt in dem Serum noch in ihrer Virulenz gesteigert. Es tritt, wie schon Danysz bei seinen Untersuchungen über die Immunisierung der Milzbrandbakterien gegen das Rattenserum festgestellt hat, auch in anderen Serumarten offenbar eine Gewöhnung der Milzbrandbazillen an die bakterienwidrigen Einflüsse der Sera ein (vgl. auch Sacharoff). Milzbrandbazillen, welche einige Zeit in einem von Rindern, Schafen oder Pferden stammenden Immunserum fortgezüchtet werden, besitzen gewöhnlich außerordentlich hohe Virulenz. Ob freilich diese Wirkung nur dem Immunserum zukommt, ist zweifelhaft. Auch in dem normalen Serum der gleichen Tierarten scheint die Virulenz der Milzbrandbazillen zum mindesten unverändert zu bleiben.

Von ganz besonderem Interesse ist endlich die Frage, ob dem Milzbrandserum bakteriotrope Eigenschaften zukommen. Gerade in jüngster Zeit hat man sich vielfach mit Untersuchungen dieser Art beschäftigt. Ein eindeutiges Resultat ist jedoch bisher nicht erzielt worden, und zwar wesentlich deshalb, weil die Leukocyten der verschiedenen Tierarten in der Regel schon für sich allein imstande sind, in vitro Milzbrandbazillen auf dem Wege der Phagocytose zu vernichten, ein die Phagocytose befördernder Einfluß des Serums also schwer zu prüfen ist. Die Arbeiten von Wright und Douglas, Löhlein, Gruber und Futaki haben sich vor allen Dingen um die Klärung dieser Verhältnisse bemüht. Stellt man Reagenzglasversuche in der bekannten Weise so an, daß man einer Aufschwemmung von Milzbrandbakterien in Kochsalzlösung gut gewaschene Leukocyten hinzufügt und die Mischung nun kurze Zeit bei Brutwärme aufbewahrt, so werden die Milzbrandbazillen sehr bald von den Leukocyten unter dem Bilde der Phagocytose aufgenommen und vernichtet. Diese Wirkung tritt ein, auch wenn die Kochsalzaufschwemmungen ohne jeden Serumzusatz bleiben, und wird durch Zusatz von inaktiviertem normalen Serum oder Immunserum nur unwesentlich befördert. Im besonderen scheint hier zwischen dem Einfluß des normalen und des Immunserums keine entscheidende Differenz zu bestehen. In denjenigen Röhrchen, welche außer den Bakterien und den Leukocyten noch Serum enthalten, pflegt die Phagocytose lediglich etwas früher einzusetzen und etwas rascher zu verlaufen als in den Kontrollröhrchen mit Kochsalzlösung, doch sind diese Unterschiede keineswegs konstant, nicht sehr ausgesprochen und schon nach 30—40 Minuten meist vollkommen verwischt. Die Leukocyten von Kaninchen, Meerschweinchen und Menschen verhalten sich in dieser Hinsicht fast ganz gleich; die Leukocyten vom Hunde und vom Huhn zeichnen sich nach Gruber durch die Fähigkeit einer ganz besonders energischen Phagocytose aus. Das Bild, das die Leukocyten bei der Vertilgung der Milzbrandbazillen bieten, ist ein recht charakteristisches. Man sieht, namentlich an Kaninchen-, aber auch bei Meerschweinchen-Leukocyten, wie eine größere Zahl dieser Zellen sich

an den Milzbrandfäden perlschnurartig aufreihen und sich zu Klumpen zusammenknäueln, in denen dann jeder Leukocyt einen Faden an mehreren Stellen oder gleichzeitig mehrere Fäden berührt; sobald die Milzbrandbazillen getötet sind und ihr Protoplasma verdaut ist, wird die Verklumpung der Leukocyten wieder gelöst (Gruber).

Auch im Tierversuch lassen sich sichere Anhaltspunkte für eine die Phagocytose befördernde Wirkung des Milzbrandserums nicht gewinnen. Die Angaben von Marchoux, wonach bei intraperitonealer Infektion die Milzbrandbazillen rasch von Leukocyten aufgenommen werden sollen, wenn es sich um aktiv oder passiv immunisierte Tiere handelt, dürften nicht im Sinne einer spezifischen Immunitätsreaktion zu deuten sein. Wenigstens liefern vergleichende Untersuchungen über die Wirkung des normalen Serums und des Immunserums auf den Ablauf der intraperitonealen Milzbrandinfektion bei Meerschweinchen den Beweis, daß die Phagocytose in beiden Fällen gewöhnlich die gleiche Intensität erreicht. Wenn man Meerschweinchen 1 Öse virulenter oder abgeschwächter Kulturen (Vaccin I und II) in die Bauchhöhle spritzt, und zwar nach vorhergegangener Seruminjektion oder auch mit Serum gemischt, und nun mit der Kapillarmethode Tröpfchen des Exsudates von Zeit zu Zeit untersucht, so beobachtet man meist sehr bald eine mehr oder minder starke Phagocytose. Bei der Verwendung von Immunserum kann sich der Vorgang, wie die Beobachtungen von Gottstein und Verfasser gezeigt haben, gelegentlich einmal etwas rascher abspielen als bei normalem Serum, doch sind die Unterschiede nicht so in die Augen springend, daß man etwa von einer qualitativ differenten Wirkung des Immunserums sprechen könnte. In einem späteren Stadium vermögen übrigens die Milzbrandbazillen mitunter wieder in Freiheit zu treten und sich weiter zu vermehren, um alsdann den Tod der Tiere herbeizuführen. So findet man trotz anfänglicher ausgesprochener Phagocytose bei der Sektion der Tiere fast nur freie Milzbrandbazillen neben bakterienfreien Leukocyten.

Es ist in hohem Maße bemerkenswert, daß die aus dem Körper von Milzbrandtieren gewonnenen Bazillen im Gegensatz zu den „Kulturbazillen“ der Phagocytose anscheinend nicht zugänglich sind. Dies bestätigt der Reagenzglasversuch, wie namentlich von Gruber und Löhlein neuerdings mit Recht betont wird. Wenn man die aus der Peritonealhöhle oder aus der Ödemflüssigkeit von Milzbrandtieren gewonnenen Bazillen in ungewaschenem oder gewaschenem Zustande mit Leukocyten von Kaninchen oder Meerschweinchen zusammenbringt, so bleibt jede phagocytäre Wirkung aus, obwohl, wie bekannt, die gleichen Leukocytenarten die gewöhnlichen Kulturbazillen außerordentlich energisch aufzufressen pflegen. Die gleichen antiphagocytären Eigenschaften wie die Körperbazillen besitzen auch Milzbrandbazillen, die in Serum kultiviert werden, und es ist wohl höchst wahrscheinlich, daß die hier sowohl wie bei den Körperbazillen mikroskopisch erkennbare stark entwickelte Kapsel für den Widerstand der Bakterien gegenüber den Leukocyten von großer Bedeutung ist. Inwieweit etwa eine Aggressinwirkung im Sinne Bails in Betracht zu ziehen ist, läßt sich zurzeit mit Sicherheit nicht entscheiden. Ebensowenig liegen bisher exakte Versuche über die Frage vor, ob etwa das Milzbrandserum imstande ist, einen spezifisch-bakteriotropen Einfluß auf derartige „Kapsel-“ oder „Körperbazillen“ auszuüben.

Welchen Eigenschaften das Milzbrandserum seine immunisierende Kraft verdankt, läßt sich somit heute noch nicht klar erkennen. Wenn man auch wohl annehmen muß, daß hierbei antibakterielle Einflüsse im Spiele sind, so dürften diese letzteren doch jedenfalls von den bisher bekannten Formen der bakteriolytischen und bakteriotropen Wirkung verschieden sein. Es verdient aber andererseits die Tatsache hervorgehoben zu werden, daß im Körper hochimmunisierter Tiere die Milzbrandbazillen oft sehr lange Zeit lebend und virulent erhalten bleiben können, ohne daß den Tieren hieraus irgend ein erkennbarer Nachteil erwächst. So findet man, wie schon an früherer Stelle bemerkt, bei der Untersuchung des Blutes von Pferden, Rindern und Schafen, die eine hohe aktive Immunität erlangt haben, nach einer Injektion größerer Bakterienmengen, von etwa 2—3 Massenkulturen, öfters noch nach 9—10 Tagen sehr zahlreiche Milzbrandbazillen. Wenn diese letzteren auch nicht während der ganzen Zeit ununterbrochen im Blute nachweisbar sind, vielmehr schon 24 Stunden nach der Impfung zu verschwinden pflegen, um dann von neuem für eine kurze Dauer zu dem genannten Zeitpunkte im Blute wieder aufzutreten, so geht aus dieser Beobachtung doch unzweifelhaft hervor, daß der immune Organismus die virulenten Bakterien recht lange in seinem Körper beherbergt, ehe er imstande ist, sich ihrer in irgend einer Weise zu entledigen. Eine besonders rasche und energische Abtötung der injizierten Bakterien kann also unmöglich die entscheidende und ausschließliche Ursache der Immunität sein. Das immunisierte Tier zeigt sich eben, wie derartige Beobachtungen lehren, trotz der Anwesenheit zahlreicher virulenter Bakterien für deren sonst so deletäre Wirkung so gut wie unempfindlich. Daher hat Verfasser die Ansicht ausgesprochen, daß das Milzbrandserum wohl auch über „antitoxische“ Kräfte verfügen müsse, obwohl uns ein Milzbrandtoxin bisher ja nicht bekannt ist, und Mendez bezeichnet das Serum ohne weiteres als Milzbrandantitoxin. Ganz analoge Beobachtungen hat auch Bail bei der Untersuchung seines nach besonderen Grundsätzen hergestellten Milzbrandserums an Kaninchen gemacht. Er fand, daß im Körper von aktiv oder passiv immunisierten Tieren die Zahl der injizierten Milzbrandbazillen nach verhältnismäßig kurzer Zeit (18—20 Stunden) zwar eine erheblich geringere zu sein pflegt, als bei den gleichzeitig infizierten Kontrolltieren, daß aber trotz dieses deutlichen Unterschiedes die Organe der immunisierten Individuen keineswegs steril sind, sondern immer noch eine kleine Zahl lebender Bakterien enthalten. Die Milzbrandbazillen gehen also in dem Körper eines Immuntieres durchaus nicht besonders schnell zugrunde.

Inwieweit im übrigen das Bailsche Milzbrandserum sich nach seiner Zusammensetzung und Wirkungsweise von anderen Serumarten unterscheidet, läßt sich vorläufig nicht bestimmt sagen. Bail scheint geneigt, einen Unterschied anzunehmen und die Wirkung seines Milzbrandserums als eine reine Antiaggressinwirkung aufzufassen.

Die von Bail über die Herstellung und die spezifischen Eigenschaften seines Milzbrandserums gemachten kurzen Angaben sind die folgenden: Das Serum wird gewonnen von Kaninchen oder Schafen, welche durch wiederholte Injektionen mit sterilisiertem Milzbrandödem vorbehandelt worden sind, und besitzt einen ausgesprochenen Schutzwert, der so hoch geht, daß schon Bruchteile eines Kubikzentimeters, intravenös eingespritzt, normale Kaninchen vor der subkutanen Infektion mit rund 1000 Bazillen zu schützen vermögen. Eine Immunisierung von Mäusen gelingt nur in einem kleinen Bruchteil der Fälle, während bei Meer-

schweinchen höchstens eine Verlängerung der Krankheitsdauer, aber keine lebensrettende Wirkung zu erzielen ist. Bemerkenswert ist, daß in den Organen von Mäusen und Kaninchen, welche zu geringe Serummengen erhalten haben, nicht aber bei Meerschweinchen, die Lagerung der sehr spärlichen und mehr oder minder degenerierten Bakterien gewisse Besonderheiten aufweist. Man sieht nämlich in Ausstrichpräparaten der Milz längere Strecken fast bazillenfrei, während an einzelnen Stellen Häufchen, meist als verschlungene kurze oder mittellange Fäden, zusammenliegen. Auch zur Immunisierung von Schafen ist die Injektion von 5—10 ccm Serum ausreichend. Das Serum übt eine sehr starke präzipitierende Wirkung auf Milzbrandödem aus, die nach den von Bail angestellten Kontrollversuchen offenbar auf eine spezifische Reaktion zwischen Milzbrandantigen und Milzbrandantikörper zurückgeführt werden muß. Ein engerer Zusammenhang zwischen fällender und schützender Kraft des Serums scheint nach Bails Versuchen jedoch nicht zu bestehen. Besondere agglutinierende Eigenschaften kommen dem Immunserum nicht zu; ebensowenig nimmt Bail nach Reagenzglasversuchen und den oben bereits erwähnten Tierexperimenten eine bakteriolytische Wirkung an. Die Milzbrandbakterien sollen unter dem Einflusse des Immunserums im Körper aktiv oder passiv immunisierter Tiere lediglich an ihrer weiteren Vermehrung gehindert, dann aber durch die normalen Schutzkräfte des Organismus abgetötet und eliminiert werden.

Eine gründliche Nachprüfung der Bailschen Angaben wäre von großem Interesse. Da eine genauere Beschreibung der technischen Einzelheiten bisher nicht vorliegt, haben verschiedene Autoren mit der Gewinnung eines geeigneten „Milzbrandaggressins“ Schwierigkeiten gehabt und daher keine befriedigenden Resultate erzielt. So hat sich Ascoli nach dieser Richtung vergeblich bemüht, und auch Verfasser konnte, trotz zahlreicher Versuche, noch nicht zu eindeutigen und überzeugenden Ergebnissen gelangen.

Neuerdings hat Ascoli den Wirkungsmechanismus des Milzbrandserums durch die Theorie der „antiblastischen“ Immunität zu erklären gesucht. Durch das methodische Studium der bei passiv immunisierten Tieren an der Impfstelle sich abspielenden Vorgänge wurde er zu einer besonderen Auffassung bezüglich der veränderten Färbbarkeit (metachromatischen Reaktion) bei Methylenblaubehandlung und der Kapselbildung der Bakterien im Tierkörper geführt. Ascoli betrachtet diese Erscheinungen weder mit Sclavo als den Ausdruck einer Degeneration, noch auch mit Deutsch, Gruber, Löhlein u. a. als eine Schutzmaßregel der Bakterien gegen die schädigenden Einflüsse der Körpersäfte und Phagozyten, sondern erblickt darin die Folge „eigenartiger Stoffwechselvorgänge des Bacillus anthracis auf dem gebotenen Nährboden“. Es liegen nach seiner Ansicht „spezifische, mit dem Anpassungsvermögen der Bakterien eng verknüpfte Prozesse“ vor. Die erwähnten Veränderungen stehen aber weiterhin mit der Virulenz der Bakterien im innigsten Zusammenhang, indem nur der vollvirulente Milzbrand die typischen Eigenschaften der Körperbazillen innerhalb des infizierten Organismus vollkommen hervortreten läßt, während abgeschwächte Stämme unter den gleichen Bedingungen neben den Kapselformen mit geringem Tinktionsvermögen auch die Formen der Kulturbazillen aufweisen und avirulente Stämme in der Regel überhaupt keine Kapselbildung zeigen. Alles dies läßt sich bei Meerschweinchen nach subkutaner Impfung gut beobachten. Die keimwidrige — antiblastische — Wirkung des Milzbrandserums soll

nach Ascoli nun darin bestehen, daß es die zur Kapselbildung führenden Anpassungsvorgänge hemmt. Er konnte nämlich zeigen, daß auch diejenigen Stämme, welche bei normalen Tieren alsbald die Eigenschaften der Körperbazillen annehmen und tödlich wirken, bei passiv immunisierten Meerschweinchen ihre kulturellen Formen bewahren und damit zugleich an Virulenz verlieren. Die schützende Kraft des Milzbrandserums geht dieser keimwidrigen Wirkung parallel.

Im wesentlichen stimmt die von Ascoli vorgetragene Theorie, wie man sieht, mit der Anschauung derjenigen Forscher überein, welche in der Kapselbildung der Milzbrandbazillen, in der Entstehung der „Körperbazillen", ein für die Infektion bzw. Immunität bedeutsames Moment erblicken. Nur daß Ascoli in der Beurteilung dieses Phänomens einen abweichenden Standpunkt einnimmt. Freilich läßt sich schon jetzt sagen, daß die Behinderung der Kapselbildung unmöglich die einzige Erklärung für die schützende Wirkung des Milzbrandserums sein kann. Die wiederholt hervorgehobene Tatsache, daß bei immunisierten Individuen gelegentlich reiche Mengen von Milzbrandbazillen gewissermaßen als Saprophyten im Blute vegetieren können, und der weitere Umstand, daß diese Bakterien die typischen Kapselformen erkennen lassen, weisen unzweifelhaft noch auf einen anderen Zusammenhang hin.

Praktische Anwendung des Milzbrandserums.

Das Milzbrandserum kann zur Bekämpfung des Milzbrandes bei Rindern, Schafen, Pferden, auch Schweinen verwendet werden, und zwar sowohl zu Schutzimpfungszwecken, wie auch zur Heilung. Ebenso ist das Milzbrandserum zur therapeutischen Anwendung beim Milzbrand des Menschen geeignet.

Daß es möglich ist, Schafe durch spezifisches Serum mit Sicherheit gegen Milzbrand zu immunisieren, ist zuerst durch Verfasser experimentell dargetan worden. Spätere Beobachtungen bestätigten dann das Gleiche auch für Rinder. Sclavo empfahl für Immunisierungs- und Heilzwecke besonders die intravenöse Injektion und fand, daß schon verhältnismäßig geringe Mengen eines hochwertigen Milzbrandserums (10 ccm) ausreichten, um Schafe gegen eine sonst tödliche Infektion sicher zu schützen. Zur Heilung infizierter Tiere erwies sich die Injektion des hochwertigen Serums gleichfalls geeignet, und zwar gelang es ihm, selbst dann noch Schafe zu retten, wenn in ihrem Blute bereits Milzbrandbazillen nachgewiesen werden konnten, also eine verhältnismäßig lange Zeit seit der Impfung verstrichen war. Die gleiche Tatsache ist inzwischen auch für Rinder und Pferde, neuerdings ganz besonders durch Riegler, Jäger, Räbiger, wiederholt bestätigt worden.

Auf Grund der Erfahrungen, welche in den letzten Jahren von einer größeren Zahl von Autoren (Sclavo, Mendez, Carini, Detre-Deutsch, Ascoli u. a.) gesammelt worden sind, läßt sich für die Anwendungsweise des Milzbrandserums etwa folgendes vorschlagen:

Für die Zwecke der Schutzimpfung kommt das Milzbrandserum überall da in Betracht, wo es nötig ist, möglichst rasch gefährdete Individuen zu immunisieren. In Fällen, wo eine Herde bereits stark infiziert erscheint und Milzbrandverluste erlitten hat, können die übrigen, anscheinend noch gesunden Tiere durch das Milzbrandserum geschützt werden. Es empfiehlt sich, 10—20 ccm wirksamen Serums

zu injizieren, am einfachsten subkutan. Sowohl bei Rindern wie bei Pferden hat man auf diese Weise in einer ganzen Reihe von Fällen der Verbreitung des Milzbrandes erfolgreich entgegentreten können. Da indessen die passive Immunität, welche den Tieren auf diese Weise verliehen wird, nur von kurzer Dauer ist und in der Regel nach wenigen Wochen zu erlöschen scheint, so ist bei fortbestehender Infektionsgefahr eine spätere aktive Nachimpfung entschieden anzuraten. Als solche hat sich die kombinierte Immunisierung in Form der Simultanimpfung durchaus bewährt (Sobernheim). Auch das Pasteursche Verfahren kann zu diesem Zwecke angewendet werden (Carini).

Zur Heilung erkrankter Tiere ist das Serum in größeren Dosen und am sichersten intravenös zu injizieren. Die Dosis richtet sich ganz nach dem Zeitpunkt und der Schwere der Erkrankung. Unter Umständen führen schon 25 ccm Serum zum Ziele, doch ist es in zweifelhaften Fällen entschieden besser, größere Mengen von 50—100—150 ccm zu injizieren. Die Benutzung derartiger Heildosen ist auch dann in Betracht zu ziehen, wenn in einem infizierten Bestande einige Individuen zwar noch keine sichtbaren Krankheitserscheinungen darbieten, aber z. B. durch erhöhte Körpertemperatur der Infektion verdächtig erscheinen. Bei Rindern und Pferden lassen sich durch energische Serumbehandlung oft noch überraschend günstige Heilerfolge erzielen. Wenn irgend angängig, soll man das erforderliche Serumquantum den Tieren auf einmal einspritzen. Die Wirkung der Seruminjektion ist möglichst genau zu verfolgen und durch Temperaturmessung und, soweit ausführbar, durch bakteriologische Blutuntersuchung zu kontrollieren. Die Temperatur pflegt sehr bald nach der Seruminjektion zu sinken, auch der Allgemeinzustand der Tiere sich sichtlich zu bessern, so daß selbst solche Individuen, die anfänglich bedrohliche Erscheinungen dargeboten hatten, schon 1—2 Tage nach der Einspritzung völlig hergestellt sein können. Tritt von neuem Temperatursteigerung ein, oder zeigt der Allgemeinzustand keine erhebliche Besserung, oder kann man gar im Blute der Tiere Milzbrandbazillen nachweisen, so ist die Seruminjektion zu wiederholen. So gelingt es oft, bei sorgfältiger Überwachung des Krankheitsverlaufes, auch aussichtslos erscheinende Fälle durch die Serumtherapie zu retten.

Nebenwirkungen toxischer Art sind bei dem Milzbrandserum nur relativ selten beobachtet worden. Gelegentlich machen sich nach der Serumeinverleibung bei Rindern Urticaria-ähnliche Erscheinungen bemerkbar, die außerordentlich rasch, innerhalb der ersten halben Stunde nach der Injektion einsetzen können, mit Fieber, Schwellung der Schleimhäute und allgemeiner Unruhe der Tiere einhergehen, aber meist nach kurzer Zeit wieder vollkommen verschwinden. Offenbar handelt es sich um eine besondere Empfindlichkeit der betreffenden Individuen für das fremdartige Eiweiß (Pferde-, Schafserum). Eine nachhaltige Schädigung durch die erwähnten Nebenwirkungen darf nach den vorliegenden Erfahrungen als ausgeschlossen gelten. Über lähmungsartige Schwäche im Anschluß an Simultanimpfungen vgl. Kap. XXIV, Bd. I, S. 892.

Über die Anwendung und Wirksamkeit des Milzbrandserums beim Menschen sind namentlich in Italien und in den La Plata-Staaten ausgedehnte Erfahrungen gesammelt worden (Sclavo, Pizzini, Sanna, Mendez und Lemos, Abba, Lazzaretti, Cicognani, Dasso und viele andere). Nach der Anweisung Sclavos sind 30—40 ccm, an 3—4 Stellen verteilt, subkutan zu injizieren. Nach 24 Stunden soll, wenn

keine Besserung der lokalen oder allgemeinen Erscheinungen eingetreten ist, die Injektion (20—30 ccm) in gleicher Weise wiederholt werden. In schweren Fällen sind intravenöse Injektionen von 10 ccm zu empfehlen. MENDEZ rät, von dem von ihm hergestellten Milzbrandserum 3 ccm zu injizieren und bei schweren Fällen die Injektion innerhalb der ersten 24 Stunden zu wiederholen. Intravenöse Injektionen von 150 ccm Serum — auf einmal eingespritzt — sind in zwei Fällen von BANDI mit bestem Erfolge versucht worden.

Die Allgemeinerscheinungen pflegen nach der Seruminjektion eine entschiedene Besserung zu erfahren, auch der lokale Prozeß kommt gewöhnlich zum Stillstand. Eine Abschwellung des Ödems kann bisweilen schon innerhalb 24 Stunden erfolgen. Das Verhalten der Körpertemperatur scheint indessen kein ganz gleichmäßiges zu sein. In vielen Fällen ist die Seruminjektion von einem raschen Temperaturabfall gefolgt, während bei anderen Personen das Fieber zunächst in die Höhe geht. So erblickt SCLAVO gerade in der Temperatursteigerung nach der Seruminjektion ein prognostisch günstiges Zeichen, wogegen MENDEZ den raschen Temperaturabfall bis zur Norm innerhalb der nächsten 24 Stunden als entscheidend ansieht und geradezu als Krisis bezeichnet. Tatsache ist jedenfalls, daß in beiden Fällen die Patienten durch den serumtherapeutischen Eingriff gerettet werden können, die besonderen Verhältnisse der Körpertemperatur also nicht ohne weiteres einen Maßstab für die Wirkung der Seruminjektion abgeben. Verfasser hat bei den in Deutschland ausgeführten, freilich nicht sehr zahlreichen Impfungen einen deutlichen Einfluß der Seruminjektion auf den Fieberverlauf bisher nicht konstatieren können. Zur Anwendung gelangte hier ein hochwertiges Milzbrandserum von Schafen, ausnahmsweise auch ein Mischserum von Schafen und Pferden. Das Serum wurde entsprechend dem Vorschlage der italienischen Autoren in Mengen von 10—20 ccm angewendet und fast stets intravenös injiziert (vgl. WILMS).

Beobachtungen über die Brauchbarkeit des Milzbrandserums zur Schutzimpfung von Menschen dürften bisher nicht vorliegen. Vielleicht würde es sich empfehlen, auch nach dieser Richtung in gefährdeten industriellen Betrieben Versuche anzustellen.

Literatur.

1) ABBA, Cit. nach BAUMGARTENs Jahresbericht 1899.
2) ASCOLI, Zeitschr. für physiol. Chemie 1906, Bd. XLVIII. Ref. Biochem. Centralbl. 1906, Bd. V. Zeitschr. für Hygiene 1906, Bd. LV. Centralbl. für Bakt. 1908, Orig., Bd XLVI.
3) BAIL, Centralbl. für Bakt., 1904, Orig., Bd. XXXVI; 1905, Bd. XXXVII; 1908, Bd. XLVI.
4) BANDI, Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVII.
5) BORDET und GENGOU, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, pag. 289.
6) CARINI, Schweizer Arch. für Tierheilk. 1904. Deutsche med. Wochenschr. 1904.
7) CICOGNANI, Ref. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXI.
8) CLER, Centralbl. für Bakt. 1904, Orig. Bd. XXXVII.
9) DANYSZ, Ann. de l'Inst. Pasteur 1900.
10) DASSO, Seroterapia en el carbunclo extern. del hombre. Buenos Aires.
11) DETRE-DEUTSCH, VIII. Internat. Tierärztl. Kongreß, Budapest 1905.
12) DEUTSCH und FEISTMANTEL, Impfstoffe und Sera, Leipzig 1903.
13) GENGOU, Ann. de l'Inst. Pasteur 1899.
14) GOTTSTEIN, Hygien. Rundschau 1906.
15) GRUBER und FUTAKI, Münchener med. Wochenschr. 1906 u. 1907. Deutsche med. Wochenschr. 1907. Centralbl. für Bakt., Ref., Beiheft 1906, Bd. XXXVIII.

16) Jäger, Monatsh. für prakt. Tierheilk. 1904, Bd. XV.
17) Lazzaretti, Ref. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXI.
18) Löhlein, Ann. de l'Inst. Pasteur 1905 u. 1906. Centralbl. für Bakt., Ref., Beiheft 1906, Bd. XXXVIII.
19) Marchoux, Ann. de l'Inst. Pasteur 1895.
20) Mendez, Centralbl. für Bakt. 1898, Bd. XXIV; 1899, Bd. XXVI; 1904, Bd. XXXVII. Anal. del circul. med. Argent. 1901.
21) Mendez und Lemos, Rev. de la soc. med. Argent. 1898.
22) de Nittis, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901.
23) Ottolenghi, Atti R. Accad. dei Fisiocritici; 1902, Ser. IV, Vol. 14. Ebendaselbst 1904 u. 1906.
24) Pettersson, Centralbl. für Bakt. 1903, Orig., Bd. XXXIII; 1905, Bd. XXXIX; 1907, Bd. XLV.
25) Pizzini, cit. nach Sclavo (1901).
26) Preisz, Centralbl. für Bakt. 1908, Orig., Bd. XLVI.
27) Raebiger, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1907.
28) Riegler, Arch. veterin. 1905, Vol. II, Nr. 7.
29) Rissling, Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLIV.
30) Sacharoff, Centralbl. für Bakt. 1904, Orig. Bd. XXXVII.
31) Sanfelice, Centralbl. für Bakt. 1902, Orig. Bd. XXXIII.
32) Sanna, Gazz. degli Osped. etc. 1898.
33) Sawtschenko, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897.
34) Schubert, Inaug.-Dissert., Giessen, 1903.
35) Sclavo, Centralbl. für Bakt. Bd. XVIII und Atti della Direz. di Sanità pubbl. Roma, 1895. Riv. d'igiene e sanit. pubbl. 1896 u. 1898. Centralbl. für Bakt. 1899, Bd. 26. Berl. klin. Wochenschr. 1901. Atti della R. accad. dei Fisiocritici 1903.
36) Sobernheim, Kolle-Wassermann, Handb. 1904, Bd. IV. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 26, 27 und 41. Zeitschr. für Infektionskr. usw. der Haustiere 1906, Bd. I. Berl. tierärztl. Wochenschr. 1906.
37) Stiennon, Compt. rend. soc. biol. 1907, Bd. LXII.
38) Wilms, Münchener med. Wochenschr. 1905.
39) Wright und Douglas, Proc. Royal Soc. 1904, Bd. LXXIII.

XXIII.

Schweinerotlaufserum.

Von

Dr. E. Joest,

o. Prof. an der Kgl. Tierärztl. Hochschule in Dresden.

Die Darstellung des Rotlaufserums.

1. Das Verfahren von EMMERICH.

Die Ersten, denen die Darstellung eines wirksamen Rotlaufserums gelang, waren EMMERICH und MASTBAUM[1]).

EMMERICH war mit seinen Mitarbeitern auf Grund seiner Versuche zu der Überzeugung gelangt, „daß im immunisierten Tierkörper die Rotlaufbazillen durch ein von den Körperzellen produziertes, im interzellulären Saftstrom kreisendes chemisches Gift vernichtet werden". War dies richtig, dann mußte (so folgerte EMMERICH) „der Gewebssaft immunisierter Tiere und vielleicht auch das Blut ein Heilmittel für den zum Ausbruch gekommenen Rotlauf sein. Es mußte also mit anderen Worten gelingen, den Rotlauf durch Injektion von Gewebssaft immunisierter Tiere zu heilen".

Zur Gewinnung ihrer „Heilflüssigkeit" benutzten EMMERICH und MASTBAUM Kaninchen. Diese wurden „mindestens einmal intravenös und hierauf zu wiederholten Malen subkutan, anfangs mit sehr kleinen, später mit sehr großen Mengen vollvirulenter Bouillonkulturen von Rotlaufbazillen geimpft". Der sterile Preßsaft sämtlicher Organe und das Blut der immunisierten, durch Erhängen getöteten Kaninchen bildeten die „Heilflüssigkeit", die im Eisschrank aufbewahrt wurde. (Ein Zusatz von Konservierungsmitteln wurde nicht vorgenommen.)

Aus den mit der „Heilflüssigkeit" angestellten Versuchen ging hervor, daß es gelingt,

1) „bei weißen Mäusen und Kaninchen jede Rotlaufinfektion ohne Ausnahme mit Sicherheit zu heilen, vorausgesetzt, daß die Rotlaufbazillen nicht länger als 24 Stunden im Organismus sich verbreitet haben",

2) weiße Mäuse und Kaninchen durch subkutane Injektionen der „Heilflüssigkeit" gegen die spätere Infektion mit Rotlaufbazillen immun zu machen, und daß die so übertragene Immunität mindestens 11 Tage, wahrscheinlich aber länger dauert.

Emmerich und Mastbaum erkannten auf Grund dieser Ergebnisse sofort die praktische Bedeutung des neuen Verfahrens. Sie schlossen aus der Tatsache, „daß die ‚Heilflüssigkeit' volle Wirksamkeit entfaltet, auch wenn sie nicht von Tieren der gleichen Art gewonnen ist (Wirksamkeit des Gewebssaftes immunisierter Kaninchen bei weißen Mäusen)", daß es gelingen müsse, den Gewebssaft immunisierter Kaninchen auch bei Schweinen zur Heilung des Rotlaufes und zur Schutzimpfung gegen diesen zu verwenden.

Auf Anregung von Lydtin nahm Emmerich in Verbindung mit Tsuboi[2]) nunmehr einen Schutzimpfungsversuch an Schweinen vor. Der dazu notwendige Impfstoff wurde durch Immunisierung eines Schweines gewonnen. Hierbei verfuhr Emmerich wie folgt:

Das Schwein erhielt 1 ccm einer um das 500fache verdünnten, virulenten Rotlaufkultur intraperitoneal (geringe Reaktion), 35 Tage später 1 ccm einer zu gleichen Teilen mit sterilisiertem Wasser verdünnten, virulenten Kultur, sodann nach 12 Tagen 4,5 ccm unverdünnter Bouillonkultur, nach weiteren 19 Tagen 25 ccm, weiter nach 20 Tagen 52 ccm, nach 14 Tagen 200 ccm, nach 29 Tagen 350 ccm, wieder nach 29 Tagen 750 ccm vollvirulenter Bouillonkultur des Rotlaufbazillus, und zwar alle Injektionen intraperitoneal (nach der letzten Einspritzung geringe Reaktion). Ferner erhielt das Schwein am 15. und 16. Tage nach der letzten intraperitonealen Injektion je 15 ccm Bouillonkultur und den Bodensatz von drei Bouillonkulturen (von je 100 ccm) subkutan, 9 Tage später endlich 250 ccm ganz frischer, vollvirulenter Bouillonkultur in die Bauchhöhle. 6 Tage später wurde das Schwein geschlachtet und lieferte $6^1/_2$ Liter Blut und 5 Liter Muskel- und Organsaft. (Letzterer wurde durch Auspressen bei hohem Druck erhalten.)

Um aus Blutserum und dem filtrierten Organsaft ein zu Impfzwecken in der Praxis zu verwendendes Dauerpräparat herzustellen, verfuhr Emmerich folgendermaßen:

Das steril entnommene Serum und der sterile Organpreßsaft wurden mit dem mehrfachen Volumen absoluten Alkohols versetzt; „das ausgefallene Eiweiß rasch auf sterilisierten Filtern abfiltriert, mit sterilisiertem Filtrierpapier resp. porösen Tellern ausgepreßt und mit Glyzerin zu einer syrupösen Masse zerrieben, welche in sterilisierte Reagenzgläser gefüllt und durch Wattepfropf und Kolophoniumkitt luft- und wasserdicht eingeschlossen wurde." Das derart als Dauerpräparat aufbewahrte Serumalbumin wurde zum Zwecke der Schutzimpfung in $0{,}07\,^0/_0$iger Natronlösung gelöst.

Nachdem Emmerich an Mäusen und Kaninchen festgestellt hatte, daß das Dauerpräparat „trotz viermonatlicher Aufbewahrung im Eisschrank seine volle Schutz- und Heilwirkung behalten" hatte, wurde es in subkutaner Injektion zu einem Schutzimpfungsversuch an Schweinen benutzt.

2. Das Verfahren von Lorenz.

Nach dem Erscheinen der Arbeiten von Behring und Kitasato über die immunisierende Wirkung des Blutserums gegen Tetanus und Diphtherie immunisierter Tiere im Jahre 1891 versuchte Lorenz, die Entdeckung der genannten Forscher auf den Schweinerotlauf anzuwenden. Lorenz[3–8]) arbeitete zuerst mit Kaninchen. Er stellte fest, daß sich im Blutserum dieser Tiere, „welche gegen Schweinerotlauf, Backsteinblattern oder Mäuseseptikämie immunisiert waren, einige Wochen lang

nach jeder Wiederimpfung mit Kulturen irgend eines der fraglichen Mikroorganismen eine gegen letztere schützende Wirkung bei nicht immunen Kaninchen und grauen Mäusen nachweisen ließ". Bei der Immunisierung der Kaninchen zum Zwecke der Gewinnung von Schutzserum verfuhr LORENZ[5]) folgendermaßen:

„Man injiziert den Kaninchen zunächst auf 1000 Gewichtsteile Körpergewicht 1 Gewichtsteil Heilserum, 2 Tage darauf 0,3 Rotlaufkultur und weitere 12—14 Tage später nochmals 0,3 oder auch etwas mehr Kultur. Diese Injektionen werden sämtlich subkutan ausgeführt." Etwa 10 Tage nach der letzten subkutanen Impfung sind die Kaninchen so immun, „daß sie von nun an intravenöse Kulturinjektionen, einerlei, ob dieselben früher oder später zur Ausführung kommen, gut vertragen und auch jedesmal nach denselben heilkräftiges Blutserum haben".

LORENZ immunisierte nahezu 100 Kaninchen in der angegebenen Weise, „ohne auch nur eines an Impfkrankheit zu verlieren". Zum Zwecke der Blutgewinnung wurden die Kaninchen geschlachtet. Das so gewonnene Serum wurde dann zur Immunisierung von Kaninchen und Schweinen verwandt.

Des weiteren benutzte LORENZ[8, 9]) dann Schweine zur Serumgewinnung. Dabei wurde in ähnlicher Weise verfahren wie bei der Behandlung der Kaninchen. Nach einer Injektion von Schutzserum erhielten die Schweine verschiedene Injektionen von Rotlaufkulturen in steigenden Dosen. Die Einspritzungen wurden dabei sämtlich subkutan vorgenommen. So wurde z. B. eine Gruppe Schweine folgendermaßen behandelt:

Die Tiere erhielten zunächst die für das betr. Körpergewicht festgesetzte Schutzserummenge (siehe unten), dann 5 Tage später je 1 ccm Rotlaufkultur, nach weiteren 12 Tagen 2,5 ccm Kultur, wieder nach 12 Tagen 10 oder 15 ccm Kultur, dann nach weiteren 12 Tagen 35 ccm und endlich 21 Tage später 60 ccm Kultur — alle Injektionen subkutan. Vier Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere geschlachtet.

Bei der Behandlung von Schweinen zum Zwecke der Schutzserumgewinnung machte LORENZ[9]) bald die Erfahrung, daß verschiedene Schweine bei gleicher Art der Behandlung ein sehr verschieden wirksames Blutserum liefern können, daß also beim Schwein individuelle Differenzen bestehen, die einen Einfluß auf die Produktion von Schutzstoffen und deren Abgabe an das Blut haben.

So stellte LORENZ in einem größeren Versuch mit 40 Schweinen fest, „daß bei einem Teil der Versuchsschweine wieder gleich nach der dritten Kulturinjektion die immunisierende Eigenschaft des Blutserums durch Probeentnahme festgestellt werden konnte, während bei einem anderen größeren Teil nach der dritten Kulturinjektion unwirksames oder auch schädlich wirkendes Blutserum vorhanden war. Bei den ersteren konnte schon nach der vierten oder fünften Kulturinjektion die Schlachtung vorgenommen und recht brauchbares Serumpräparat, auch nicht in zu kleiner Menge, hergestellt werden. Bei den Schweinen, welche schädlich wirkendes Blutserum enthielten, bedurfte es einer längeren Weiterbehandlung, um ein einigermaßen wirksames Serum zu erhalten."

Dabei betont LORENZ, daß „nicht die Menge der zuletzt injizierten Kultur für die Höhe der immunisierenden Wirksamkeit des dabei erhaltenen Blutserums maßgebend ist".

Da die Schweine sich derart individuell verschieden in bezug auf die Schutzstoffproduktion verhalten, so bedarf es, wie Lorenz hervorhebt, bei der Immunisierung einer Vorprüfung des Serums jeden Schweines nach der dritten Kulturinjektion durch Entnahme einer Blutprobe. Der Ausfall dieser Vorprüfung des Serums bestimmt dann den weiteren Gang der Immunisierung. Hier ist zu bemerken, daß bei der Behandlung größerer Gruppen von Schweinen die individuellen Schwankungen des Gehaltes des Blutserums an Schutzstoffen durch Mischung der Sera der Tiere ausgeglichen werden können.

Trotz aller Verbesserungen in der Vorbehandlung der Schweine vermochte Lorenz von diesen Tieren kein derart hochwertiges Serum zu gewinnen, daß er es unmittelbar zur Schutzimpfung hätte verwenden können. Es hätte das genuine Serum in zu großen Mengen injiziert werden müssen. Es war deshalb erforderlich, dieses in seinem Volumen unbeschadet seiner Wirksamkeit zu verkleinern. Ferner mußte das Serum zur Verwendung in der Praxis in geeigneter Weise konserviert werden. Beide Aufgaben versuchte Lorenz gleichzeitig zu lösen, derart, daß das Verfahren der Einengung gleichzeitig ein Dauerpräparat lieferte. Dies ist Lorenz auch in ausgezeichneter Weise gelungen. Das Präparationsverfahren, das von einzelnen Autoren irrtümlicherweise als das Wesentlichste an der von Lorenz ausgearbeiteten Schutzimpfungsmethode angesehen worden ist, ist patentiert (D. R.-P. Nr. 103588 [Klasse 45] mit Zusatz 133267 [Klasse 30h]).

Das Verfahren besteht nach dem Patent darin, „daß das Serum zunächst mit konzentrierter Chlorkalziumlösung versetzt und erst nach einigem Stehen mit Ammoniumsulfat in bekannter Weise fraktioniert gefällt wird, derart, daß in die erste Fällung nur die die nachherige Lösung des Antitoxins beeinträchtigenden Substanzen hineingehen, das Antitoxin aber erst bei weiterem Zusatz von Ammoniumsulfat gefällt wird". Das Auflösen des gewonnenen, auf Tontellern getrockneten, antitoxinhaltigen Niederschlages erfolgt „in einer in bestimmten Verhältnissen aus Wasser, Glyzerin, Natrium salicylicum, Natrium carbonicum und Karbolsäure zusammengesetzten Lösungsflüssigkeit".

Das derart gewonnene „Serumpräparat" stellt eine fast vollständig klare, bräunlich-gelbe Flüssigkeit von schwachem Karbolgeruch dar. Es ist bei gewöhnlicher Temperatur haltbar. „Nach längerem Stehen scheidet sich ein leichter Bodensatz und auf der Oberfläche eine feine, helle Schicht aus" (Lorenz). Zurzeit wird dieses „Serumpräparat" nicht mehr hergestellt.

3. Das neue Verfahren der Rotlaufserumdarstellung.

Man kann dabei kaum von dem Verfahren eines bestimmten Autors sprechen; denn die neue Methode wurde von verschiedenen Forschern (Leclainche[10, 11]), Voges und Schütz[12–14]) sowie Lorenz[15])) fast gleichzeitig und unabhängig voneinander entdeckt. Die literarische Priorität gebührt allerdings Leclainche, der am 6. Mai 1899 in der Société de Biologie zu Paris als erster das Verfahren publizierte*). Die Mitteilungen der anderen genannten Forscher erfolgte auf dem VII. Internationalen tierärztlichen Kongreß in Baden-Baden (August 1899).

*) Leclainche hatte vorher, und zwar seit 1897 (Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1897), bereits Rotlaufserum von Kaninchen und Schweinen gewonnen.

Lorenz hatte zum Zwecke der Serumdarstellung das Schwein deshalb gewählt, weil dieses Tier besonders empfänglich für die Rotlaufinfektion ist und deshalb nach den damaligen Anschauungen ein besonders wertvolles Serum versprach. Man hatte Anfang der 90er Jahre eben geglaubt, „daß der Wert von Immunblut eines Tieres von der Differenz zwischen seiner Empfänglichkeit und der später erzeugten Immunität abhänge“ (Lorenz [15]). Diese Anschauung erwies sich jedoch als irrig; denn als man Versuche mit der Rotlaufserumgewinnung bei anderen Tieren (Schaf, Pferd) machte, da zeigte es sich, daß diese Tiere bei geeigneter Vorbehandlung ein Serum lieferten, das dasjenige von immunisierten Schweinen an Wert um ein Vielfaches übertraf. Besonders geeignet erwies sich das Pferd. Dieses bietet nicht nur den Vorteil einer raschen und dabei für das Tier verhältnismäßig ungefährlichen Immunisierung, wobei sich, wie gesagt, ein Serum von hohem Titer erreichen läßt, sondern vermag auch längere Zeit hindurch große Quantitäten Blut zu liefern. Aus diesen Gründen wird seit dem Jahre 1899 das Rotlaufserum allgemein in erster Linie vom Pferde gewonnen*).

Dabei wird, wie es bei den Immunisierungen zum Zwecke der Serumgewinnung allgemein geschieht, so verfahren, daß die Tiere in bestimmten Zwischenräumen steigende Mengen Rotlaufkultur injiziert erhalten. Die Injektion der Kultur geschieht hier, wie auch bei anderen Immunisierungen mit lebenden Bakterien, intravenös. Die Injektion von kleinen Kulturmengen (etwa 5—50 ccm) bleibt so gut wie wirkungslos. Es ist die intravenöse Einverleibung großer Dosen von Kultur (etwa 100, 200, 300, 400, 500 ccm usw.) notwendig (Leclainché [16]), Prettner [17])). Derartig hohe Dosen können bei Pferden unbedenklich verabreicht werden, da dieses Tier so gut wie unempfänglich gegen Schweinerotlauf ist. Ganz unempfänglich (oder besser gesagt unempfindlich) freilich ist das Pferd gegenüber großen Mengen von Rotlaufbazillen jedoch nicht. Es reagiert auf jede Injektion mit Temperaturerhöhung, Abgeschlagenheit und anderen Erscheinungen, die aber nach 24 bis 48 Stunden gewöhnlich wieder verschwinden. Auch verursacht eine längere intravenöse Behandlung mit großen Dosen Rotlaufkultur nicht selten Abmagerung, Gelenk- und Sehnenscheidenentzündungen, sowie Endokarditis (Leclainche, Prettner). Leclainche [16]) spritzte große Kulturmengen, beginnend mit 50 oder 100 ccm, in steigenden Dosen in Zwischenräumen von 8—10 Tagen ein (100, 150, 200, 250, 300 ccm) und erreichte in etwa zwei Monaten ein sehr wirksames Serum. Auch Prettner [17]) verfuhr in dieser Weise, wie folgendes Behandlungsprotokoll eines Pferdes zeigt.

Das Pferd erhielt

am 20. April	100 ccm	Kultur
„ 28. „	200 ccm	„
„ 6. Mai	300 ccm	„
„ 16. „	200 ccm	„
„ 24. „	300 ccm	„
„ 1. Juni	400 ccm	„
„ 8. „	500 ccm	„
„ 15. „	500 ccm	„
„ 24. „	300 ccm	„
„ 30. „	300 ccm	„

Das Serum hatte dann einen Titer von 0,1 (Maus) erreicht.

Den hochimmunisierten Pferden werden in der üblichen Weise Blutentziehungen gemacht. Von Zeit zu Zeit verabfolgte neue Injek-

*) Über das Serum von Schreiber siehe weiter unten.

tionen großer Dosen von Rotlaufkultur erhalten den Titer des Serums auf der Höhe.

Prettner empfiehlt nach der letzten Kulturdosis zwei Blutentziehungen und im unmittelbaren Anschluß an die zweite Blutentziehung eine Neuinjektion von 300—400 ccm Kultur. Diese sofortige Injektion sollen die Tiere besser vertragen als nach einigen Tagen. Zudem wird durch dieses Verfahren Zeit gewonnen. Ein Pferd kann derart längere Zeit zur Rotlaufserumgewinnung benutzt werden. Zur Immunisierung dienen lebende Kulturen. Da der Rotlauferreger auf festen Nährböden wenig üppig wächst, so werden zur Behandlung der Serumpferde ausschließlich Flüssigkeitskulturen (Bouillonkulturen) benutzt.

Prettner legt Wert darauf, daß die zur Immunisierung verwendeten Kulturen nicht nur vollvirulent sind, sondern daß die bei den einzelnen Injektionen verwendeten Kulturen verschiedener Herkunft sind. Er verwendet also z. B. nicht fortwährend Bazillen von Mäusepassagen, sondern abwechselnd Bazillen von Mäuse-, Tauben- und Schweinepassagen zu den Injektionen. Die Reaktion soll dadurch größer und die Schutzstoffbildung stärker werden.

Wie das Schwein, so zeigt auch das Pferd individuelle Unterschiede hinsichtlich seiner Geeignetheit zur Darstellung eines hochwertigen Rotlaufserums. Während bei einzelnen Pferden verhältnismäßig schnell ein hoher Titer des Serums erreicht wird, erfordert dies bei anderen Pferden längere Zeit und häufigere Injektionen. Manche Pferde bleiben in bezug auf den Wert ihres Serums trotz aller Behandlung dauernd hinter den besseren Pferden zurück. Nach Prettner läßt sich beim Pferd ein Serumtiter von 0,03 (Maus) erreichen.

Da das von Pferden gewonnene Rotlaufserum im allgemeinen sehr hochwertig ist, so ist selbstverständlich eine Einengung nicht notwendig, es kann sogar das hochwertigere Serum mit minderwertigem verdünnt werden. Um das Serum in der Praxis verwenden zu können, ist nur notwendig, es haltbar zu machen. Das geschieht wohl allgemein im Wesentlichen unter Zusatz von Karbolsäure*) und zwar so, daß das Serum davon 0,5 % enthält. Einzelne Fabrikationsstätten scheinen außerdem noch geringe andere Zusätze zu machen. Durch den Zusatz von 0,5 % Karbolsäure wird, sofern das Serum unter aseptischen Kautelen entnommen wurde, seine dauernde Keimfreiheit und Haltbarkeit gewährleistet**).

Das in der Praxis zur Verwendung gelangende derart gewonnene Rotlaufserum besitzt somit alle Eigenschaften des genuinen Pferdeserums. Es weist einen schwachen Karbolgeruch auf.

Nach dem vorstehend skizzierten Verfahren (das in den einzelnen Instituten mit diesen oder jenen nicht näher bekannten Modifikationen

---

*) Prettner[24]) hat Versuche auch mit anderen Serumkonservierungsmitteln gemacht, und zwar mit Chinosol und mit Diaptherin. Ersteres erwies sich seiner geringen bakteriziden Fähigkeiten wegen als ungeeignet. Das Diaptherin jedoch zeigte sich als ein vorzügliches Konservierungsmittel für Immunsera, das selbst der Karbolsäure überlegen erschien; denn „es fällt um die Hälfte weniger Eiweiß als Karbolsäure, und zwar trotzdem es im Vergleich zu Karbolsäure (0,5 : 10 ccm) in stark konzentrierter Lösung (0,1 : 0,5 ccm) zugesetzt wurde“, und seine bakteriziden Eigenschaften sind gut, während seine Giftigkeit derjenigen der Karbolsäure etwa gleich ist. Prettner benutzte das Diaptherin deshalb zur Konservierung des Rotlaufserums im Großen mit bestem Erfolg.

**) Das derart gewonnene und konservierte Rotlaufserum behält, an einem kühlen (aber frostfreien) und dunkeln Orte aufbewahrt, 1—2 Jahre seine Wirksamkeit.

zur Anwendung gelangt) wird zur Zeit Rotlaufserum in zahlreichen Laboratorien gewonnen, so z. B. in Darmstadt von LORENZ, im Tierärztlichen Laboratorium des Landesmedizinalkollegiums in Stuttgart, in der Rotlaufimpfanstalt der Brandenburgischen Landwirtschaftskammer in Prenzlau, in den Farbwerken in Höchst a. M. („Susserin"), in Toulouse von LECLAINCHE, im Berner Serum- und Impfinstitut, im Institut JENNER-PASTEUR in Budapest.

4. Rotlaufserum vom Rind.

Wie KITT[18]), SCHUBERT unter Leitung von SCHREIBER[19]) und PRETTNER[16]) gezeigt haben, läßt sich das Rind ebensogut wie das Pferd zur Rotlaufserumdarstellung verwenden. Die Immunisierung geschieht hier am besten ebenfalls intravenös. PRETTNER immunisierte Rinder auch durch intraperitoneale Injektionen sowohl von Rotlaufkultur als auch von Organsaft an Rotlauf eingegangener Tiere. Intravenöse Injektionen bedingen bei älteren Rindern leicht Endokarditis. PRETTNER benutzte zur Serumgewinnung auch den Büffel. Dieses Tier erwies sich ziemlich resistent und lieferte, wie das Hausrind, ein Serum vom Titer 0,1 (Maus). PRETTNER[17]) hält auf Grund seiner Versuche das Rinderserum zur Behandlung von Schweinen für geeigneter als das Pferdeserum. Es wird nicht so schnell aus dem Schweinekörper ausgeschieden als das Pferdeserum.

Anhangsweise sei noch bemerkt, daß PRETTNER[17]) auch durch Immunisierung von Hunden ein Serum vom Titer 0,1 (Maus) erhielt.

5. „Rotlaufdoppelserum".

Bekanntlich vollzieht sich die Vernichtung eines in den Tierkörper eingedrungenen Krankheitserregers bei passiver Immunität des Organismus gegen diesen Erreger nach EHRLICH in der Weise, daß Immunkörper (Ambozeptor) und Komplement zusammenwirken. Der Ambozeptor wurde dem betreffenden Tier injiziert, das Komplement zur Aktivierung des Ambozeptors muß der Tierkörper selbst liefern. Findet der Ambozeptor nicht die nötige Menge von Komplement vor, so bleibt er zum Teil unwirksam. Nach EHRLICH ist das Komplement des normalen Blutes kein einheitlicher Körper, sondern die vorhandene Komplementmenge setzt sich aus zahlreichen verschiedenen Einzelkomplementen zusammen. SCHREIBER und SCHUBERT[18]) suchten, gestützt auf die Lehre EHRLICHS, das Rotlaufserum in der Weise zu verbessern, daß sie, entsprechend der Vielheit der Komplemente im Tierkörper, auch ein Serum mit einer Vielheit von Ambozeptoren verwandten, indem sie dabei voraussetzten, daß dann mehrere Komplementarten zur Aktivierung herangezogen werden könnten. Sie mischten Immunsera von verschiedenen Tieren und beobachteten, daß ein passendes Serumgemisch bei Versuchstieren besser wirkte als ein nur von einer Tierart gewonnenes Serum. Am geeignetsten erwies sich beim Schweinerotlauf eine Mischung von Pferde- und Rinderimmunserum. Seit dieser Feststellung wird vom Landsberger Seruminstitut (unter der Leitung SCHREIBERS) nur noch derart gemischtes Serum abgegeben. SCHUBERT nannte dieses in seiner ersten Publikation „polyvalentes" Serum. Später erhielt es den Namen „Doppelserum".

PRETTNER[16]), der die Versuche von SCHREIBER und SCHUBERT nachprüfte, nimmt auf Grund seiner Experimente entgegen diesen Autoren an, „daß durch die Mischung der Sera von zwei verschiedenen Tieren der Wert des Rotlaufserums nicht gesteigert wird".

Es liegt auf der Hand, daß eine etwaige Überlegenheit des „Doppelserums“ lediglich bei Heilimpfungen und höchstens noch bei Notimpfungen in Betracht kommen könnte. Eine solche Überlegenheit scheint mir aber aus den Impfstatistiken nicht hervorzugehen.

Die Prüfung der Rotlaufsera.

Für die Wertbemessung des Rotlaufserums, die selbstverständlich nur an Versuchstieren geschehen kann, kommen mehrere Wege in Betracht: 1. Man kann die Heilwirkung des Serums als Maßstab nehmen, indem man die Serummenge bestimmt, die genügt, um das vorher infizierte Versuchstier zu heilen oder dessen Erkrankung zu verhüten. 2. Man kann Serum und Kultur gleichzeitig (getrennt oder gemischt) verabreichen. 3. Man kann das Versuchstier zuerst mit Serum passiv immunisieren und durch nachträgliche Kulturinjektion die Immunität prüfen. Die höchsten Anforderungen an die Leistungsfähigkeit des Serums stellt unzweifelhaft die erstangeführte Methode. Da das Rotlaufserum in der Praxis aber in erster Linie nicht zur Heilimpfung, sondern zur Schutzimpfung mit gleichzeitiger oder nachfolgender Kulturinjektion angewandt wird, so kommt die Prüfung der Heilwirkung weniger in Betracht. Der praktischen Verwendung des Serums entsprechend, werden deshalb zu seiner Prüfung die zweite und dritte Methode verwendet, die von verschiedenen Forschern mit verschiedenen Modifikationen und bei verschiedenen Versuchstieren angewandt worden sind.

Von Versuchstieren kommen in Betracht die Maus, die Taube, das Kaninchen und das Schwein. Die Verwendung des Schweines verbietet sich von vornherein wegen der hohen Kosten, die die Serumprüfung auf diesem Wege verursachen würde. Das Schwein wird daher nur ausnahmsweise zur Wertbestimmung des Serums gebraucht. Das Kaninchen ist zwar sehr empfänglich für Rotlauf und ohne größere Kosten zu beschaffen, es besitzt aber nach Leclainche[16]) den Nachteil, daß die Impfkrankheit bei ihm häufig chronisch verläuft und oft erst in einigen Wochen zum Tode führt. Es bleiben als geeignetste Versuchstiere für die Serumprüfung somit die Maus und die Taube.

1. Das Prüfungsverfahren von Lorenz.

Nach Lorenz[9]) ist das beste Versuchstier zur Prüfung des Rotlaufserums die graue Hausmaus. Diese besitzt eine ziemlich gleichmäßige Empfänglichkeit für die Rotlaufinfektion, was nach ihm bei den in der Gefangenschaft gezüchteten weißen Mäusen nicht der Fall ist. Lorenz benutzt als Maßstab für den Wert des Serums eine Rotlaufkultur mit konstanter Virulenz, von der stets die gleiche Menge eingespritzt wird. Die Injektion von Kultur und Serum geschieht gleichzeitig, aber örtlich getrennt, und zwar subkutan.

Als geeignetstes Infektionsmaterial betrachtet Lorenz aus Fällen von Backsteinblattern (Rotlaufurtikaria) gezüchtete Rotlaufbakterien, die aus einer älteren Gelatinestichkultur in Bouillon (ohne Peptonzusatz) übertragen werden und bei Zimmertemperatur und abgeschwächtem Tageslicht 5—10 Tage wachsen müssen.

Im Speziellen gestaltet sich das Prüfungsverfahren wie folgt: Die Mäuse erhalten 0,01 g Kultur subkutan in der Gegend der Schwanzwurzel. Gleich nach der Infektion wird eine verschiedene, genau abgewogene Menge

Serum, ebenfalls subkutan, unter die Rückenhaut gespritzt. Neben einer Kontrollmaus werden gewöhnlich drei etwa 15 g wiegende Mäuse, die 0,005, 0,01 und 0,015 g Serum erhalten, verwendet. Bei der Kontrollmaus und bei mit gar nicht oder ganz schwach wirkendem Serum geimpften Mäusen beginnen die ersten Zeichen der Impfkrankheit nach eineinhalb bis zwei Tagen, am dritten Tage erscheinen die Tiere deutlich im Hinterteil gelähmt und erliegen der Infektion zwischen dem dritten und vierten Tage. War die Serumdosis nur wenig geringer als notwendig gewesen wäre, um die Maus gänzlich zu schützen, so zeigt dieselbe nach 3—4 Tagen geringere Munterkeit. Manche derart erkrankten Tiere erholen sich wieder, andere gehen unter allmählicher Steigerung der Krankheitserscheinungen nach 8—14 Tagen ein. Die mit Serum von ausreichendem Wert in geeigneter Dosis geimpften Mäuse bleiben dauernd munter.

Als ausreichend wirksam betrachtet Lorenz ein Rotlaufserum, wenn es in der Menge von 0,01 g auf 10 g Mäusegewicht eine Maus gegen eine Infektion mit 0,01 g Rotlaufkultur zu schützen vermag. Da Lorenz in der Norm etwa 15 g schwere Mäuse verwendet, so muß bei diesen eine Injektion von 0,015 g Serum genügen, um sie zu schützen — mit anderen Worten: Lorenz verlangt von seinem Serum einen Titer von 0,015. Dieser Titer wird auch heute noch als ausreichend für die Praxis angesehen.

2. Das Prüfungsverfahren von Marx.

Da bei der Anwendung des Lorenzschen Prüfungsverfahrens Unregelmäßigkeiten vorkommen, so versuchte Marx[20]), dem im Kgl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. die Ausführung der staatlichen Prüfung der Rotlaufsera oblag, die Prüfungsmethode zu verbessern. Nach Marx ist anzunehmen, daß „der Organismus der Maus das für die Aktivierung des Rotlaufserums notwendige Komplement nur in außerordentlich geringen Mengen normal enthält und es nur äußerst langsam abgeben wird“. „Wenn man eine bestimmte Menge Immunserum, mit Kulturen gemischt, gibt, so dauert es viele Stunden, ehe der Immunkörper in die zur Tötung der Rotlaufbazillen nötige aktive Form übergeführt ist. In dieser Zeit haben aber die Bakterien Gelegenheit gefunden, sich zu vermehren, und zwar in einer bei den einzelnen Tieren nicht gleichen Weise.“ In diesem Punkt erblickt Marx die Ursache der prüfungstechnischen Unsicherheit. Um dem genannten Übelstande abzuhelfen, spritzt Marx die Rotlaufbakterien erst dann ein, wenn der ganze Immunkörper aktiviert ist. Ferner führt er die Bakterien der Maus so zu, „daß sie der Wirkung des Immunkörpers sofort unterliegen und eine Wucherung ausgeschlossen wird“.

Es besteht dementsprechend die Marxsche Methode darin, „daß grauen Mäusen das zu prüfende Serum erst subkutan, um dieselben zu immunisieren, appliziert wird, und dann nach 24 Stunden die Impfung mit Kultur intraperitoneal erfolgt“.

Es war aber aus der Prüfung noch eine Fehlerquelle, die durch die nicht absolut konstante Kultur gegeben war, auszuschalten. Zu dem Zweck stellte sich Marx ein in seinen Eigenschaften genau bekanntes Rotlauftrockenserum (ein sogenanntes Standardserum) her, das in Ehrlichsche Vakuumtrockenröhren eingeschlossen wurde und mit dem bei jeder Prüfung zur Kontrolle der Kultur und des Prüfungsversuches überhaupt

eine Kontrollprüfungsreihe angestellt wurde. Das Standardserum stellte in der Menge von 0,002 g eine die Mäuse gegen 0,01 ccm 48 stündiger Rotlaufkultur sicher schützende Dosis dar. Wenn man den Wert des Standardserums konventionell mit 1000 Immunisierungseinheiten annimmt, so bildeten zwei Immunisierungseinheiten die sicher schützende Dosis für Mäuse.

Im Speziellen gestaltet sich die Prüfung folgendermaßen:

Es wird, wie gesagt, in zwei Reihen von Mäusen, der „Standardreihe" und der „Prüfungsreihe" geprüft. In jeder Reihe werden sechs Mäuse und außerdem zwei Kontrollmäuse verwandt. „In der Standardreihe erhalten je zwei Mäuse 0,001, 0,002 und 0,003 g Serum (1,2 und 3 I.-E.), in der Prüfungsreihe werden die entsprechenden, nach der Wertangabe der Fabrik berechneten Dosen gegeben. Der Mindestwert eines flüssigen Serums ist auf 100 I.-E. festgesetzt, und werden demgemäß von einem solchen 100 fachen Serum, welches das gewöhnliche ist, 0,01, 0,02 und 0,03 ccm zur Prüfung verwandt. Ist der Versuch in Ordnung, so sterben die Kontrollmäuse innerhalb dreimal 24 Stunden. Die beiden Sera müssen einen parallelen Verlauf der Reihen zeigen, und zwar derart, daß die Tiere mit 1 I.-E. mit einer Verzögerung von 1—3 Tagen erkranken, während die Tiere mit 2 und 3 I.-E. nicht erliegen dürfen . . . . Die Prüfung wird am achten Tage nach der Kultureinspritzung abgeschlossen, nimmt demnach 10 Tage in Anspruch."

Mit diesem Verfahren wurden im Kgl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. und auch in den Höchster Farbwerken sehr gute Ergebnisse erzielt. Zur staatlichen Prüfung der Rotlaufsera in Preußen dient deshalb ausschließlich diese Methode.

Die größere Gleichmäßigkeit der Prüfungsreihen bei der Marxschen Methode gegenüber dem Verfahren gleichzeitiger Einverleibung von Serum und Kultur scheint mir nicht lediglich an der vollständigen Aktivierung des eingespritzten Rotlaufserums zu liegen. Es spielt bei der 24 Stunden vor der Infektion erfolgenden Einverleibung des Serums auch noch eine nichtspezifische Resistenzsteigerung durch letzteres eine Rolle. Es ist ja bekannt, daß man schon mit normalem Serum, sofern es genügend lange Zeit vor der Infektion in den Körper des betreffenden Versuchstieres hineingebracht wird, eine nicht unbeträchtliche Steigerung der Widerstandsfähigkeit des letzteren herbeiführen kann. Prettner[17]) hat, veranlaßt durch einen Hinweis auf diese Tatsache in einer meiner früheren Arbeiten, dies auch für die Rotlaufinfektion an Mäusen zu erweisen vermocht. Er konstatierte, daß bei der Marxschen Versuchsanordnung normales Serum den Tod der Mäuse verzögerte. — Dieser resistenzerhöhenden Wirkung der 24 Stunden vor der Infektion erfolgenden Serumeinverleibung dürfte deshalb hinsichtlich des regelmäßigen Ausfalles der Marxschen Prüfungsreihen eine gewisse Bedeutung zukommen.

3. Das Prüfungsverfahren von Leclainche.

Leclainche[16]) verwendet als Prüfungstiere Tauben, denen er eine Serumkulturmischung intramuskulär injiziert. Er gibt über sein Prüfungsverfahren folgendes an:

„L'essai des propriétés immunisantes du sérum est pratiqué par l'inoculation dans les muscles pectoraux du pigeon, d'un mélange avec une quantité fixe de culture virulente. La détermination de la dose minima mortelle constitue, en l'espèce, une nouvelle source d'incertitude. Il est

préférable de rechercher la dose de sérum nécessaire pour empêcher les effets de l'inoculation d'une dose massive constante de culture. Le pigeon reçoit 1 cc. d'une culture d'un virus de passage, mélangé avec des quantités variables de sérum. Le procédé est certainement moins élégant que la prétendue détermination d'un »coefficient d'immunisation«; mais il constitue une méthode de contrôle pratique, facilement utilisable et aussi précise qu'on peut l'exiger.

Le sérum que nous obtenons avec le cheval immunise, dans les conditions indiquées, à la dose de $^1/_2$ cc., contre 1 cc. d'un virus dont la culture, âgée de deux à trois jours, tue régulièrement les pigeons témoins en soixante à soixante-douze heures."

Deutsch[21]) hat die Methode von Leclainche etwas modifiziert. Er verfährt folgendermaßen:

„Vorerst werden abgestufte Mengen des seiner Komplemente durch mehrtägiges Stehenlassen oder durch Erhitzen auf 56° beraubten Serums mit je $^1/_2$ ccm einer hochvirulenten, alle 4 Wochen den Taubenkörper passierenden, 36stündigen Schweinerotlaufkultur gemengt. Diese Gemenge werden behufs möglichster Absorbierung des Zwischenkörpers ca. 5 Minuten stehen gelassen und dann in den Brustmuskel von 300—400 g schweren Tauben injiziert. Die ohne Serum belassenen Kontrolltiere gehen in 2—$2^1/_2$ Tagen an Rotlaufbazillensepsis zugrunde; die Tiere, welche gleichzeitig Serum erhalten hatten, müssen am Leben bleiben, oder sie überleben die Kontrolltiere um 1—7 Tage." — Als Normalserum betrachtet Deutsch ein solches, „von dem 0,5 ccm eben zur Neutralisierung des genannten Virus hinreichen".

Anwendung des Rotlaufserums in der Praxis.

1. Heilimpfung.

Der Schweinerotlauf ist in seiner typischen Form eine Septikämie, die durch Milztumor, trübe Schwellung der parenchymatösen Organe (Myokard, Skelettmuskulatur, Leber, Nieren) sowie durch mehr oder weniger ausgesprochenen Gastroenteritis ausgezeichnet ist. Alle diese Veränderungen sind, da sie nicht mit schweren Zerstörungen der betreffenden Organe einhergehen, verhältnismäßig leicht reparabel. Dieser Umstand bildet eine wesentliche Voraussetzung für die vorzügliche Heilwirkung des Rotlaufserums bei an Rotlauf erkrankten Schweinen.

Die Heilimpfung wird in der Weise ausgeführt, daß das erkrankte Schwein Rotlaufserum subkutan eingespritzt erhält. Dabei wird in der Regel dasselbe Serum verwendet wie bei der Schutzimpfung, seltener ein Präparat von besonders hohem Titer („Heilserum"). Von dem gewöhnlichen Rotlaufserum muß indessen zu Heilzwecken eine höhere Dosis („Heildosis") eingespritzt werden als bei der Schutzimpfung. Die „Heildosis", ein Mehrfaches der „Schutzdosis", beträgt für Schweine bis zu 50 kg Gewicht etwa 10 ccm, für Schweine von 50—125 kg Gewicht 20 ccm und für solche über 125 kg 30 ccm (Vorschrift für den Gebrauch des „Susserins"). Die Injektion kann an einer beliebigen Körperstelle geschehen, jedoch wählt man der Bequemlichkeit und Sauberkeit wegen am besten die Gegend am Grunde der Ohrmuschel. Größere Serummengen verteilt man auf zwei Injektionsstellen oder spritzt sie in toto in der Nähe der Kniefalte ein. Die bei der Schutzimpfung notwendige Verabreichung von Rotlaufkultur fällt natürlich bei der Heilimpfung fort. Diese ist um so erfolgreicher, je frühzeitiger die erkrankten Tiere mit

Serum geimpft werden. Bei schwerkranken Schweinen, die bereits dem Tode nahe sind, hat die Heilbehandlung selbstverständlich weniger Aussicht auf Erfolg. In manchen Fällen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Seruminjektion nach etwa sechs Stunden zu wiederholen. Im allgemeinen lassen sich, wie aus den Impfstatistiken hervorgeht, etwa 80—85 % der an Rotlauf erkrankten Schweine durch die Serumbehandlung heilen.

2. Schutzimpfung.

I. Das Verfahren von Voges und Schütz.

Voges und Schütz[12]) hatten festgestellt, daß nicht nur rotlaufkranke, sondern auch nach Pasteur und Lorenz schutzgeimpfte Schweine Rotlaufbazillen mit dem Kot ausscheiden. Es erschien diesen Forschern[13]) deshalb die Anwendung dieser Schutzimpfungsverfahren bedenklich. Sie versuchten deshalb, einen Weg ausfindig zu machen, der es ermöglichte, ohne Anwendung eines aus Rotlaufbazillen bestehenden Impfstoffes den Rotlauf zu bekämpfen. Diesen Weg glaubten Voges und Schütz[13]) in folgendem Verfahren gefunden zu haben: Ist in einem Schweinebestande der Rotlauf ausgebrochen, so wird sofort eine gründliche Desinfektion des Stalles und der Stallgeräte, sowie eine Impfung sämtlicher Schweine mit Rotlaufserum (ohne Kultur!) vorgenommen. Die Desinfektion tötet die von den kranken Tieren bereits ausgeschiedenen, das Serum die in den Körper der Tiere aufgenommenen Rotlaufkeime. Nur auf die im Darme befindlichen Krankheitserreger vermag das Serum nicht zu wirken. Die Vernichtung dieser kann somit erst erfolgen, nachdem sie von den Tieren ausgeschieden worden sind. Es ist deshalb eine zweite Desinfektion notwendig, die 14 Tage nach der ersten erfolgen soll.

Bei diesem Verfahren handelt es sich somit lediglich um passive Immunisierung. Da die durch die Serumeinspritzung erzeugte passive Immunität von nur kurzer Dauer ist (sie beträgt etwa zwei bis fünf Wochen), so sind die nur mit Serum geimpften Schweine bald wieder empfänglich für Rotlauf. Wurden durch die Desinfektion nicht alle Rotlaufbazillen im Stalle vernichtet oder fand eine Neueinschleppung der Seuche statt, so war der betreffende Bestand von neuem gefährdet. Es hätte von neuem desinfiziert und geimpft werden müssen, ohne daß auch damit die Gefahr für die betreffende Rotlaufperiode gebannt gewesen wäre. Aus diesen Gründen eignete sich das Verfahren für die allgemeine Praxis nicht. Es ist auch bald wieder verlassen worden.

II. Die Serovaccination (Lorenzsches Verfahren).

Das Hauptverdienst, das Lorenz sich um die Rotlaufschutzimpfung erworben hat, beruht in der Einführung eines neuen Verfahrens der Schutzimpfung, das es ermöglicht, auf gefahrlose Art und Weise eine langdauernde aktive Immunität zu erreichen. Dieses Verfahren besteht in der Kombination von Immunserum- und Kulturimpfung, in der Serovaccination. Die Methode ist später verschiedentlich modifiziert worden, in ihrem Wesen ist sie jedoch die gleiche geblieben, stets handelt es es sich dabei um das zuerst von Lorenz angewandte Prinzip*).

---

*) Dieses Lorenzsche Prinzip hat später mit Erfolg auch bei der Bekämpfung anderer Seuchen (ich erinnere nur an die Rinderpest, die Maul- und Klauenseuche) Verwendung gefunden. Lorenz hat sich somit nicht nur um die Rotlaufschutzimpfung, sondern um die Schutzimpfung überhaupt durch die Einführung der Serovaccination ein großes Verdienst erworben.

Die Serovaccination wird in drei Formen angewandt:

a) Serum und Kultur werden zeitlich getrennt injiziert (zweizeitige Impfung).

b) Serum und Kultur werden gleichzeitig, aber an verschiedenen Impfstellen injiziert (Simultanmethode).

c) Serum und Kultur werden gleichzeitig gemischt injiziert (Modifikation von Leclainche).

a) Serovaccination mit zweizeitiger Impfung.

Die Serovaccination mit zeitlich getrennter Serum- und Kultureinspritzung stellt das ursprüngliche Lorenzsche Verfahren dar. Dabei wird so vorgegangen, daß zuerst das Serum und drei bis fünf Tage später Rotlaufkultur injiziert wird.

Injektion des Serums. Von dem auf die oben angegebene Weise dargestellten und geprüften Rotlaufserum wird die „Schutzdosis" injiziert. Diese ist nach Lorenz so zu bemessen, daß auf je 10 kg Körpergewicht etwa 1 ccm Serum verabreicht wird. „Für kleinere, unter 25 kg schwere Schweine empfiehlt sich eine etwas stärkere Dosis, so daß auf Ferkel bis zu 8 kg immer 1 ccm und dann für jedes weitere Kilogramm etwa 0,1 ccm mehr zu nehmen ist. Bei Schweinen über 35 kg kann die Dosis in ähnlicher Weise etwas vermindert werden" (Gebrauchsanweisung für das Prenzlauer Serum). In der Gebrauchsanweisung für das „Susserin" wird die Schutzdosis des Serums wie folgt angegeben:

Schweine bis 25 kg Gewicht erhalten	3 ccm
„ von 25— 50 kg Gewicht erhalten	5 ccm
„ „ 50— 75 kg „ „	8 ccm
„ „ 75—100 kg „ „	10 ccm
„ über 100 kg „ „	15 ccm

Die Injektion des Serums erfolgt subkutan an einer beliebigen Körperstelle. Jedoch wird zweckmäßig die Gegend am Grunde der Ohrmuschel gewählt. Selbstverständlich hat der Seruminjektion eine Reinigung und Desinfektion der Impfstelle voranzugehen. Die Einspritzung des Serums kann natürlich mit jeder beliebigen sterilisierten Spritze geschehen. Zweckmäßigerweise verwendet man bei der Ungebärdigkeit der Impflinge eine von Lorenz konstruierte Spritze (von 10 ccm Inhalt), bei der zwischen Spritzenrohr und Kanüle ein dickwandiger kurzer Gummischlauch eingeschaltet ist. Das Halten der Schweine während des Impfaktes kann in verschiedener Weise (mit und ohne besondere Instrumente) geschehen. Es würde zu weit führen, hierauf näher einzugehen.

Injektion der Kultur. 3—5 Tage nach der Serumeinverleibung wird, wie gesagt, die Kultureinspritzung vorgenommen, und zwar wird lebende Rotlaufbouillonkultur injiziert.

Lorenz[15]) gibt über die von ihm verwendete Kultur an, daß er sie aus der Milz eines Schweines, das an akutem Rotlauf zugrunde gegangen war, gezüchtet habe. Diese Kultur, die eine ziemliche Konstanz besaß, zeigte von vornherein eine verhältnismäßig geringe Virulenz für Mäuse (Tod in 6—7 Tagen). Sie wird zum Zwecke der Verwendung zur Schutzimpfung nach Lorenz in einfacher Nährbouillon (ohne Peptonzusatz) von schwach alkalischer Reaktion bei 24° bis 26° C gezüchtet. Der Prospekt für das „Susserin" besagt, daß die zur Impfung benutzten Kulturen „Mäuse noch in Verdünnungen von 1 : 1 Million mit Sicherheit in ca. 72 Stunden" töten. Das Institut Jenner-Pasteur in Budapest gibt in seinem Prospekt an, daß die zur Serovaccination benutzte Kultur „eine taubenvirulente Rotlaufkultur in Bouillon" sei.

Die zur Impfung dienenden Rotlaufkulturen werden zurzeit wohl von allen Fabrikationsstätten in zugeschmolzenen Glasröhrchen (mit engem Halse) abgegeben. Da sich die Rotlaufbazillen in älteren Flüssigkeitskulturen zum Teil am Boden des Kulturgefäßes festsetzen, so sind die Kulturen vor dem Gebrauch (und vor ihrer Öffnung) gut umzuschütteln. Die Kulturen müsssen möglichst frisch gebraucht werden. Kulturen, die über vier Wochen alt sind, dürfen keine Verwendung mehr finden.

Die Injektion der zur Impfung dienenden Rotlaufkultur geschieht mit besonderer, steriler Spritze unter den üblichen Kautelen ebenfalls subkutan, und zwar an einer anderen Körperstelle als der zur Seruminjektion benutzten (gewöhnlich wird das Serum an einem Ohr, die Kultur am andern Ohr eingespritzt). Die Menge der zu injizierenden Kultur beträgt 0,25—1 ccm, je nach dem Körpergewicht der Impflinge. Es ist nicht notwendig, bei der Bemessung der Kulturdosis besonders genau zu verfahren.

Die Injektion des Serums verleiht dem Impfling passive Immunität gegen Rotlauf, und zwar tritt der Impfschutz ein, sobald das eingespritzte Serum resorbiert ist, praktisch also fast unmittelbar nach der Impfung. Da die passive Immunität nur von kurzer Dauer ist, so ist mit ihrem Zustandekommen allein bezüglich einer praktisch wirksamen Schutzimpfung noch nicht viel erreicht; denn letztere verlangt einen langdauernden Impfschutz. Diesen vermag aber nur die aktive Immunisierung zu geben. Da aktive Immunität beim Rotlauf künstlich nur durch die Injektion lebender Rotlaufbazillen erzeugt werden kann, so muß die Serumimpfung mit der Kulturimpfung verbunden werden. Das wesentliche also bei der Lorenzschen Schutzimpfung hinsichtlich der Erzeugung einer langdauernden Immunität ist somit die Kultureinspritzung. Während die unmittelbare aktive Immunisierung (z. B. bei der Pasteurschen Methode) nicht immer ungefährlich ist, ist das Lorenzsche Verfahren gefahrlos; denn die aktive Immunisierung erfolgt, während der Impfling infolge der Serumeinverleibung passiv immun ist. Die Serumgabe dient also nur dazu, die aktive Immunisierung gefahrlos zu gestalten. Gleichzeitig aber hat das Verfahren den Vorteil des sofortigen Eintritts des Impfschutzes der unmittelbaren aktiven Immunisierung voraus.

Die durch die einmalige Kulturinjektion beim Lorenzschen Verfahren erzielte aktive Immunität dauert, wie die Erfahrung gelehrt hat, im allgemeinen etwa 5 Monate*). Es genügt dies bei solchen Schweinen,

---

*) Prettner[25]) hat die Tatsache, daß in manchen Fällen der nach Serum- und einmaliger Kulturimpfung entstehende Impfschutz von kürzerer Dauer ist, zum Ausgangspunkt näherer Untersuchungen gemacht. Er fand, daß die Virulenz der benutzten Rotlaufkultur in Bezug auf die Dauer der Immunität keine große Rolle spielt, daß vielmehr „der Grad und die Dauer der erlangten Resistenz von dem Verhältnis zwischen Serum- und Kulturmenge abhängt. Je weniger Serum gegeben wird, eine um so bessere aktive Immunität entsteht“. Die beste aktive Immunität entsteht, bei der unmittelbaren aktiven Immunisierung (ohne Serum), wie sie von Pasteur eingeführt wurde; denn hier lassen sich die die Immunität bedingenden Schutzstoffe schon nach der ersten Injektion von Vaccin nachweisen, und ihre Menge steigt nach der zweiten Vaccininjektion beträchtlich, während sich bei der Serovaccination zunächst gar keine und erst nach der zweiten Kulturinjektion (ohne Serum) erkennbare Mengen von Schutzstoffen im Blute der Impflinge auffinden ließen. „Es scheint somit das mitinjizierte Serum die Bakterien, wahrscheinlich durch Vermittlung des Organismus, so stark zu beeinflussen, daß sich eine nachweisbare Menge von Schutzstoffen nicht bilden kann, während bei alleiniger Impfung mit Kultur, wobei der Organismus, auf sich selbst angewiesen, sich gegen die Infektion wehren muß, Schutzstoffe entstehen.“ Prettner schließt, „daß die Resistenz des Organismus um so höher wird, je mehr ihm selbst die Abwehr der Infektion überlassen bleibt“.

die innerhalb dieses Zeitraumes zur Schlachtung gelangen. Bei Zuchttieren dagegen ist ein längerer Impfschutz erwünscht. Man erreicht ihn nach Lorenz dadurch, daß man den Impflingen 12—15 Tage nach der ersten Kulturgabe noch eine zweite von etwa doppelter Dosis verabfolgt. Durch diese zweimalige Vaccination wird, wie die Praxis bestätigt hat, die aktive Immunität auf etwa ein Jahr ausgedehnt. Wünscht man letztere noch weiter zu verlängern, so ist nur erforderlich, den Impfling vor Ablauf des Immunitätsjahres von neuem mit Rotlaufkultur (1—2 ccm) zu injizieren. Hierdurch wird der Impfschutz um ein weiteres Jahr verlängert.

Die vorstehend beschriebene zweizeitige (ursprüngliche) Lorenzsche Methode ist die sicherste Art der Serovaccination; denn die Kulturimpfung erfolgt erst nach vollständigem Eintritt der passiven Immunität. Sie hat in der Praxis aber den Nachteil der Umständlichkeit: Der Tierarzt muß mindestens zweimal kommen. Man hat deshalb im Allgemeinen die zweizeitige Serovaccination zugunsten des Simultan- und des Mischungsverfahrens verlassen. Nur da muß die zweizeitige Methode stets angewandt werden, wo es sich um Notimpfung handelt, wo also Bestände geimpft werden, in denen bereits der Rotlauf herrscht. Schreiber[22]) empfiehlt sogar die zweizeitige Serovaccination bei Impfungen in der seuchengefährlichen Zeit, im Sommer, allgemein anzuwenden. Diese Vorsicht ist deshalb angezeigt, weil bereits mit Rotlauf infizierte Schweine bei der Simultan- und der Mischungsmethode heftig an der Seuche erkranken können.

Es ist behauptet worden, die Lorenzsche Methode sei gefährlich, weil sie, wie das Pasteursche Verfahren, mit lebenden Rotlaufbazillen arbeitet. Das Vorhandensein dieser Gefahr müßte sich vor allen Dingen dadurch zu erkennen geben, daß ungeimpft gebliebene Schweine, die mit geimpften Tieren zusammen gehalten werden, an Rotlauf erkrankten. Die Praxis hat gelehrt, daß eine Ansteckung ungeimpfter Schweine durch geimpfte so gut wie gar nicht vorkommt. Deshalb ist beim Lorenzschen Verfahren auch eine Trennung der geimpften und der ungeimpften Tiere unnötig.

Nachteilig kann die Serovaccination beim Rotlauf in solchen Fällen wirken, in denen es sich um mit chronischer Schweineseuche oder Schweinepest infizierte Bestände handelt. Hier kann die gewöhnlich nicht erkennbare Reaktion, die der Kultureinspritzung folgt, die chronische oder latente Schweineseuche oder Schweinepest zum offenen, akuten Ausbruch bringen.

b) Die Simultanmethode.

Bei der Simultanmethode geschieht Serum- und Kulturinjektion gleichzeitig, aber an verschiedenen Impfstellen, subkutan. Man spritzt in der Regel das Serum am einen, die Kultur am andern Ohr ein. Serum und Kultur, Dosis und Technik der Impfung sind die gleichen wie bei der zweizeitigen Methode. Um die allgemeine Einführung der Simultanmethode, die zuerst von Lorenz angegeben wurde, hat sich Schreiber besonders verdient gemacht. Die Simultanmethode findet überall da Anwendung, wo es sich um Schutzimpfung gesunder Schweinebestände (um Präkautionsimpfung) handelt. Da die Schutzimpfung in dieser Form am häufigsten ist (sie geschieht in der Regel im Frühjahr), so findet die Simultanmethode eine ausgedehnte Anwendung. Bei bereits mit Rotlauf infizierten Beständen ist die Simultanimpfung, wie oben bereits erwähnt, zu vermeiden.

c) Die Serovaccination von Leclainche.

Leclainche[16, 23]) verfährt bei der Serovaccination in der Weise, daß Serum und Kultur gleichzeitig und gemischt injiziert werden.

Das von diesem Forscher verwendete Serum stammt von intravenös immunisierten Pferden. Es ist reines Serum, „sans addition de substances chimiques". Über die zur Impfung verwendete Kultur gibt Leclainche nichts näheres an. Es handelt sich um lebende Rotlaufkultur. Serum und Kultur werden getrennt versandt. Die Mischung geschieht erst im Augenblick der Injektion, und zwar in der Spritze. Die Dosis der Kultur ist für alle Tiere gleich, sie beträgt 0,5 ccm. Die Dosis des Serums variiert dagegen, entsprechend dem Gewicht der Impflinge. Schweine von weniger als 50 kg Gewicht erhalten 5 ccm, solche über 50 kg 10 ccm Serum. Die Injektion des Serumkulturgemisches erfolgt subkutan an der Innenfläche der Hinterschenkel unter den üblichen Kautelen. 12 Tage nach der Serovaccination erhalten die Impflinge eine zweite Injektion von Kultur (ohne Serum). Es wird dabei wiederum jedem Tier (ohne Rücksicht auf das Körpergewicht) 0,5 ccm Kultur subkutan eingespritzt.

Nach Leclainche sind die auf diese Weise geimpften Schweine länger als ein Jahr gegen Rotlauf immun. Die Serovaccination in der von Leclainche angegebenen Art und Weise darf, wie in der von diesem Forscher[23]) veröffentlichten Gebrauchsanweisung ausdrücklich betont wird, nur als Präkautionsimpfung angewandt werden. Bei an Rotlauf erkrankten oder infizierten Schweinen ist diese Form der Serovaccination gefährlich. Erkrankte Tiere erhalten nur Serum. Der Infektion verdächtige Tiere werden der zweizeitigen Impfung unterworfen. Hierbei spritzt Leclainche die Kultur 10 Tage nach der Serumdarreichung ein.

Literatur.

1) Emmerich, R. und Mastbaum, O., Archiv für Hygiene 1891.
2) Emmerich, R. und Tsuboi, Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1893.
3) Lorenz, Archiv für wissensch. und prakt. Tierheilk. 1892, Bd. XVIII.
4) Ders., Badische tierärztliche Mitteil. 1892.
5) Ders., Zentralbl. für Bakt. 1893, Bd. XIII.
6) Ders., Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1893.
7) Ders., Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1894.
8) Ders., Deutsche Zeitschr. für Tiermedizin 1894, Bd. XX.
9) Ders., Deutsche Zeitschr. für Tiermedizin 1895, Bd. XXI.
10) Leclainche, E., Comptes rendus de la Soc. de Biologie 1899.
11) Nocard, Verhandlungen des VII. Internat. tierärztl. Kongresses, Baden-Baden 1899.
12) Voges und Schütz, Archiv für wissensch. und prakt. Tierheilk. 1898, Bd. XXIV.
13) Dies., Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1899.
14) Schütz, Verhandlungen des VII. Internat. tierärztl. Kongresses, Baden-Baden 1899.
15) Lorenz, Verhandlungen des VII. Internat. tierärztl. Kongresses, Baden-Baden 1899.
16) Leclainche, E., Revue vétérinaire 1900, 25. Année.
17) Prettner, M., Das Rotlaufschutz- und -Heilserum. Tierärztl. Zentralblatt 1906, 29. Jahrgang. Auch separat Wien 1905.
18) Kitt, Th., Monatshefte für prakt. Tierheilkunde 1901, Bd. XII.
19) Schubert, B., Berliner tierärztl. Wochenschr. 1901.
20) Marx, Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1901.
21) Deutsch, L. und Feistmantel, C., Die Impfstoffe und Sera. Leipzig 1903.
22) Schreiber, Österreich. Monatsschr. für Tierheilkunde 1906, 31. Jahrg.
23) Leclainche, E., Recueil de méd. vét. 1900, Tome VII, 8. Sér.
24) Prettner, M., Zeitschr. f. Infektionskrankh. usw. der Haustiere 1907, Bd. II.
25) Ders., Zeitschr. f. Infektionskrankh. usw. der Haustiere 1907, Bd. II.

XXIV.

Geflügelcholeraserum.

Von

Prof. M. Casper

in Breslau.

Immunisierung durch Serum. Serumtherapie.

Die günstigen Erfolge, welche mit der Einführung der Serumtherapie namentlich bei der Diphtherie des Menschen erzielt wurden, legten den Gedanken nahe, das Prinzip derselben auch für die Bekämpfung der Tierkrankheiten nutzbar zu machen. Schon im Jahre 1892 stellte Kitt [18]) eine Reihe von Versuchen an, um zu ermitteln, ob das Blut bzw. der Fleischsaft von Hühnern, welche durch Vorbehandlung nach der Pasteurschen Methode und durch wiederholte Einspritzungen virulenter Kulturen einen hohen Grad von Immunität erlangt hatten, sich eignen zur Immunisierung anderer Tiere. Obwohl die Versuche ermutigend ausfielen, verfolgte Kitt dieselben vorerst nicht weiter, weil damals die Serumtherapie nur bei toxischen Krankheiten, nicht aber gegenüber den reinen Septikämien verheißungsvoll erschien.

Späterhin aber nahm Kitt zusammen mit Mayr diese Arbeiten von neuem auf und berichtete 1897 [20]), daß es möglich sei, durch Vorbehandlung mit lebenden Hühnercholerabakterien vom Pferde ein Serum zu gewinnen, welches empfänglichen Tieren (Kaninchen und Mäusen) mehr oder weniger Resistenz gegen Geflügelcholera verleiht und daß mit diesem Serum auch eine gewisse Widerstandsfähigkeit gegenüber der Schweineseuche erzielt werden könne. Bei diesen Versuchen, die auch auf Rinder, Schafe, Ziegen und Schweine ausgedehnt wurden, ließ sich ermitteln, daß die Hühnercholerabakterien bei intravenöser Injektion auch für Pferde pathogen sind und daß bei den anderen Tierarten außer lokalen Eiterungen auch schwere Allgemeinerkrankungen eintreten können. Immerhin vermochten Kitt und Mayr von Pferden, einem Kalbe und einem Schwein ein Serum zu gewinnen, welches Kaninchen und Mäuse gegen eine Infektion mit virulentem Blute schützte. In der Weiterführung der Versuche zeigte sich, daß mit Hilfe der Serumvorimpfung und wiederholter Einspritzung lebender Hühnercholerabakterien Kaninchen auch dauernde Immunität erwerben können [21]). Bei Hühnern

und Tauben waren dagegen mit demselben Serum nennenswerte Immunisierungserfolge damals nicht zu erzielen.

Inzwischen wurden von anderen Seiten Mitteilungen über die Herstellung eines Schutzserums gegen Geflügelcholera veröffentlicht, die hier chronologisch angeführt seien.

Schreiber-Landsberg[40]) brachte 1899 gelegentlich einer Mitteilung über ein gegen Schweineseuche und Schweinepest hergestelltes Serum die Notiz, daß das Serum von Tieren, die gegen Schweineseuche immunisiert seien, auch gegen Hühnercholera schütze und zwar schon in Dosen von 0,5 ccm. Angaben über die Art der Herstellung wurden dabei aber nicht gemacht. Später (1902) gab Schreiber über die Herstellungsweise des unter dem Namen „Septicidin“ in den Handel gebrachten Präparates an, daß es ein polyvalentes Serum sei, zu dessen Gewinnung bei verschiedenen Tierarten eine große Anzahl der verschiedensten hochvirulentesten Stämme des Bac. suisepticus, avisepticus und suipestifer verwendet werden.

Jess, der vorher vergeblich eine Schutzimpfung durch abgeschwächte Kulturen angestrebt hatte (Bd. I pag. 923), berichtet 1900 in einem Autorreferate[14]), daß er 1899 durch Vorbehandlung von Pferden und Schafen ein Serum gewonnen habe, welchem „eine erhebliche antitoxische Wirkung gegenüber der Geflügelcholera innewohne“, macht aber keine näheren Angaben. Ein Jahr später teilte derselbe Autor[15]) mit, daß er zusammen mit Piorkowski ein Serum gegen die Hühnercholera bereitet habe, welches „noch weit besser wirke als das frühere“, da es aber für sich allein nicht genüge, gebe er gleichzeitig oder vorher noch frisches gewöhnliches Pferdeblutserum, „um damit dem Körper der Hühner das fehlende Ehrlichsche Komplement zuzuführen.“

Sowohl das von Schreiber hergestellte Septicidin wie auch der Jess-Piorkowskische Impfstoff sind von anderen Seiten vielfach nachgeprüft und auch in der Praxis angewendet worden. Die Urteile sind recht geteilt. Einzelne Tierärzte, wie Schmidt[41]), Hartenstein, Schaller[39]), Klee[24]), Götting, Prasse[36]), Paulat[34]) haben in der Praxis mit Septicidin günstige Resultate erzielt; viele andere sahen keinen Erfolg davon. So spricht Raebiger[37]) dem Septicidin wie dem Jess-Piorkowskischen Impfstoff jeden praktischen Wert ab, ebenso Pauli[35]); auch die Versuche Willerdings[43]) mit beiden Serumarten waren vollkommen ergebnislos. Im allgemeinen haben beide Serumarten wenig Anklang gefunden, weil der durch die Impfung verursachte Aufwand von Geld und Mühe in keinem Verhältnis zu den erzielten Vorteilen steht. —

Niebel und Hoffmann[30]) gaben 1900 in einer kurzen Mitteilung bekannt, daß sie zuerst an Pferden experimentiert hätten, aber dieses Tier nicht recht geeignet fanden und daher die Versuchstiere „einer anderen Tierspezies zu entnehmen“ veranlaßt wurden; nähere Angaben werden nicht gemacht.

Weiterhin haben Braun und Klett[2]) in einer vorläufigen Mitteilung (1900) angezeigt, daß sie sich mit der Herstellung eines Mittels gegen die Schweineseuche und zugleich gegen die Hühnercholera beschäftigten; sie erwähnen nur, daß ihr Serum in der Menge von 0,01 bis 0,02 ccm Hühner gegen die tödliche Infektion schützt.

In einer eingehenden Studie über die Geflügelcholera und Hühnerpest bespricht Hertel[7]) 1902 die Immunisierungsversuche der anderen Autoren und seine eigenen. Er benutzte zu denselben Kaninchen,

Rinder und Esel, denen er erst abgetötete Kulturen und dann lebende Hühnercholerabakterien intravenös einspritzte. Das Rind reagierte durch hohe Temperatur, Abszesse und ging infolge der Behandlung zugrunde; der Esel lieferte ein sehr brauchbares Serum, welches in der Dosis von 0,5 ccm Tauben gegen das 10 000fache der tödlichen Dosis schützte und 6 Stämme der Geflügelcholerabakterien bis zu einer Verdünnung von 1 : 6000 agglutinierte. Aus äußeren Gründen konnten diese Versuche nicht fortgesetzt werden.

Lignières, der früher durch Abschwächung der Mischkulturen einen sogenannten polyvalenten Impfstoff (Vaccin) gegen die ganze Gruppe der Septicaemia haemorrhagica hergestellt hatte (Bd. I, pag. 924) publizierte 1902 zusammen mit Spitz [27]), daß sie nunmehr nach demselben Prinzip ein polyvalentes Serum gewinnen. Ein mit Hilfe einer einzelnen Varietät der bipolaren Bakterien hergestelltes Immunserum schütze in erster Linie und besonders gegen die Infektion mit derselben Varietät, doch sei dasselbe, wenn auch nur in geringem Grade, auch wirksam gegenüber den anderen Varietäten. Blutserum von Tieren, die mit Kulturen verschiedener Varietäten der bipolaren Bakterien hoch immunisiert sind, erweist sich gegen sämtliche zur Darstellung des Serums verwendeten Varietäten wirksam. Auf Grund dieser experimentellen Erfahrungen gingen Lignières und Spitz so vor, daß sie in der oben beschriebenen Weise die sechs Varietäten züchteten und von den erhaltenen Mischkulturen allmählich steigende Mengen (5—20 ccm) den Pferden anfangs subkutan, später intravenös injizierten. Das erhaltene Serum soll bis zu einem gewissen Grade auch Heilwert besitzen. — Ob dieses Serum in der Praxis gegenüber der Geflügelcholera Anwendung gefunden hat, ist aus der Literatur zu ermitteln.

Über den weiteren Gang seiner Versuche, ein wirksames Serum gegen Geflügelcholera zu erzielen, berichtete Kitt [23]) im Jahre 1904. Zwei Pferde erhielten in Zwischenzeiten von 4—8 Tagen ansteigend $^1/_2$—10 ccm, ein paarmal auch bis zu 17 ccm virulenter, 1—3 tägiger Bouillonkulturen und Agarkulturaufschwemmungen subkutan injiziert, reagierten dabei durch Fieber, Mattigkeit, Diarrhoe, Schwellungen und lieferten sehr bald ein Schutzstoffe enthaltendes Serum. Das Serum des Pferdes I war schon nach einmonatlicher Behandlung, in welcher es erst 14 $^1/_2$ ccm erhalten hatte, so wirksam, daß es Kaninchen in der Dosis von 1—2 ccm, Tauben, Enten und Hühner bei 5 ccm gegen eine die Kontrolltiere in 1—4 Tagen prompt tötende, nach 24 Stunden vorgenommene Kontrollimpfung schützte. Die so bewirkte Immunität kann nach 18 Tagen aber wieder erloschen sein. Bei Tauben vermochte die Impfung und Nachimpfung mit 5 ccm Serum nicht immer lebensrettend zu wirken, sie sind nur durch höherwertiges Serum zu immunisieren. Ihrer Empfindlichkeit wegen können die Tauben als der beste Gradmesser für die Güte des Serums gelten, während Hühner ungleich empfänglich und daher als Testobjekte nicht recht brauchbar sind. Nachimpfung mit lebenden virulenten Bakterien verlieh Tauben keine dauernde, aktive Immunität, während sie bei Gänsen, Enten und Hühnern eine nachhaltigere Wirkung hatte. Da jedoch einzelne Tiere hinterher unter den Symptomen protahierter Geflügelcholera eingingen, so empfiehlt sich für die Praxis, wo es sich hauptsächlich um Fütterungsinfektion handelt und wo rasche Prophylaxis erforderlich ist, die gefährdeten Tiere sofort mit Serum zu impfen, die gleichzeitige oder spätere Infektion mit lebendem Virus aber zu unterlassen. Das mit 0,5 $^0/_0$iger Karbolsäure versetzte

Serum bleibt Monate lang wirksam und kann wie andere Sera vorrätig gehalten werden. Als Impfstelle ist bei Hühnervögeln die Seitenbrustwand, bei Enten, Gänsen und Tauben nach Jess die verschiebliche Halshaut am Übergang zum Rücken zwischen den Schultern zu wählen.

Klett und Braun[25]) veröffentlichten das Ergebnis ihrer weiteren Untersuchungen im Dezember 1904. Es war ihnen durch geeignete Präparation der Geflügelcholerakulturen gelungen, ein Toxin herzustellen, das in beträchtlicher Menge nachweisbar war und nach subkutaner Übertragung bei Tauben und Hühnern die von Pasteur als typisch bezeichnete Schlafsucht und Trunkenheit hervorzurufen imstande war. Zur Herstellung eines wirksamen Serums bedarf man nur eines einzigen höchstvirulenten Erregers; das vermittels desselben gewonnene Serum wirkt gegen sämtliche Erreger jedweder Herkunft gleich gut; von einer Stammverschiedenheit des Bacillus avisepticus im Sinne Wassermann-Ostertags kann daher nicht die Rede sein.

Zur Immunisierung dienten Pferde, Hunde und Katzen, die mit 4 Tage alten höchstvirulenten Bazillenkulturen behandelt wurden; die Anfangsdosen betrugen bei Pferden 0,25 ccm, bei Hund und Katze 0,1 ccm. Die Pferde und Hunde zeigten sich anfangs sehr empfindlich, reagierten lokal und allgemein sehr stark und ertrugen höhere Dosen als 14—20 ccm nicht. Bei weiteren Versuchen und bei Anwendung des intravenösen Injektionsmodus gelang es aber, die Kulturmengen anstandslos zu erhöhen; die intravenöse Einspritzung erschien auch weiterhin als der geeignetste Modus zur Herstellung eines hochwirksamen Serums. Für die Prüfung des Serumwertes sind Hühner wegen der wechselnden Empfänglichkeit nicht geeignet, auch Tauben sind hierfür nicht brauchbar. Die Verfasser prüften daher das Serum an grauen Mäusen und konnten feststellen, daß der Titer des Serums 0,0015 bis 0,005 betrug.

Die Dauer der passiven Immunität erstreckte sich, wie das Kitt schon festgestellt hatte, auf ca. 3 Wochen, eine längere aktive Immunität konnte weder durch gleichzeitige Einverleibung virulenter Kulturen, noch auf andere Weise erreicht werden. Die Verfasser kommen daher zu demselben Ergebnis wie Kitt, indem sie zurzeit für die Bekämpfung der Geflügelcholera nur die rechtzeitige Anwendung des Serums neben den veterinärpolizeilichen Maßregeln empfehlen.

Die Frage, ob die Immunisierung mit experimentell erzeugten, spezifischen Exudaten (Aggressinen) bezüglich der Geflügelcholera praktisch brauchbare Resultate zeitigen wird, läßt sich einstweilen nicht beantworten. Die von Huntemüller[9]) und Titze[42]) in dieser Richtung angestellten Laboratoriumsversuche sind zwar positiv ausgefallen, lassen aber vorerst ein Urteil über die praktische Bedeutung nicht zu.

Literatur.

1) Bisanti, C., Vaccination contre le choléra des poules par les toxines. Rev. gén. de méd. vét. 1904, Tome IV, pag. 457.
2) Braun und Klett, Zur serumtherapeutischen Bekämpfung der Geflügelcholera. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1900, pag. 353.
3) Cagny, Choléra des volailles, vaccination préventive. Rec. de méd. vét, 1885, pag. 130.
4) Cornil, Observations histologiques sur les lésions etc. Arch. de physiol. 1882, Tome X, pag. 615.
5) Delfino, J. C., Immunisierung der Kaninchen gegen die Hühnercholera. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII, pag. 231. Originale.

6) Foa und Bonome, Über Schutzimpfungen. Zeitschr. für Hygiene 1889, Bd. V, pag. 415.
7) Hertel, Über Geflügelcholera und Hühnerpest. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 1903, Bd. XX, pag. 145.
8) Hess, Schutzimpfung gegen die Cholera der Hühner. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 1886, pag. 137.
9) Huntemüller, O., Immunisierung gegen Hühnercholera mit Aggressinen. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLII, pag. 170. Originale.
10) Hutyra-Marek, Spezielle Pathologie und Therapie, Bd. I.
11) Hüppe und Kitt, Österr. Monatsschrift für Tierheilkunde 1888, Bd. XIII.
12) Jensen, C. O., Über eine der Rinderseuche ähnliche Kälberkrankheit. Monatshefte für Tierheilkunde 1891, Bd. II, pag. 8.
13) Jess, Zur Technik der Schutzimpfung gegen Geflügelcholera. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1900, pag. 37.
14) Ders., Autorreferat, ibid. 1900, pag. 182.
15) Ders., Mitteilungen über Immunisierungsversuche, ibid. 1901, pag. 633.
16) Katz, Proceeding of the Linnean Society of New South Wales 1889, 26 June.
17) Kitt, Beiträge zur Kenntnis der Geflügelcholera und deren Schutzimpfung. Deutsche Zeitschr. für Tiermedizin 1888, Bd. XIII, pag. 1.
18) Ders., Eine neue Schutzimpfung gegen Geflügelpest. Monatshefte für Tierheilkunde 1893, Bd. IV, pag. 59.
19) Ders., Zur Kenntnis der Immunitätsverhältnisse bei der Geflügelpest. Ibid. 1894, Bd. V, pag. 198.
20) Kitt und Mayr, Über Resistenzerscheinungen und Serumwirkungen bei Geflügelcholera. Ibid. 1897, Bd. VIII, pag. 529.
21) Kitt, Festschrift für Bollinger. Beiträge zur pathol. Anatomie, Wiesbaden 1903.
22) Ders., Immunität bei Geflügelcholera. Handbuch der pathog. Mikroorganismen von Kolle-Wassermann 1904, Bd. IV, pag. 979.
23) Ders., Die Serumimpfung gegen Geflügelcholera. Monatshefte für Tierheilkunde 1905, Bd. XVI, pag. 1.
24) Klee, Die Bekämpfung der Geflügelcholera. Geflügelbörse 1900, Nr. 32.
25) Klett und Braun, Versuche zur Bekämpfung der Geflügelcholera. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1904, pag. 517.
26) Lignières, J. et M., La vaccination contre les pasteurelloses. Compt. rend. de l'Acad. des scienc. 1902, Tome CXXXIV, pag. 1169.
27) Lignières und Spitz, Revue vétérinaire 1902, pag. 610; 1903.
28) Löffler, Zur Immunitätsfrage. Mitteilungen des Kaiserl. Gesundheitsamtes 1881, Bd. I, pag. 135.
29) Mosler, Zur Beurteilung des Serums usw. Centralbl. für Bakt. 1903, I. Teil, Bd. XXXIII, pag. 230.
30) Niebel und Hoffmann, Immunisierungsversuch gegen Hühnercholera. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1900, pag. 318.
31) Pasteur, Sur les maladies virulentes et sur le choléra des poules. Compt. rend. de l'Acad. des scienc. 1880, pag. 239.
32) Ders., Sur le choléra des poules. Compt. rend. de l'Acad. des scienc. 1880, pag. 673.
33) Ders., De l'atténuation du virus du choléra des poules. Compt. rend. de l'Acad. des scienc. 1880, pag. 952.
34) Paulat, Jahresbericht der preußischen beamteten Tierärzte 1903, Bd. IV, pag. 136.
35) Pauli, Über Geflügelseuchen. Ref. Berliner tierärztliche Wochenschr. 1902, p. 606.
36) Prasse, Beitrag zur Serum-Impfung gegen Geflügelcholera. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1899. pag. 542.
37) Raebiger, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1903, pag. 639.
38) Salmon, Report of the commission of agricult 1881 and 1882 Washington.
39) Schaller, Bericht über das Veterinärwesen im Königreich Sachsen 1903, pag. 48. 48. Jahrg.
40) Schreiber, Neues über Serum-Impfungen. Berliner. tierärztl. Wochenschr. 1899, pag. 449.
41) Schmidt, Bekämpfung der Geflügelcholera durch Septicidin. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1903, pag. 421.
42) Titze, C., Beitrag zur Immunisierung gegen Geflügelcholera mit Aggressinen Zeitschr. für Infektionskrankh. der Haustiere 1906, Bd. I, pag. 422.
43) Willerding, Zur Serumtherapie bei Geflügelcholera. Deutsche tierärztliche Wochenschr. 1902, pag. 473.

XXV.

Schweineseucheserum.

Von

Geh. Med.-Rat Prof. A. Wassermann

in Berlin.

Passive Immunität gegenüber Schweineseuche.

Während, wie schon im Kapitel „Aktive Immunsera“ angegeben ist, es früher, so besonders von VOGES, in Abrede gestellt wurde, daß man überhaupt imstande sei, ein wirksames spezifisches Serum gegenüber den Schweineseucheerregern zu gewinnen, ist dies heute in zweifelsfreier Weise festgestellt.

Was die beste Methode angeht, so eignet sich auch hierfür, wenigstens zum Laboratoriumsgebrauch, zwecks Gewinnung kleinerer Mengen spezifischen Serums gegenüber den LÖFFLER-SCHÜTZschen ovoiden Schweineseucheerregern die in dem Abschnitt „Aktive Immunisierung“ bereits ausführlich geschilderte Methode mittels sterilisierter Exsudate nach BAIL oder mittels Bakterienextrakte nach WASSERMANN und CITRON. Hand in Hand mit der mittels dieser beiden Methoden erzielten aktiven Immunisierung geht das Auftreten eines spezifisch gegen Schweineseucheerreger schützenden Serum bei den Tieren einher. Im speziellen eignen sich für die Serumgewinnung im Kleinen am besten Kaninchen. Man gibt diesen Tieren in etwa 9—12 tägigen Intervallen vier Injektionen entweder von dem Schweineseucheexsudat nach BAIL oder von dem WASSERMANN-CITRONschen Schweineseuchebazillen-Extrakt. Das Serum entzieht man ungefähr 10—14 Tage nach der letzten Injektion und prüft seine Wirkung nun an Mäusen aus. Denn während Mäuse nur sehr schwierig aktiv gegen Schweineseuche zu immunisieren sind, gelingt die passive Immunisierung, sobald man nur über ein wirksames Serum verfügt, sehr prompt. Was die nötige Vorbehandlungsmenge für das serumliefernde Kaninchen angeht, so richtet sich diese, wie schon in dem Abschnitt „Aktive Immunisierung“ hervorgehoben wurde, nach der Stärke des verwendeten Exsudats bzw. Bakterienextraktes. Die durchschnittliche Dose beträgt 2—3 ccm. Will man möglichst hochwertiges Serum erzielen, so gibt man naturgemäß mehr Injektionen, eventuell unter Verwendung gesteigerter Dosen. Doch genügen, wie erwähnt, in der Regel 3—4 Injektionen, um ein für wissenschaftliche Versuche recht

brauchbares Serum zu erzielen. Ein Schweineseucheserum ist für experimentelle Zwecke im Laboratorium brauchbar, wenn es eine Maus in einer Menge von mindestens 0,1 ccm in sicherer Weise gegen die akut tödliche Dose einer hochvirulenten Schweineseuchekultur schützt. Für die Zwecke der landwirtschaftlichen Praxis ist ein Serum von mindestens 10fach höherem Titer, also 0,01 ccm, nötig. Am besten führt man die Prüfung in der Art aus, daß man zuerst die tödliche Dosis der zur Austitrierung des Serums bestimmten Schweineseuchekultur an Mäusen bestimmt. Man kann hierzu ebensowohl 24stündige Bouillon- als 24stündige Agarkulturen verwenden, indem man in letzterem Falle die Kulturmasse in steriler Bouillon, (aber nicht in physiologischer Kochsalzlösung), aufschwemmt. Hat man die subkutan letale Dosis der Schweineseuchekultur an Mäusen bestimmt, so arbeitet man nun am besten mit dem zehnfachen Multiplum dieser Dosis letalis minima. Das Serum wird in abgestuften Mengen, etwa 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 den Tieren 24 Stunden vorher intraperitoneal gegeben, nach dieser Zeit wird die vorher austitrierte 10fache tödliche Dose der lebenden Kultur subkutan den Mäusen verabreicht. Als Kontrolle können eventuell die entsprechenden Mengen normalen Kaninchenserums gegeben werden, doch halte ich diese Kontrolle für überflüssig, da ich gegenüber wirklich virulenten Schweineseuchekulturen einen Einfluß normaler Sera bei Mäusen niemals beobachtet habe. Niemals natürlich dürfen indessen die Kontrollen mit der einfach tödlichen Dose der verwendeten Kultur allein, sowie dem 10fachen Multiplum ohne Serum vergessen werden, um sicher zu sein, daß die Kultur am Tage des Versuchs auch wirklich die gewünschte Virulenz hat. Diese Kontrolle ist deshalb so wichtig, weil die Schweineseuchebazillen mitunter bei geringsten Verschiedenheiten des Agars oft von einem Tag zum anderen sehr starke Virulenzänderungen eingehen. Es empfiehlt sich ferner, für jede Serumdose nicht eine, sondern mehrere Mäuse zu benutzen. Denn es kommt sehr häufig gerade bei Schweineseuche vor, daß einzelne Mäuse unregelmäßig aus der Reihe heraus sterben, so daß unter Umständen eine geringere Dose des Serums im einzelnen Fall einmal besser schützt als eine höhere. Offenbar spielen die individuellen Verhältnisse dabei eine große Rolle. Besonders zu berücksichtigen ist ferner das Körpergewicht der Mäuse. Größere Mäuse sind viel widerstandsfähiger als kleinere. Es sollen deshalb alle Mäuse vorher, am besten auf einer Briefwage, gewogen werden und falls es nicht möglich ist, solche von ganz gleichem Gewicht zu erhalten, so wähle man wenigstens die stärksten als Kontrolle. Bleiben dann die schwächeren am Leben, so ist die Schutzwirkung des Serums umso sicherer bewiesen.

Auch von Meerschweinchen läßt sich durch die angegebene Immunisierungsmethode wirksames Serum gewinnen. Doch sind die Quantitäten, welche diese Tiere liefern, so gering, daß Kaninchen immer der Vorzug zu geben ist, auch schon deshalb, weil es bei letzteren Tieren sehr leicht gelingt, während der Behandlung aus der Ohrvene einige Kubikzentimeter Blut zu erhalten, so daß man auf diese Weise sich jederzeit leicht Gewißheit über die bereits erzielte Höhe des Serums und über die eventuelle Notwendigkeit weiterer oder gesteigerter Injektionen verschaffen kann. Dieser Vorteil der Kaninchen in Bezug auf die Schweineseuche-Serumgewinnung für Laboratoriumszwecke wird allerdings dadurch etwas paralysiert, daß gerade diese Tiere während der Immunisierungsperiode gegen Schweineseuche ungemein zu der Kaninchenstallseuche (eitriger Schnupfen

sowie eitrige Herzbeutel- und Brustfellentzündung) neigen. Aus diesem Grunde empfiehlt es sich, Kaninchen, die gegen Schweineseuche immunisiert werden sollen, nicht mit sehr vielen anderen Tieren in einem gemeinsamen, sondern möglichst getrennt in einem besonderen Raum zu halten. Das von Kaninchen gewonnene Schweineseucheserum übt seinen Schutz naturgemäß nicht nur an Mäusen, sondern auch an Kaninchen und Meerschweinchen aus, doch sind für Kaninchen entsprechend größere Mengen von Serum, etwa das 5—10fache wie für Mäuse zwecks Schutzerzielung nötig. Für Meerschweinchen, die ja von Haus aus eine weit geringere Empfindlichkeit als Kaninchen und Mäuse für Schweineseuche zeigen, genügt ungefähr dieselbe Dose Serum zum Schutze gegenüber der 10fach tödlichen Dose Schweineseuchebazillen wie für Mäuse.

Gewinnung des Schweineseucheserums im Großen für die Praxis.

Die Gewinnung eines in der Praxis brauchbaren und wirksamen Schweineseucheserums ist dadurch kompliziert, daß, wie die Untersuchungen von A. Wassermann und Ostertag[14]), sowie deren Schüler C. Bruck[15]) und Krautstrunk[16]) ergeben haben, bei den Schweineseucheerregern in ausgesprochenem Maße verschiedene Rassen, Spielarten, vorkommen, welche sich in ihrem biologischen Bau verschieden verhalten. Dies äußert sich darin, daß das Serum eines Tieres, das mit einem Stamm Schweineseuche gewonnen wurde, durchaus nicht gegen alle Stämme zweifelsfreier Schweineseuche zu schützen vermag. Allerdings ist dafür Voraussetzung, daß es sich um solche Stämme von Schweineseuche handelt, die frisch aus dem infizierten Schwein gezüchtet, keine Tierpassage und keine längere Reihe von Laboratoriumspassagen auf künstlichen Nährböden durchgemacht haben. Es ist dies ein Verhalten, das für eine Reihe anderer Bakterienarten, wie Streptokokken, Pneumokokken, ebenfalls nachgewiesen wurde. Infolgedessen ist man genötigt, für die Praxis ein polyvalentes bzw. multipartiales Serum zu gewinnen. Dies geschieht am besten in der Art, daß man Pferde, welche für die Gewinnung des Serums im Großen die geeignetste Tierart darstellen, intravenös mit verschiedenen Schweineseuchestämmen, deren immunisatorische Verschiedenheit vorher festgestellt wurde, vorbehandelt. Da es sich dabei um eine sehr große Anzahl von Stämmen handeln muß, so ist es gut, die Pferde in Gruppen einzuteilen und jedem Pferde etwa 4—5 verschiedene Stämme zu injizieren und dann das Serum der verschiedenen Pferde zu mischen. Die Auswahl der Stämme ist eine sehr langwierige und schwierige Arbeit und nur möglich in einem Institut, in welchem ein sehr großes Material von an Schweineseuche zugrunde gegangenen Schweinekadavern eingeliefert wird. Denn der einzige Weg, auf dem die richtige Auswahl der Stämme möglich ist, ist der, daß Mäuse mit Schweineseucheserum vorbehandelt und nun mit den verschiedensten Stämmen gegen dieses Serum geprüft werden und zwar stets mit der zehnfach tödlichen Dose, um von allen Virulenzunterschieden unabhängig zu sein. Diejenigen Stämme nun, gegen welche das Serum noch nicht schützt, müssen bei der weiteren Vorbehandlung der Pferde mit berücksichtigt werden. Nach diesen Prinzipien ist das polyvalente Schweineseucheserum von Wassermann und Ostertag, das in dem pharmazeutischen Institut von Ludwig Wilh. Gans in Frankfurt a. M.

im Großen hergestellt wird, gewonnen. Außerdem wird dortselbst eine Gruppe von Pferden noch mit keimfreien Bakterienextrakten vorbehandelt und auch das Serum dieser Gruppe von Pferden dem Gesamtserum zugemischt, um auf diese Weise auch Schutzstoffe gegenüber gelösten toxischen Substanzen der Schweineseuchebakterien zu erhalten. Die Erfolge, die mit diesem Serum erzielt wurden, sind sehr zufriedenstellende; nach einer großen Statistik der Impfungen im Jahre 1903[17]) sind von 3681 Ferkeln, die in 89 von der Seuche ergriffenen Beständen schutzgeimpft wurden, 84,7 % nach der Impfung von der Seuche verschont geblieben. Seitdem erscheinen jährlich in den amtlichen Mitteilungen über das Veterinärwesen in Preußen Berichte über die Wirksamkeit des polyvalenten Schweineseucheserums. Aus diesen ergibt sich, daß dasselbe, wie nicht anders zu erwarten ist, nur in denjenigen Fällen wirksam ist, wo es sich um reine, d. h. nicht mit Schweinepest komplizierte Seucheherde handelt. Dieses Serum wird in dem unter Leitung EHRLICHS stehenden Kgl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. ständig an Mäusen auf seinen Wirkungswert staatlich geprüft. — Es muß dabei, ehe es in den Verkehr zugelassen wird, nach der oben geschilderten Prüfungstechnik einen Mindesttiter von 0,01 ccm an Mäusen besitzen. — SCHREIBER[18]), sowie SCHUBERT[19]) suchen das Prinzip der Polyvalenz auf andere Weise in ihrem für die Praxis hergestellten Serum zu wahren, nämlich dadurch, daß sie verschiedene Tierarten mit einem und demselben durch Tierpassagen möglichst hochvirulent gemachten Schweineseuchestamm immunisieren und das Serum dieser verschiedenen Tierarten mischen. Doch haben Versuche von BRUCK[20]) sowie von BREIDERT[21]) ergeben, daß das SCHREIBERsche Serum in seiner Schutzbreite gegenüber verschiedenen Schweineseucheerregern hinter dem polyvalenten Serum von WASSERMANN und OSTERTAG zurückbleibt. Ein anderes, ebenfalls für die Praxis hergestelltes Serum von BRAUN und KLETT[22]), das hauptsächlich mit Autolysaten von Schweineseuchebakterien hergestellt sein soll, über das indessen ausgedehntere amtliche Erfahrungen aus der Praxis nicht vorliegen, sei nur der Vollständigkeit halber hier erwähnt.

Simultanimpfung bei Schweineseuche in der Praxis.

Bekanntlich verleiht die passive Immunität allein nur einen relativ kurzdauernden Schutz. Infolgedessen versuchte man auch bei Schweineseuche seit langem den durch das Serum den Schweinen übertragenen Schutz durch eine gleichzeitige oder kurz nachher erfolgende aktive Immunisierung mittels Schweineseuchekulturen, also nach Art des LORENZschen Schweinerotlaufverfahrens, zu verlängern. Von diesem Gedanken ausgehend, gibt SCHREIBER[23]) für die Praxis zu seinem Schweineseucheserum abgeschwächte lebende Schweineseuchebazillen ab, welche neben dem Serum den Schweinen injiziert werden.

Dieses Verfahren birgt aber für die Praxis gewisse Gefahren in sich. Denn durch die lebenden Kulturen entstehen unter Umständen große Impfverluste, wie dies auch in der Praxis bereits verschiedene Male beobachtet worden ist. Eine Injektion abgetöteter Schweineseuchebakterien verleiht indessen keine aktive Immunität. Aus diesem Grunde haben anfangs WASSERMANN und OSTERTAG auf ein Simultanimpfverfahren in der Praxis überhaupt verzichtet. Sie verließen sich

vielmehr darauf, daß in stark verseuchten Beständen die Schweineseucheerreger so verbreitet sind, daß die neugeborenen Tiere schon sehr bald in den ersten Lebenswochen auf natürlichem Wege durchseucht werden. Aus diesem Gedankengang heraus gaben Wassermann und Ostertag in der Praxis den neugeborenen Ferkeln am 2.—3. Lebenstage 4—5 ccm des polyvalenten Schweineseucheserums ohne Kulturen, in der Erwartung, daß nun unter dem Schutz dieses Serums die natürliche Durchseuchung ohne weitere Gefahr, und damit die aktive Immunisierung für eine längere Zeit eintreten werde. Dies war auch, wie die Statistik ergab, bei einem großen Teil der durchgeimpften Bestände der Fall. Immerhin blieb jedoch eine bedeutende Anzahl von Beständen übrig, in welchen die allein mit Serum geimpften Ferkel einige Wochen lang vollkommen gesund blieben, dann aber doch von der Seuche ergriffen wurden, ein Beweis also, daß in diesen Fällen die passive Immunität allein zu kurzdauernd gewesen war. Für solche Bestände führten nun in neuester Zeit Wassermann und Ostertag die Simultanimpfung mittels des im Abschnitt I beschriebenen Schweineseuchebazillenextraktes durch; denn da der keimfreie Schweineseuchebazillenextrakt keine lebenden Bakterien enthält, so sind Verluste infolge der aktiven Immunisierung durch ihn nicht zu befürchten. Diese Simultanimpfung nach Wassermann, Ostertag und Citron wird in der Praxis folgendermaßen durchgeführt. Die zu impfenden Ferkel bekommen am zweiten oder dritten Lebenstage, am besten unter die Haut der linken Ohrfalte, 4—5 ccm polyvalentes Serum, unmittelbar darauf 2 ccm des keimfreien Schweineseuchebazillenextraktes unter die Haut der rechten Ohrfalte. Der für die Praxis bestimmte keimfreie Schweineseuchebazillenextrakt wird an derselben Stelle wie das polyvalente Serum im pharmazeutischen Institut von Ludw. Wilh. Gans in Frankfurt a. M. hergestellt. Er wird genau nach dem Verfahren gemacht, das in dem Abschnitt I ausführlich beschrieben wurde, nur mit dem Unterschied, daß er für die Zwecke der Praxis gleichfalls polyvalent ist, d. h. aus verschiedenen Schweineseuchestämmen hergestellt und dann gemischt wird. Seine aktiv immunisatorische Stärke wird stets an Kaninchen ausgeprüft, ehe er zur Ausgabe gelangt.

Die bisherigen Erfahrungen mit dieser Simultanimpfung sind sehr günstige, indem es auf diese Art und Weise gelungen ist, in Beständen, wo früher mit der Serumimpfung allein nur eine kurzdauernde Immunität gegen Schweineseuche erzielt werden konnte, einen langdauernden Schutz zu erreichen.

Literatur.

1) Bureau of animal industry 1890/91, 1892.
2) Ebenda 1891/92.
3) Ebenda 1894.
4) Ann. de l'Inst. Pasteur 1895.
5) Compt. rend. de l'Acad. des Sciences 1902.
6) Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten 1896, Bd. XXIII.
7) Ebenda 1904.
8) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1905, Bd. XXII, Heft 2.
8a) Archiv für Hygiene 1905, Bd. LII.
9) Deutsche med. Wochenschr. 1905 und Centralbl. für Bakt. 1907.
10) Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten 1907, Bd. LVI.
11) Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII, pag. 44. Abt. I, Referate.
12) Deutsche med. Wochenschr. 1904.

13) Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten 1907, Bd. LVI.
14) Wassermann und Ostertag, Mitteilungen der Vereinigung Deutscher Schweinezüchter 1899/01; Bericht an den preußischen Minister für Landwirtschaft 1901; Monatshefte für praktische Tierheilkunde 1903; Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten 1904, Bd. XLVII.
15) Bruck, Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten 1904, Bd. XLVII.
16) Krautstrunk, Ebenda.
17) Monatshefte für praktische Tierheilkunde, Bd. XV.
18) Schreiber, Berliner tierärztliche Wochenschr. 1902.
19) Schubert, Deutsche tierärztliche Wochenschr. 1904.
20) Bruck, Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten 1904, Bd. XLVII.
21) Breidert, Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten 1904, Bd. XLVII.
22) Braun und Klett, Deutsche tierärzliche Wochenschr. 1900.
23) Schreiber, a. a. O.

XXVI.

Schweinepest.

Von

P. Uhlenhuth und **E. Hübener**

in Berlin.

Einleitung.

Da durch die neueren ätiologischen Forschungen die Lehre von der Schweinepest in ein ganz neues Stadium getreten ist, so ist es notwendig, die Entwicklung dieser neuen Lehre ausführlich zu besprechen. Dabei soll gleich bemerkt werden, daß die im folgenden mitgeteilten Ergebnisse nur lückenhaft sein können, da wir erst im Beginn unserer Forschungen stehen.

Im Jahre 1903 berichteten de Schweinitz und Dorset[1]) über eine im Staate Jowa (Nordamerika) unter den Schweinen beobachtete, der Hogcholera ähnliche Seuche, bei der ihnen eine Übertragung der Krankheit sowohl durch unfiltriertes wie filtriertes bakterienfreies Blut und Blutserum erkrankter Tiere auf gesunde Schweine gelungen war und die sie daher ätiologisch auf einen ultramikroskopischen Erreger zurückführten. Sofort nach Bekanntwerden dieser Beobachtungen stellte Poels[2]), der gerade mit der Erforschung der Ursache von seuchenhaften Krankheiten unter den Schweinen in den Niederlanden beschäftigt war, einen Versuch an, in welchem es ihm gelang, durch keimfreien, filtrierten Saft von Organen eines mit akuter Schweinepest behafteten Schweines bei zwei damit geimpften Ferkeln tödliche Schweinepest zu erzeugen. Im Jahre 1905 erschien dann aus dem Bureau of animal industry von Dorset, Bolton und Mc Bryde[3]) eine ausführliche Publikation über die Ätiologie der Hogcholera mit einer Einleitung von Salmon. Die Autoren hatten auf Grund zahlreicher Untersuchungen und sorgfältiger Experimente die wichtige Tatsache erhärten können, daß die Seuche im Staate Jowa echte Hogcholera gewesen, das Kontagium der Hogcholera somit ein filtrierbares Virus und der bisher als Erreger der Krankheit angesehene Hogcholerabazillus nur ein sekundär sich ansiedelnder Parasit ist. Verschiedene wichtige Beobachtungen waren es, welche diese Forscher damals bewogen, trotz des im Jahre 1885 in demselben Institut von Salmon und Smith entdeckten und als Erreger

der Hogcholera bzw. der deutschen Schweinepest, der französischen peste du porc, des englischen swine fever allseitig anerkannten Bacillus suipestifer auf Anregung von SALMON die ätiologischen Forschungen von neuem wieder aufzunehmen, nämlich erstens der verhältnismäßig sehr schwierige Nachweis des Bacillus suipestifer in einzelnen Seuchenausbrüchen, ferner die Beobachtung, daß Schweine, die mit dem Bacillus suipestifer geimpft waren, wohl gegen diesen Bazillus nicht aber gegen die natürliche Infektion immun waren, während das natürliche Uberstehen der Seuche Immunität hervorrief, der Mißerfolg der Serumbehandlung in der Praxis und der auffällige Unterschied, der zwischen der Übertragung der Krankheit mit Blut natürlich kranker Tiere einerseits und mit Reinkulturen des Hogcholerabazillus andererseits bestand. Während eine verhältnismäßig kleine Menge Blut eines an der Seuche spontan erkrankten Schweines genügte, um bei subkutaner Impfung eine tödliche Erkrankung hervorzurufen, waren große Kulturmengen erforderlich, um bei gleicher Impfweise Tiere krank zu machen, oder es gelang überhaupt nicht, die Krankheit zu erzeugen. Diesen auffälligen Gegensatz hatten SALMON und SMITH mit der größeren Virulenz der Hogcholerabazillen im Blute zu erklären versucht und sich andererseits vorgestellt, daß das injizierte Blut, von dem sie einen gewissen Gehalt an Hogcholerabazillen annahmen, durch den Vorgang der Gerinnung in den Geweben die mitübertragenen Bazillen vor den schädigenden Wirkungen der Körperflüssigkeiten und den Phagocyten schütze und vor dem Übertritt in die Zirkulation besonders virulent mache. DE SCHWEINITZ und DORSET setzten an diesem Punkte mit ihren Arbeiten ein, die dann im wesentlichen zur Feststellung folgender Tatsachen führten:

1. Filtriertes Blut kranker Tiere durch aufeinander folgende Impfungen von einem Schwein auf das andere übertragen wirkt krankmachend. Doch scheint das Virus nach einer Anzahl von Schweinepassagen an Wirksamkeit einzubüßen.

2. Tiere, die eine durch filtriertes Blut erzeugte Krankheit überstanden haben, sind gegen die natürliche und künstliche Ansteckung immun.

3. Schweine, welche die natürliche Krankheit überstanden haben, sind gegen spätere natürliche und künstliche Infektionen immun.

4. Tiere zu künstlich infizierten Tieren gesetzt erkranken unter dem Bilde der Hogcholera.

5. Die Verfütterung von Eingeweiden der infizierten Tiere ruft dieselben Krankheitssymptome hervor.

6. Bei allen untersuchten Ausbrüchen von Hogcholera konnte das filtrierbare Virus nachgewiesen werden, fast ebenso regelmäßig aber auch der Hogcholerabazillus.

7. Das Krankheitsbild, das durch intravenöse Injektion oder durch Verfütterung von Hogcholerabazillen hervorgerufen wird, ist bezüglich der Symptome und pathologischen Veränderungen den bei natürlichen Ausbrüchen der Hogcholera sehr ähnlich.

8. Die durch Einverleibung von Kulturen des Hogcholerabazillus hervorgerufene Krankheit ist nicht kontagiös.

9. Blut der auf diese Weise infizierten Schweine ist nicht infektiös.

10. Nach Überstehen der künstlich mit Bazillen hervorgerufenen Krankheit tritt keine Immunität gegen die natürliche Infektion ein.

Die Frage, ob diese für die amerikanische Hogcholera festgestellten Tatsachen auch für die deutsche Schweinepest, die französische peste du porc und das englische swine fever Geltung haben, lassen sie unerörtert.

Zu ähnlichen Ergebnissen wie die erwähnten Forscher kamen kurz darauf Clintock, Boxmeyer und Siffer[4]) auf Grund ihrer Untersuchungen gelegentlich einer Epidemie in Hastings im September 1903 und eines Seuchenausbruchs unter dem Schweinebestand der Irrenanstalt Pontiac (Michigan) im Mai 1904. Auch ihnen gelang es durch subkutane Injektionen filtrierten Blutes hogcholerakranker Tiere aus beiden Epidemien 5 Schweine in 19—38 Tagen zu töten. Davon hatten 4 charakteristische Darmgeschwüre. Zwei weitere mit Pasteur-Filtrat geimpfte Tiere starben ohne spezifische Darmveränderungen an septikämischen Erscheinungen. Trotzdem erzeugte das Blutserum eines dieser Tiere typische Hogcholera. Trotz zahlreicher bakteriologischer Untersuchungen der Fälle in Hastings konnten sie niemals den Hogcholerabazillus isolieren oder eine Agglutination dieses Bazillus durch Serum erkrankter Tiere feststellen. Aus dem Fehlen des Hogcholerabazillus, der Schwierigkeit mit demselben Schweine zu infizieren, der Leichtigkeit der natürlichen Ausbreitung der Seuche zusammen mit den Ergebnissen der Fortimpfung mit filtriertem Material schlossen die Untersucher, daß der Hogcholerabazillus als primäre Ursache der Hogcholera nicht anzusehen sei.

Nach dem Bekanntwerden der Arbeiten von de Schweinitz und Dorset über die Natur des Ansteckungsstoffes der amerikanischen Hogcholera wurden von Ostertag[5]) im Hygienischen Institut der Berliner tierärztlichen Hochschule im Mai 1904, Versuche über die Filtrierbarkeit des Ansteckungsstoffes der deutschen Schweinepest angestellt. Diese Versuche, zu denen Material von subakut und chronisch pestkranken Tieren aus drei verschiedenen verseuchten Beständen Verwendung fand, fielen in 8 Fällen völlig negativ aus und sprachen somit gegen die Annahme, daß die gegenwärtig in Deutschland herrschende subakute und chronische Form der Schweinepest auf ein filtrierbares Virus zurückzuführen sei. Zu demselben negativen Resultat kam 1905 Koske[6]) bei seinen Untersuchungen über die Schweinepest, indem es ihm nicht gelang, mit dem Pukall-Filtrat des Blutes eines an Schweinepest akut eingegangenen Schweines, über dessen Herkunft nähere Angaben nicht gemacht sind, bei zwei Ferkeln, die 20 resp. 50 ccm einer $33\,^1/_3\,^0/_0$igen Blutmischung in die Blutbahn eingespritzt bekamen, das Krankheitsbild der Hogcholera zu erzeugen. Weitere Untersuchungen wurden in Deutschland zunächst nicht vorgenommen. Man begnügte sich im Hinblick auf die negativen Resultate (Ostertag) mit der Annahme, daß die durch filtrierbares Virus hervorzurufende Form der Schweinepest der Amerikaner als eine selbständige Krankheit von der eigentlichen durch den Bacillus suipestifer hervorgerufenen deutschen Schweinepest abzutrennen und anders zu benennen sei (Ostertag, Joest, Koske). In England dagegen wurden im Boardslaboratorium[7]) die Angaben der Amerikaner mit Material von Swine-fever aus verschiedenen Teilen des Landes nachgeprüft und bestätigt.

Einzelne Forscher waren schon vordem unabhängig von den Amerikanern in ihrem Glauben an die ätiologische Bedeutung des Bacillus suipestifer erschüttert. So sprach HOTTINGER[8]) in Sao Paolo (Brasilien) 1905 auf Grund seiner vergleichenden Untersuchungen über den Bacillus suipestifer und Bacillus Sanarelli, den angeblichen Erreger des gelben Fiebers — da ihm eine natürliche Übertragung der künstlich mit B. suipestifer erzeugten Impfkrankheit auf gesunde Schweine nicht gelang — die Überzeugung aus, daß der Bacillus suipestifer nicht der Erreger der Schweinepest, sondern „ein vom Darmkanal aus ins Blut eingedrungener koliähnlicher Mikrobe mit erworbenen pathogenen Eigenschaften ist, welcher wohl immer aber nicht ausschließlich bei schweinepestkranken Tieren gefunden wird". Auch THEILER[9]) waren schon 1903 bezüglich der Ätiologie der südafrikanischen Schweinepest, die in klinischer und anatomisch-pathologischer Beziehung der Hogcholera der Amerikaner glich, Zweifel an der ursächlichen Bedeutung des Bacillus suipestifer für diese Seuche entstanden. Ihm mißlang ähnlich wie BOXMEYER trotz sorgfältiger Untersuchungen bei typisch pestkranken Schweinen der Nachweis des Bacillus suipestifer. Er fand ihn weder in den Lymphdrüsen, noch in der Milz, noch im Blut. Dabei fiel ihm auf, daß in keinem Fall eine Verkäsung der Mesenterialdrüsen zu beobachten war, wie sie in den europäischen Berichten über diese Seuche öfter beschrieben wurde. Er erklärte die auffälligen negativen Bakterienbefunde mit dieser Tatsache, indem er annahm, daß zum Nachweis des Bacillus suipestifer die Lymphdrüsen verkäst sein müßten, und er gab sich zufrieden mit den Mitteilungen mehrerer Forscher, daß es eben manchmal schwierig sei, den Bacillus suipestifer zu finden, indem es vorkommen kann, daß er schon vor dem Tode des Tieres aus dem Körper verschwindet. Auf Grund der Arbeiten der Amerikaner ging THEILER daran, die Befunde nachzuprüfen. Wenn er auch nicht filtriertes, sondern unfiltriertes Material, das sich aber bei einfacher kultureller Untersuchung (Blut- und Darmlymphdrüsen-Ausstriche auf Agar) als keimfrei erwies, zur Infektion benutzt hat, so darf man doch sagen, daß er die Angaben der Amerikaner in den wichtigsten Punkten bestätigt hat. Um sich von der Richtigkeit der neuen Anschauung persönlich zu überzeugen, hatte HUTYRA[10]) Ende 1905 in Ungarn Versuche angestellt, die jedoch zufolge äußerer Umstände, bevor sie noch zu einem endgültigen Resultat führten, unterbrochen werden mußten. Er konnte aber im Verlauf seiner weiteren Versuche zunächst den Befund der amerikanischen Forscher, wonach bakterienfreies, filtriertes Blut oder Blutserum pestkranker Schweine eine akute hämorrhagische Septikämie zu erzeugen vermag, für die in Ungarn herrschende Schweinepest bestätigen, wobei er bei den mit filtriertem Pestmaterial infizierten Ferkeln mitunter auch Schwellung und Verschwärung der solitären Follikel sowie in einem Fall auch eine streifenförmige oberflächliche Nekrose der Schleimhaut des Grimmdarms beobachtete.

Um vergleichende Prüfungen über die amerikanische und deutsche Schweinepest anstellen zu können, war DORSET von OSTERTAG bereits im November 1904 um Überlassung von Material der amerikanischen Hogcholera gebeten. Da die Seuche in Jowa inzwischen erloschen und die zu ihrem Studium im Staate Jowa eingerichtete Untersuchungsstation wieder aufgehoben war, konnte das Material — Blutserum eines an Hogcholera gestorbenen Schweines — erst

im Juni 1906 geschickt werden, mit dem dann unverzüglich Versuche von Ostertag[11]) und Stadie[12]) angestellt wurden. Durch die mit diesem Material vorgenommenen Impfungen konnte bei allen Tieren eine tödliche Septikämie (perakute Schweinepest) und bei zwei zu den septikämisch erkrankten Ferkeln zugesetzten Tieren die intestinale Form der Schweinepest mit umfangreicher Diphtherie der Dickdarmschleimhaut erzeugt werden. Zwei mit filtriertem Blut eines durch die Impfung mit dem amerikanischen Originalmaterial eingegangenen Schweines geimpfte Ferkel erkrankten ebenfalls an Schweinepest. Damit haben die Autoren bewiesen, daß nicht nur das Blut ein ultravisibles, hämorrhagische Septikämie erzeugendes Agens enthält, sondern auch nachgewiesen, daß es bei Verimpfung auf gesunde Schweine eine Darmdiphtherie, wie sie für die Schweinepest charakteristisch ist, im Gefolge hat. Die daraufhin von neuem in gleicher Weise mit einheimischem Material aus Schweinepestbeständen angestellten acht Versuche führten nunmehr auch in fünf Fällen zu einem positiven Ergebnis, womit nach Ostertag erwiesen ist, daß auch die deutsche Schweinepest gleich wie die amerikanische Hogcholera durch ein filtrierbares Virus bedingt wird, und daß der B. suipestifer erst sekundär in den Körper der pestkrank gewordenen Schweine eindringt. Die Mißerfolge bei drei Versuchen werden mit der Annahme erklärt, daß in diesen Fällen das Virus der Schweinepest nicht mehr oder nicht in solchen Mengen vorhanden war, um bei der gewählten Versuchsanordnung innerhalb der Versuchszeit eine Erkrankung der Versuchstiere herbeiführen zu können.

Noch vor Veröffentlichung dieser Untersuchungsergebnisse von Ostertag waren mit Beginn des Jahres 1907 im Kaiserlichen Gesundheitsamt zu Berlin auf Grund der neuen Forschungen der Amerikaner Untersuchungen in größerem Umfange von uns in Gemeinschaft mit Xylander und Bohtz[13]) aufgenommen und dann von Haendel und Schern fortgesetzt worden, über deren Ergebnis von Uhlenhuth[14]) im Laufe des Jahres 1907 mehrfach kurze Mitteilungen gemacht worden sind*). Die ersten ausführlichen Publikationen über die Schweinepest sind dann im Band XXVII und Band XXX der Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt erschienen.

Nachdem durch unsere Versuche in Übereinstimmung mit der inzwischen erfolgten Publikation Ostertags und Stadies festgestellt war, daß die Ursache auch der deutschen Schweinepest nicht der B. suipestifer, sondern ein filtrierbares ultramikroskopisches Agens war, sind von uns sofort weitere umfangreiche Untersuchungen angestellt über die Natur des Virus, seine Wirkung auf verschiedene Tiere, die Art der Invasion, der Ausbreitung im Tierkörper, der Ausscheidung aus demselben sowie über die Haltbarkeit und die Widerstandsfähigkeit des Virus in- und außerhalb des Körpers über die Resistenz gegen physikalische und chemische Eingriffe, über die Verbreitungsweise der Krankheit, über die Beziehungen zwischen Virus zum Bac. suipestifer, über das Verhältnis der Schweineseuche zur Schweinepest über Fragen also, die bisher von den Untersuchern nur gestreift oder überhaupt nicht erörtert geschweige denn einer experimentellen Prüfung unterzogen waren. Es

*) Berliner militärärztl. Gesellschaft vom 21. V. 07, s. Deutsche militärärztl. Zeitschrift 1907. — 79. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte zu Dresden 17. IX. 07 (s. Verhandlungen dieser Gesellschaft). — 14. Internat. Kongreß für Hygiene und Demographie zu Berlin 26. IX. 07 (s. Verhandlungen des Kongresses).

kann an dieser Stelle auf diese wichtigen Fragen nicht näher eingegangen werden. Wir verweisen auf die genannten Arbeiten von UHLENHUTH und seinen Mitarbeiter. In erster Linie richteten wir aber sofort unser Augenmerk auf die Ausarbeitung eines Immunisierungsverfahrens.

Bei Beginn dieser unserer Immunisierungsversuche hatten wir keine Kenntnis von den diesbezüglichen Untersuchungen DORSETS[15]), die in seiner ersten grundlegenden Arbeit „The etiology of Hogcholera" (Bureau of animal industry Bulletin 1905, Tome LXXII) keine Erwähnung gefunden hatten, sodaß wir unabhängig von ihm zu ähnlichen Resultaten gelangt sind. Die auf die Immunisierung gegen die Hogcholera sich erstreckende Mitteilung DORSETS ist in einem uns erst später zugänglich gemachten kurzen Bericht aus dem Bureau of animal industry vom 12. Febr. 1904 (Zirkular Nr. 43) erschienen. In dieser Mitteilung ist das Prinzip der Immunisierung festgelegt. Das Verfahren hat sich DORSET[22]) in Amerika und Frankreich patentieren lassen (1906 und 1907).

In einer 1908 erschienenen ausführlichen Arbeit von DORSET[22]) ist über die Immunisierung eingehend berichtet worden. DORSET und seinen Mitarbeitern gebührt daher in dieser Frage ohne Zweifel die Priorität. BOXMEYER und seine Mitarbeiter haben bald darauf ebenfalls Immunisierungsversuche angestellt. Auch im hygienischen Institut der Berliner tierärztlichen Hochschule ist die experimentell gewonnene Erkenntnis, daß das Virus der deutschen Schweinepest filtrierbar ist, zu Versuchen zur Gewinnung eines Schweinepestserums verwertet worden (OSTERTAG[14]): Diskussionsbemerkungen zu dem Vortrag von UHLENHUTH über das Wesen und die Bekämpfung der Schweinepest, 14. Internationaler Kongreß für Hygiene, Berlin 1907). Näheres ist darüber nicht publiziert worden.

Im Institut für Infektionskrankheiten zu Berlin sind dann 1907/08 von A. WASSERMANN[17]) in größeren Versuchsreihen, die sich auf 40 Einzelversuche erstreckten, in jeder Hinsicht die Angaben über die Filtrierbarkeit des Virus und die Immunität bestätigt worden. Auch in Frankreich ist neuerdings — 1908 — durch CARRÉ, LECHLAINCHE und VALLÉE[18]) die Filtrierbarkeit des Ansteckungsstoffes der angeblich aus Holland nach Frankreich eingeschleppten Schweinepest bestätigt. Nach ihrer Ansicht kann ebenfalls kein Zweifel mehr bestehen an der Existenz der authentischen auf einem filtrierbaren Virus beruhenden Schweinepest in Frankreich, welche der amerikanischen Hogcholera, dem englischen Swinefever und der ungarischen und deutschen Schweinepest entspricht.

Im Gegensatz zu diesen Bestätigungen der Befunde der Amerikaner sind von anderer Seite Stimmen gegen die Richtigkeit der Annahme eines filtrierbaren ultramikroskopischen Agens als des ätiologischen Faktors der Schweinepest und für die ätiologische Bedeutung des Bac. suipestifer erhoben. So hatte SCHREIBER[19]) auf Grund von Beobachtungen, die gelegentlich des experimentellen Studiums der Schweinepest und besonders der Immunisierungsversuche von ihm gemacht worden waren, erklärt, auf dem alten Standpunkt, daß der Bac. suipestifer als Erreger der Schweinepest anzusprechen ist, beharren zu müssen.

Er bestreitet durchaus nicht die Tatsache, daß es mittels filtrierbaren Virus (Blut, Organextrakte an Schweinepest verendeter Schweine) gelingt, Schweinepest zu erzeugen — „er selbst hat sogar diese Experimente gemacht" — er sieht aber in dem filtrierbaren Virus nichts anderes als das in Wechsel-

wirkung mit dem Organismus von dem Bac. suipestifer gebildete Toxin, welches als sogenanntes Aggressin im Sinne Bails infektionsbefördernd wirkt und den Schweinepestbazillus, der wie der Rotlaufbazillus ein häufiger Bewohner des Schweines ist (Uhlenhuth, Grabert[20]) usw.), mobilisiert. Nur in den Fällen, in welchen normalerweise der Bac. suipestifer im Schweineorganismus vorkommt, ist es seiner Ansicht nach möglich, mit keimfreien Filtraten von Blut oder Organsaft schweinepestkranker Schweine die Krankheit hervorzurufen. Ebenso wie die Toxine des Bac. suipestifer d. h. das filtrierbare Virus infektionsbefördernd wirken sollen, so sollen sie auch in geringer Menge eine Immunität befördern uud erzeugen, wodurch alle Beobachtungen der Autoren, welche einem ultravisiblen neuen Infektionserreger zugeschoben werden, eine Erklärung finden.

Außer Schreiber hat sich Lourens[21]) in einer Arbeit: „Untersuchungen über die Filtrierbarkeit der Schweinepestbazillen" gegen die neue Auffassung der Ätiologie der Schweinepest ausgesprochen.

Er vertritt die Ansicht, daß der Schweinepestbazillus vermöge seiner Eigenschaft in Körner zu zerfallen, die Fähigkeit besitzt, leicht Filter zu passieren, sich dem Filtrat beizumengen und sich in demselben selbst bei Bebrütung längere Zeit halten zu können, ohne daß es zu einer makroskopisch durch eintretende Trübung erkennbaren Vermehrung der Bakterien zu kommen braucht, und ist der Meinung, daß von den Untersuchern unbewußt suipestiferbazillenhaltige Filtrate bei ihren Übertragungsversuchen benutzt worden seien. Nun hat aber Lourens nicht in jedem Falle bakterienhaltige Filtrate bekommen, sondern bei einer ganzen Reihe von Versuchen die Möglichkeit der Gewinnung keimfreier Filtrate suipestiferhaltiger Flüssigkeiten nachgewiesen. Merkwürdigerweise ist aber die Zahl der mit wirklich nachweisbar keimfreien, von schweinepestkranken Tieren stammenden Filtraten angestellten Übertragungsversuche eine bescheidene. Es sind nach dieser Richtung hin nur drei Versuche an vier Schweinen ausgeführt worden. Unter diesen Versuchen ist es ihm einmal gelungen mit auf Keimfreiheit geprüften und keimfrei gefundenem Material die anatomischen Zeichen der Schweinepest bei einem Versuchstier hervorzurufen. Da Kulturen aus den Organen dieses Tieres Kolonien von Pestbazillen ergaben, so schließt Lourens, daß letztere in dem eingespritzten Material in einer nicht nachweisbaren Form vorhanden waren.

In einer Studie über die Ätiologie der Schweinepest hat sich dann Glässer[22]) gegen die Filtrierbarkeit des Ansteckungsstoffes der Schweinepest erklärt und auf Grund seiner Versuche als Ursache der Schweinepest in Deutschland allein den Bacillus suipestifer aussprechen zu müssen geglaubt.

Seine Schlußfolgerungen gründen sich auf 5 Versuche an 6 Ferkeln, von denen nur 2 mit Filtraten natürlich erkrankter Ferkel, und zwar ohne krankmachende Wirkung, geimpft wurden, während die 4 anderen zu Versuchen mit dem Bac. suipestifer dienten.

Was die Einwände gegen diese Behauptungen betrifft, so müssen wir folgendes hervorheben:

Von Ostertag[11]) und Uhlenhuth[14]) ist bereits betont, daß filtriertes Serum von durch den Bac. suipestifer krankgemachten Schweinen nicht infektiös wirkt. Diese Tatsache haben wir selbst durch Versuche erhärten können. Filtriertes Serum und Organsaft, von künstlich durch intravenöse Impfung von Bac. suipestifer infizierten und nach 24 Stunden in der Agonie geschlachteten Schweinen hat in Dosen von 40 ccm bei mehrfachen Versuchen nicht krankmachend gewirkt. Die Tiere blieben vollkommen munter und zeigten

bei der Schlachtung nach 4 Wochen normalen Befund. Ebenso ist nach unseren Versuchen künstliches, durch Bac. suipestifer-Kulturen nach BAILscher Methode hergestelltes Aggressin nicht imstande, Schweinepest zu erzeugen. Die Tiere erwiesen sich bei der Schlachtung frei von pathologischen Veränderungen. Es sei in diesem Zusammenhange erwähnt, daß PRETTNER[23]) (Zeitschr. für Infektionskrankh. der Haustiere 1906) sterilisierte Bauchhöhlen-Exsudate (Aggressine) von Schweinen, die durch intraperitoneale Injektion hochvirulenter Bac. suipestifer-Kulturen getötet waren, in mehrfachen Dosen von 10 ccm gesunden Schweinen zwecks Immunisierung gegen den Bac. suipestifer eingespritzt hat. Die Tiere blieben vollkommen munter. Sie hätten aber erkranken müssen, wenn die Annahme SCHREIBERS richtig wäre. Die mit den aus dem Schweinekörper hergestellten Suipestifer-Aggressinen vorbehandelten Schweine sind auch gegen die natürliche Infektion nicht immun (OSTERTAG), wohl aber gegen den Bac. suipestifer (PRETTNER).

An und für sich spricht schon gegen die SCHREIBERsche Annahme die geringe Menge Virusfiltrat, — wenn man solches überhaupt als Aggressin bezeichnen will — die zur Infektion ausreicht, 0,25—0,5—1,0 bis 2,0 ccm, ferner die ausgesprochene Infektiosität des Urins und der Galle, die frei von Bac. suipestifer sich erwiesen haben, ferner die ganze Epidemiologie und die große Kontagiosität der Krankheit. Auch im Tierexperiment an Mäusen ist es uns mit Serum-Virusfiltrat nicht gelungen, untertötliche Dosen von Pestifer im Vergleich mit normalem Serum zu tötlichem zu machen.

Was die LOURENSschen Arbeiten betrifft, so muß die Schwierigkeit der Gewinnung bakterienfreier Filtrate ohne weiteres zugegeben werden, ebenso die des überzeugenden Nachweises der absoluten Keimfreiheit derselben, aber beides liegt doch im Bereich der Möglichkeit, wovon sich LOURENS selbst hat überzeugen können. Ihm ist es in dem einen Falle gelungen, mit Serumfiltrat, das von ihm selbst geprüft und keimfrei befunden worden war, wieder Schweinepest zu erzeugen. Da sich in den Organen des mit diesem keimfreien Serumfiltrat geimpften Ferkels Schweinepestbazillen befanden, so schließt LOURENS, daß sie von ihm mit eingespritzt worden sein müssen, obwohl sie in der Injektionsflüssigkeit nicht nachweisbar waren. Wäre LOURENS durch diese Beobachtung zur Anstellung einer größeren Versuchsreihe mit Serumfiltraten bewogen worden, so würde er sicherlich noch mehrfach das scheinbar widersprechende Ergebnis haben beobachten können. Die Tatsache des so häufigen Befundes der Schweinepestbazillen in den Organen der durch keimfreies Serumfiltrat krank gewordenen Schweine hätten ihm ungezwungen die auch im Reichsseruminstitut[10]) von VELZEN[24]) erhobenen Befunde des Vorkommens von Schweinepestbazillen im Darm gesunder Schweine (UHLENHUTH, HÜBENER, GRABERT, GARDENGHI[25]), MORGAN[26])) erklären können.

Es ist zweifellos richtig, daß die Gewinnung keimfreien Impfstoffes der Schweinepest durch Filtration schwierig ist und Zweiflern einen gewissen Spielraum läßt. UHLENHUTH[27]) und seine Mitarbeiter sind daher unablässig bemüht gewesen, auf andere Weise den unumstößlichen Beweis der Keimfreiheit der zur Verimpfung gelangenden Filtrate zu erbringen und haben bei der Prüfung der Wirkung von Desinfektionsmitteln auf das Schweinepestvirus in dem Antiformin, einer Lösung von Alkalihydrat und Alkalihypochlorid, ein Mittel gefunden, welches in der gewählten Versuchsanordnung in 2,5proz. Lösung zu unverdünnten, künstlich mit Hogcholerabazillen infizierten Serumfiltraten hinzugesetzt, nach 30 bis 40 Minuten Schweinepest-Bakterien abtötet, während die spezifisch krankmachende Wirkung der von schweinepestkranken Schweinen stammenden Serumfiltrate

durch die Einwirkung des Antiformins in gleicher Konzentration und derselben Versuchsanordnung erst nach ca. 2 Stunden verloren geht. Erwähnt sei nur, daß auch andere Desinfektionsmittel — z. B. Karbol und Sublimat — bei entsprechend abgeänderter Versuchsanordnung die gleiche Wirkung entfalten. Es ist damit jeder subjektiven Beurteilung der zur Verimpfung gelangenden Serumfiltrate bezüglich ihrer Keimfreiheit der Boden entzogen und die Möglichkeit der Anwendung einer objektiv arbeitenden Methode gegeben. Es kann daher mit aller Bestimmtheit ausgesprochen werden, daß es möglich ist, mit absolut bakterienfreiem Serumfiltrat natürlich schweinepestkranker Schweine wieder die Schweinepest zu erzeugen. Damit wäre nun nicht gesagt, daß in dem Filtrat ein belebtes Virus enthalten sein muß. Die Wirkung des Serums könnte sehr wohl eine Giftwirkung sein, und in der Tat ist ein ähnlicher Standpunkt von Schreiber[13]), der eine Aggressinwirkung annimmt, wie wir sahen, vertreten und eingehend verteidigt worden. Es sind bereits die Gründe dargelegt worden, welche gegen die Schreibersche Annahme sprechen. Es kann diesen noch hinzugefügt werden, daß in dem Antiformin ein Mittel gefunden worden ist, welches nicht nur die lebende Bakterienzelle auflöst und unschädlich macht, sondern auch Bakterientoxine, speziell das Suipestifer-Toxin zerstört, wovon man sich leicht durch Experimente überzeugen kann. Wenn nun also Serumfiltrate, Blutlösungen oder Organextrakte, auf die Antiformin in bestimmtem Lösungsverhältnis und entsprechend lange eingewirkt hat, die also sicherlich keinen Schweinepestbazillus und sicherlich auch nicht sein Toxin enthalten können, dennoch bei der Injektion auf gesunde Schweine Schweinepest hervorrufen, so bleibt doch nichts anderes übrig, als diese Wirkung auf einen unbekannten, dem Bac. suipestifer an Resistenz überlegenen Erreger oder das Gift eines solchen zurückzuführen. Gegen die letztere Annahme spricht die große Kontagiosität der mit bakterienfreiem Material erzeugten Krankheit und die Möglichkeit, mittels solchen Impfmaterials durch Generationen hindurch immer wieder die Krankheit hervorzurufen, sowie die toxinvernichtende Eigenschaft des Antiformins, so daß sich also aus den Versuchen notgedrungen die Annahme eines filtrierbaren belebten Agens als des ätiologischen Faktors der Schweinepest und der sekundären Rolle des Bac. suipestifer bei dieser Krankheit ergibt.

Daß letzterer sekundär auf den Verlauf und Ausgang der Schweinepest einen bedeutenden Einfluß hat, soll nicht nur nicht geleugnet, sondern mit Nachdruck hervorgehoben werden. Daß er für den Erreger der Schweinepest gehalten worden ist, darf bei seinem häufigen Vorkommen in den Organen schweinepestkranker Schweine und seiner Eigenschaft, nach intravenöser oder stomachaler Einverleibung eine der Schweinepest in klinischer und anatomisch-pathologischer Beziehung gleichende Krankheit zu erzeugen, wahrlich keine Verwunderung hervorrufen.

Doch handelt es sich bei dieser experimentellen Infektion um eine, den Symptomen nach der Schweinepest ähnliche, dem Wesen nach von ihr verschiedene Krankheit, was aus folgenden Tatsachen hervorgehen dürfte:

1. Die durch Einverleibung von Suipestifer-Kulturen hervorgerufene Krankheit ist im Vergleich zur natürlichen Seuche kaum kontagiös;
2. filtriertes Blutserum der durch Kulturen infizierten Schweine ist nicht infektiös;
3. nach Überstehen der künstlich mit Bazillen hervorgerufenen Krankheit tritt keine Immunität gegen die natürliche Infektion ein.

Nun ist die Erzeugung dieser „Pseudoschweinepest“ keineswegs eine spezifische Eigenschaft des Bac. suipestifer. Die gleichen Veränderungen können, wie UHLENHUTH[14]) und seine Mitarbeiter dargetan haben, auch unter Umständen durch Bac. enteritidis GÄRTNER, Coli-Bakterien und durch abgetötete Kulturen des Suipestifer erzeugt werden, so daß letzterer also auch in dieser Beziehung seiner Spezifität entkleidet, die so auffällige, für LOURENS und GLÄSSER[22]), der hinsichtlich der Ätiologie der Schweinepest auf dem Standpunkt von LOURENS steht, unverständliche Übereinstimmung der Symptomatologie und Pathologie beider Krankheiten dem Verständnis näher gebracht ist. Auf die von GLÄSSER gegen die Filtrierbarkeit des Ansteckungsstoffs der Schweinepest vorgebrachten Gründe näher einzugehen, dürfte sich erübrigen. Sie basieren im ganzen auf 6 Versuchen, von denen nur 2 mit Filtraten schweinepestkranker Tiere angestellt sind.*)

Es ist an dieser Stelle absichtlich vermieden, auf alle anderen Gründe, die gegen den Bac. suipestifer und für die Annahme eines anderen Erregers der Schweinepest sprechen, einzugehen. Wir verweisen in dieser Beziehung auf die Arbeiten von UHLENHUTH[14]) und seiner Mitarbeiter. Es kam nur darauf an, den immer wiederkehrenden, auf Verkennung der Verhältnisse beruhenden Einwand des mangelnden Beweises der Keimfreiheit und der zur Verimpfung gelangten Filtrate ein für alle Mal zurückzuweisen.

Angesichts der nunmehr bereits in fünf verschiedenen Ländern — Afrika, Ungarn, England, Deutschland, Frankreich — an sieben verschiedenen Instituten auf Grund einer großen Zahl von Versuchen erfolgten Bestätigungen der Befunde der Amerikaner dürften die theoretischen Erwägungen SCHREIBERS sowie die drei resp. zwei negativen Versuche von LOURENS und GLÄSSER kaum noch Beweiskraft für die Richtigkeit ihrer Anschauungen und die Unrichtigkeit der Beobachtungen der anderen Forscher haben.

Da die Grundlage für alle zur Erforschung der Schweinepest anzustellenden Versuche ein Ausgangsmaterial bilden muß, das Bakterien und besonders die Anwesenheit des Bacillus suipestifer mit absoluter Sicherheit ausschließt, so soll in folgendem zunächst die Technik der Gewinnung eines solchen Materiales besprochen werden. Solange es nicht gelingt, den Erreger der Schweinepest in Reinkultur zu züchten, solange sind wir gezwungen, auf rein mechanischem Wege durch Filtration von Material, das aus einem schweinepestkranken Körper stammt, bakterienfreies Virus herzustellen. Wie bereits erwähnt, gibt es noch eine zweite Möglichkeit, suipestiferfreies Material zu bekommen, nämlich durch Zusatz gewisser chemischer bakterientötender Mittel zu der betreffenden Flüssigkeit. Jedoch wird durch derartige Mittel auch das Virus geschädigt.

Technik der Gewinnung des Schweinepestvirus.

Bei dem an Schweinepest erkrankten Tiere findet sich der Ansteckungsstoff vor allem im Blut. Bei der Gerinnung des Blutes außerhalb des Tierkörper geht der Ansteckungsstoff auch in das Serum über.

---

*) Neuerdings hat GLÄSSER behauptet, daß die filtrierbare Form der „Schweinepest“ keine echte Schweinepest sei, die echte deutsche Schweinepest würde durch einen besonderen, von ihm entdeckten typhusähnlichen Bazillus hervorgerufen. Die Filtrierbarkeit der von uns studierten Seuche erkennt GLÄSSER nunmehr auch an.

Es fehlt uns aber zurzeit noch jede Kenntnis darüber, welches Stadium der Krankheit die größte Ausbeute an Virus in quantitativer und qualitativer Beziehung gewährleistet. In der Erwägung, daß kurz vor dem Tode das Blut mit Virus überschwemmt ist, wurde von uns in den meisten Fällen das Blut der in der Agone geschlachteten Tiere verwendet.

Die Art der Schlachtung der Tiere ist nicht ohne Einfluß auf die Menge des zu gewinnenden Blutes. Ferkel werden nach voraufgegangener Betäubung durch Schlag vor den Kopf, durch Herzstich vom Halse aus oder durch Schächtschnitt entblutet. Bei der ersteren Art der Entblutung ist darauf zu achten, daß das Herz nur angestochen und nicht durchstochen wird, da in letzterem Falle Blut sich in großer Menge in der Brusthöhle ansammelt. Handelt es sich um größere Tiere, so empfiehlt es sich, nach erfolgter Betäubung bei dem auf einem Tisch gelagerten Tiere durch einen etwa 20 cm langen Schnitt die Axillaris freizulegen und zu durchtrennen. Das Blut fließt dann in langsamen Tempo der Rinne des Schnittes entlang nach dem tiefsten Punkte und kann hier bequem ohne Verlust in Gefäßen aufgefangen werden. Handelt es sich darum, das Herzblut möglichst steril zu gewinnen, so muß das Herz mittels eines Trokars, der durch einen etwa meterlangen Gummischlauch mit einer Glasperlen enthaltenden Flasche verbunden ist, in der Seitenlage von der wie zu einer Operation vorbereiteten Brustwand des betäubten Tieres aus eingestoßen werden. Das Blut fließt dann infolge Heberwirkung in die tiefer stehende Saugflasche, in welcher durch Schütteln eine Gerinnung verhindert werden kann. Auch hierbei muß man sich hüten, das Herz zu durchstoßen. Da der Trokar, der zweckmäßig in ein Reagenzglas eingeführt wird, nebst Gummischlauch und Glasflasche durch vorheriges Auskochen sterilisiert werden kann, so ist es auf diese Weise möglich, das Blut vollkommen steril aufzufangen, vorausgesetzt, daß letzteres nicht schon intra vitam infiziert war. Die Ausbeute ist jedoch keine vollständige, da Reste von Blut im Herzen und den größeren Gefäßen zurückbleiben und außerdem beim Nachlassen des Herzschlages eine Stagnation und Gerinnung des Blutes im Schlauch stattfinden kann.

Schließlich kann man auch durch Öffnen der Thoraxwand und Einschnitt in das Herz das Blut in die Brusthöhle fließen lassen und vor Eintritt der Gerinnung mit sterilen Pipetten entnehmen. Natürlich ist bei diesem Verfahren die Gefahr der Infektion eine ungleich größere ganz besonders dann, wenn wie so häufig krankhafte Prozesse an der Lunge und dem Brustfell bestehen. Im allgemeinen gewinnt man von einem 6—8 Wochen alten Ferkel 500 ccm Blut.

Zweifellos wird bei der Gerinnung Virus im Blutkuchen zurückgehalten, so daß das Serum wahrscheinlich virusärmer ist als das ursprüngliche Blut. Trotzdem haben wir die Verwendung des letzteren der leichten Filtrierbarkeit wegen dem defibrinierten Blut und allen anderen Substraten vorgezogen.

Außer im Blut findet sich das Virus auch in den Organen der schweinepestkranken Tiere.

So konnten wir es in den Muskeln, der Haut, Leber, Milz, Nieren, dem Gehirn, ja selbst in der blutfreien Linse nachweisen. Auch die Galle und vor allem der Harn schweinepestkranker Tiere enthalten das Virus. Es stellt also fast der ganze Körper des erkrankten oder eben verendeten Schweines eine ausgiebige Quelle für die Gewin-

nung virushaltigen Materials dar. Ganz besonders wichtig für die Gewinnung einer größeren Menge Virus scheint uns der Urin kranker Tiere zu sein, den man in geeigneten Käfigen durch Unterstellen von Gefäßen gewinnen und nach Filtration in ausgezeichneter Weise verwenden kann.

Nur muß er möglichst frisch zur Verwendung kommen, d. h. er darf nicht in Fäulnis übergegangen sein, da durch Fäulnis das Virus geschädigt wird.

Die Herstellung eines keimfreien Impfstoffes aus Organen ist mit gewissen Schwierigkeiten verknüpft.

Am zweckmäßigsten wird dabei so verfahren, daß die Organe in einer sterilisierten Fleischhackmaschine zerkleinert und 12 Stunden lang bei Eisschranktemperatur in physiologischer (0,85 %) Kochsalzlösung, im Verhältnis von 1 : 1, ausgelaugt oder mittels Fleischpresse ausgepreßt werden und daß dann der Preßsaft zu gleichen Teilen mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wird.

Der auf diese Art gewonnene Saft wird dann einer Vorfiltration unterworfen, um die gröberen Partikelchen zu entfernen. Dabei kann man sich eines Papier-, Asbest- oder Seesandfilters bedienen. Wir haben die Vorfiltration durch ein Asbest-Seesandfilter, wie es die Abbildung (Fig. 1) zeigt, im allgemeinen bevorzugt.

Das von uns benutzte Filter besteht aus einem Glastrichter, welcher unten mit einer 3 cm starken lockeren Asbestschicht und darüber mit einer 10 cm starken Seesandschicht zur Hälfte gefüllt und mit einem Gummistopfen auf einer Saugflasche mit Saugvorrichtung befestigt ist. Der auf diese Weise gewonnene Saft ist klar und frei von makroskopisch sichtbaren Partikelchen. Diese Art von Vorfiltration gewährleistet eine möglichst große Ausbeute des Gewebssaftes und erleichtert durch die Entfernung gröberer Gewebspartikelchen die weitere Filtration sehr wesentlich, so daß das Filtrat meist an einem Tage fertiggestellt werden kann.

Seesand
Asbest

Fig. 1.

Die Herstellung des Impfstoffes aus defibriniertem Blut erfordert ebenso wie die des Organsaftes eine Verdünnung und Vorfiltration. Soll defibriniertes Blut zur Impfung verwendet werden, so empfiehlt es sich, das Blut in etwa gleichen Teilen sterilen Leitungswasser oder noch besser in destilliertem Wasser aufzufangen, wobei das Blut eine lackfarbene Beschaffenheit annimmt. Wie wir experimentell haben nachweisen können, wird dadurch das Virus nicht unwirksam gemacht.

Nur das reine Serum kann ohne weiteres, d. h. unverdünnt und ohne Vorfiltration, durch bakteriendichte Filter filtriert werden. Zu seiner Gewinnung wird das möglichst steril aufgefangene Blut zunächst 3—4 Stunden bei Zimmertemperatur, dann 12 Stunden in einem kühlen Raume aufbewahrt und das abgeschiedene Serum mit Pipetten abgenommen.

Zur endgültigen Herstellung des keimfreien Filtrats können natürlich alle bakteriendichten Filter dienen. Von uns sind Pukallfilter, Heimsche Asbestfilter und Berkefeldsche Kerzen (Nr. 12 und 15) benutzt worden, und zwar vorzugsweise die letzteren, da sie, abgesehen von den Chamberland-F-Filtern, denen jetzt allgemein die größte Dichtigkeit nachgerühmt wird, eine sehr geringe Porenweite besitzen und von ihnen bekannt

war, daß sie die unsichtbaren Erreger anderer Infektionskrankheiten, so das Virus der Maul- und Klauenseuche hindurchlassen und weil sie dem im folgenden beschriebenen, von UHLENHUTH und WEIDANZ konstruierten Filtrier- und Abfüllapparat, der ein vollkommen steriles Abfüllen in beliebigen Quantitäten gestattet, angepaßt sind.

Der Apparat (Fig. 2), welcher im wesentlichen eine Kombination des MAASSENschen Bakterienfiltrierapparates und des Lymphabfülltrichters (Modell der Kgl. Preuß. Anstalten zur Gewinnung animalischer Lymphe) darstellt, besteht aus der Berkefeldschen Kerze (*a*), die mittels eines Gummistopfen mit der

Fig. 2.

Saugflasche (*b*) in Verbindung steht. (Fig. 1.) Diese zeigt dicht unter dem Halse ein Ansatzrohr, welches mit einer Kugel behufs Aufnahme von Watte versehen ist, in derselben befindet sich außerdem eine zweite Glaskugel, die kleine nach der Saugflasche zu gerichtete Öffnungen besitzt und dadurch ein direktes Hineinströmen von Luft in die Saugflasche verhindern soll. Das Ansatzrohr steht mit der Wasserstrahlpumpe (*d*) in Verbindung. Zur Vermeidung des Eindringens von Wasser in die Saugflasche ist das Rückschlagventil (*c*) eingeschaltet, und zur Regulierung des Luftdrucks in der Saugflasche dient der Dreiwegehahn (*e*). Der Abfüllhahn (*f*) ist mit einer

umschmolzenen Hülle versehen und zeigt außerdem eine glockenförmige Erweiterung, die es gestattet, einen Wattebausch einzufügen, welcher die Drehung des Hahnes nicht hindert, wohl aber ein Eindringen etwaiger Luftkeime verhindert. Mit dem Abfüllhahn steht das genau graduierte Röhrchen (*h*), welches oben zwecks Aufnahme von Watte zu einer Kugel ausgezogen ist, in Verbindung. Der Abfüllhahn (*f*) ist so eingerichtet, daß auch mit Umgehung des Röhrchens (*h*) das Filtrat direkt abgefüllt werden kann. Das Ausflußrohr (*g*) ist von einer angeschmolzenen Glasglocke umgeben; sie hat den Zweck, einmal durch Verschließen der Glasglocke mittels Watte das Abflußrohr vor Verunreinigung zu schützen und außerdem beim Abfüllen des sterilen Filtrats das Hineinfallen von Luftkeimen in die einzelnen Röhrchen zu verhindern*).

An Stelle dieses Apparates kann natürlich auch eine einfache Saugflasche, in welche zweckmäßig ein Reagenzglas zum direkten Auffangen der Flüssigkeit gesetzt wird, benutzt werden (Fig. 3). Man verfährt dabei in folgender Weise:

Die Berkefeldkerzen werden vor und nach jeder Filtration abgewaschen und in umgekehrter Richtung von innen nach außen mit einer $10\,^0/_0$igen Sodalösung mittels Saugpumpe durchgespült und in einer solchen Lösung ausgekocht. Nach dieser Vorreinigung werden sie mit Glaszylinder mittels Gummistopfens auf die ein Reagenzglas enthaltene, mit Verbindungsstück versehene Saugflasche aufgepaßt. Die so zusammengesetzten Filter werden zwei Stunden im Dampftopf bei 100° C. sterilisiert. Die Glaszylinder der Heimschen Filter werden mit einer 4 cm hohen Schicht von ausgeglühtem Asbest fest gestopft auf sterile Saugflaschen mit Verbindungsstück aufgepaßt und zusammen 4 Stunden im Dampftopf sterilisiert. Bei Verwendung des Filtrierapparats wird die Saugflasche der Wasserstrahlluftpumpe durch ein Verbindungsstück angeschlossen. Letzteres besteht aus zwei durch ein Glasrohr verbundenen Druckschläuchen, welche an dem der Saugflasche zugekehrten Ende verjüngt und mit steriler Watte gestopft ist, um beim Lösen des Schlauchs nach stattgehabter Filtration ein Ansaugen von Luftkeimen zu verhindern. Zwischen Filter und Saugpumpe wird eine Wulffsche Flasche mit einem Rückschlagventil zum Auffangen etwa zurückströmenden Wassers eingeschaltet. Die Verbindungsstellen der Gummistopfen mit Saugflaschen resp. Abfüllvorrichtung werden mit einer Schicht Paraffin umgeben; bei den Berkefeldfiltern wird außerdem der Raum zwischen Boden des Glaszylinders und dem unteren Rand der Kerze mit Gelatine ausgegossen, um eine restlose Filtration zu erreichen.

Fig. 3.

*) Neuerdings ist von Uhlenhuth und Weidanz der Abfüllapparat wesentlich vereinfacht, indem sie an Stelle des komplizierten und zerbrechlichen Abfüllhahns (*f*) einen Druckschlauch mit Schraubenquetschhahn gesetzt haben. Eine genauere Beschreibung dieses modifizierten Filtrierabfüllapparates befindet sich in diesem Handbuch (s. auch Centralbl. für Bakt., Bd. XLVI, Heft 6).

Die Prüfung der Filter auf Keimdichtigkeit erfolgt durch Zusatz des B. fluorescens zu den zu filtrierenden Flüssigkeiten.

Wenn man nach diesen Vorschriften und Angaben verfährt, so erhält man in den meisten Fällen ein bakterienfreies virushaltiges Impfmaterial, vor allen Dingen ist es, wie unsere Versuche gezeigt haben, auf diese Weise möglich, die Beimengung des Bac. suipestifer auszuschließen. Es verdient das besonders hervorgehoben zu werden, da von Lourens, wie eingangs erwähnt, behauptet wird, daß der Bac. suipestifer filtrierbar sei, daher unbemerkt und unbewußt in die Filtrate übergehe und so mit zur Verimpfung gelange.

Wenn in den Lourensschen Versuchen in den allermeisten Fällen die durch Blutserum und wässerigen Auszügen von Organen und auch Suipestifer-Bouillonkulturen mittelst Chamberland F und B oder Berkefeldkerzen oder Pukallfiltern hergestellten Filtrate Suipestiferbazillen enthielten, selbst dann, wenn sie in dem Ausgangsmaterial mittelst der gewöhnlichen Kulturmethoden nicht hatten nachgewiesen werden können, so kann das unseres Erachtens nur eine Folge der angewandten Technik sein. Auf Grund dieser seiner Beobachtungen und der bekannten Eigenschaft des Bac. suipestifer, in Körner zu zerfallen, von einer Filtrierbarkeit dieses Bakteriums zu sprechen, ist unseres Erachtens nicht angängig und entspricht nicht den bisherigen Gepflogenheiten, nach welchen man mit dem Begriff der Filtrierbarkeit eines Krankheitserregers die Vorstellung verbindet, daß er Filter passieren kann, die für sichtbare Bakterien in irgend einer Form absolut undurchlässig sind.

Es ist allgemein bekannt, daß die Porenweite nicht nur der verschiedenen Filterarten eine sehr verschiedene ist, sondern auch innerhalb ein- und derselben Art sehr wechselt, und es kann natürlich vorkommen, daß angeblich bakteriendichte Kerzen sich doch nicht als bakteriendicht erweisen. Sie sind dann vom weiteren Gebrauch auszuschließen. Ebenso bedarf es kaum der Erwähnung und Erörterung, daß der Erfolg der Filtration von einer ganzen Reihe von Erscheinungen, so insbesondere von den Absorptionserscheinungen abhängig ist, die ihrerseits wieder von einer Reihe von Umständen — Eiweißgehalt der Flüssigkeit, Weite und Länge der Poren, Beschaffenheit des Filtermaterials — abhängen. Es dürfte sich erübrigen, auf diese Verhältnisse an dieser Stelle näher einzugehen, da sie bereits in anderen Kapiteln dieses Handbuchs von Neisser [28]) und Pick [29]) eingehend erörtert sind. Nur soviel mag gesagt werden, daß es unter Umständen zur vollständigen Verlegung der Poren und somit zur Zurückhaltung auch der kleinsten korpuskulären Elemente kommen kann. Jedenfalls muß man stets mit einem Verlust des Virus bei der Filtration rechnen, der je nach der Verschiedenheit der begleitenden Nebenumstände ein sehr verschiedener und schließlich auch einmal ein so großer sein kann, daß das Filtrat das Virus nicht mehr in solcher Menge enthält, daß mit ihm eine krankmachende Wirkung erzielt werden kann. Hierdurch mögen manche Mißerfolge, die andere Autoren bei der Verimpfung von Filtraten gehabt haben, eine Erklärung finden.

Uns hat die Erfahrung gelehrt, daß bei Benutzung des Uhlenhuth-Weidanzschen Filtrier- und Abfüllapparates der negative Druck so geregelt sein muß, daß die Flüssigkeit aus der Kerze sekundenweise tropft, um ein von Bakterien freies und an Virus reiches Filtrat zu erhalten. Geht die Flüssigkeit schneller hindurch, so besteht die Gefahr der Bakterienverunreinigung, passiert sie das Filter langsamer, so ist die Gefahr der Zurückhaltung des Virus gegeben.

Soll filtrierter Harn zur Verimpfung gelangen, so empfiehlt es sich, aus der in situ unterbundenen und durch Kauterisation geöffneten Harnblase den Inhalt mittels steriler Pipetten in Kölbchen zu entleeren und nun mit oder ohne Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung durch bakteriendichte Filter zu filtrieren. Um größere Mengen schon intra vitam zu gewinnen, verfahre man in der oben beschriebenen Weise.

Die Galle kann naturgemäß nur in verdünntem Zustande filtriert werden. Sie wird am besten mittels einer sterilen Spitze nach Kauterisation der Einstichstelle entnommen.

Die Aufbewahrung des Virus geschieht ohne Zusatz konservierender Flüssigkeiten in zugeschmolzenen, zum Abschmelzen eingerichteten braunen Reagenzgläschen, die dann mit Datum und Angabe der Herkunft des Virus versehen in den Eisschrank gestellt werden. Unter diesen Bedingungen hält sich das Virus monatelang. In anderen Fällen haben wir allerdings eine vollkommene Abschwächung beobachtet, so daß es sich empfehlen dürfte, zu allen Versuchen nur immer möglichst frisches Material zu verwenden.

Schwierig ist — und darin muß Lourens vollkommen zugestimmt werden — die Beurteilung und der Nachweis der Keimfreiheit eines Filtrats. Die vielfach angewandte Methode, einen aliquoten Teil von dem Filtrat (eine oder mehrere Ösen oder Bruchteile eines Kubikzentimeters) auf Nährböden, besonders auf feste, zu verimpfen und aus dem Ausbleiben von Bakterienwachstum auf Keimfreiheit des Ganzen zu schließen, ist nicht einwandfrei. Das sicherste, etwaige im Filtrat enthaltene Bakterien zur Anreicherung und somit in die Erscheinung zu bringen, dürfte das von uns anfangs angewandte Verfahren sein, das Filtrat in toto einige Tage lang einer der Entwicklung der betreffenden Bakterien günstigen Temperatur auszusetzen und dann größere Mengen (5 ccm) auf Bouillon weiter zu verimpfen. Die Abimpfung ist erforderlich, da Bakterienwachstum auch ohne nachweisbar auffällige Veränderung des Filtrats stattfinden kann. Besonders muß man sich bei Serumfiltraten hüten, aus dem Mangel einer Trübung auf Keimfreiheit zu schließen. Gerade das unverdünnte Serum zeigt öfter trotz Bakterienwachstum keine merkliche Veränderung. Wie wir feststellen konnten, werden in unverdünntem Serum enthaltene Bakterien gelegentlich zur Agglutination gebracht, sinken zu Boden und rufen, auch wenn das Material im Brutschrank bei 37 ° C gehalten wird, bisweilen keine Trübung des Serums hervor. Nachdem wir später die Beobachtung gemacht hatten, daß durch tagelanges Aufbewahren von Serumfiltrat im Brutschrank eine Abschwächung des Virus beobachtet werden kann, sind wir in letzter Zeit von dieser Methode abgegangen und haben von den Filtraten direkt 6 ccm auf je drei Bouillonkölbchen (100 ccm) verimpft und bei 37 ° 4 Wochen im Brutschrank gehalten.

Täglich wurden die Kolben betrachtet und die Versuche mit den zur Verwendung gelangten Filtraten nur dann als einwandfrei angesehen, wenn die Kolben auch nach 4 Wochen kein Bakterienwachstum zeigten.

Technik der Verimpfung des Virus und Auswahl der Tiere.

Was die Dosis betrifft, so haben wir schon nach Injektion von 0,25 ccm Serumfiltrat eine Krankheit erzeugen können. Die Amerikaner haben fast in allen Fällen mit 1,0—2,0 ccm unverdünnten und unfiltrierten Blutes schwere Krankheitszustände hervorrufen können. Doch genügten zur Infektion Bruchteile eines Kubikzentimeters. Wir haben anfangs, um sicher zu gehen, stets 10 ccm des verdünnten oder unverdünnten Filtrats eingespritzt und sind in der Folge im allgemeinen der Gleichmäßigkeit wegen bei dieser Dosis geblieben.

Die Verimpfung des Materials kann subkutan, intramuskulär, intraperitoneal, intravenös, intrapulmonal oder intrathorakal geschehen. Einen wesentlichen unterschiedlichen Einfluß auf die Schwere und den Verlauf der Krankheit, je nach der gewählten Applikation, ist dabei von uns nicht beobachtet worden. Dagegen hat Wassermann bei der thorakalen Impfung einen schnelleren und schwereren Verlauf feststellen können.

Zwecks Einbringung des Materials in den Magen ohne vorherige Berührung der Schleimhäute der ersten Verdauungswege ist es ratsam, Gelatinekapseln von 1,0 ccm Inhalt mit der virushaltigen Flüssigkeit zu füllen, in eine zweite von 2,0 ccm Inhalt einzufügen und sofort nach der Füllung mit einer Schlundzange den Tieren in den Schlund zu schieben. Die Ferkel werden dabei von einem Diener zwischen den Beinen in aufrechter Stellung gehalten und das Maul durch einen Sperrhaken geöffnet. Nach jedesmaliger Einführung wird den Tieren Luft zum Schlucken gelassen. Es gelingt so ohne große Mühe, 10—12 Doppelkapseln hintereinander unversehrt in die Speiseröhre einzuführen.

Von größter Wichtigkeit ist die Beschaffung der Versuchstiere aus einer absolut einwandfreien Züchterei. Wir haben uns fast ausschließlich solcher Tiere bedient. Es kann in dieser Beziehung nicht genug zur Vorsicht gemahnt und vor dem Ankauf der Ferkel auf dem Markt gewarnt werden. Bei der großen Verbreitung und dem oft latenten Verlauf der Schweinepest ist es ja zu leicht möglich, daß unter den von den Händlern allerorts zusammengekauften und auf den Markt gebrachten Ferkeln bereits infizierte Tiere sich befinden. Wir waren auch in einzelnen Fällen gezwungen, Ferkel vom Markt zu kaufen; in einem Falle ist uns durch solche Tiere die Pest eingeschleppt worden. Will man Tiere zweifelhafter Herkunft in den Versuch nehmen, so sollte das nur immer erst nach einer Quarantäne von wenigstens 14 tägiger Dauer geschehen.

Ebenso wichtig wie die Bezugsquelle ist die Art der Unterbringung der Versuchstiere. Bei der großen Kontagiosität der Seuche ist die Durchführung größerer Versuchsreihen nur möglich, wenn eine absolut strenge Isolierung der Versuchstiere möglich ist. Ställe, in denen einmal schweinepestkranke Tiere gesessen haben, können erst nach geraumer Zeit und gründlicher Desinfektion wieder benutzt werden, wobei zu bedenken ist, daß das Virus Desinfektionsmitteln gegenüber ziemlich widerstandsfähig ist (siehe unten.) In der wärmeren Jahreszeit empfiehlt es sich, nur Lattenbuchten, die im Freien Aufstellung finden und nach jedem Gebrauch verbrannt werden können, zu verwenden, da sie eine möglichst naturgemäße Unterbringung der Tiere

gestatten. Am zweckmäßigsten dürfte von großen eisernen, auf vier hohen Füßen ruhenden Tierkäfigen, wie sie die Firma F. und M. Lautenschläger-Berlin liefert, Gebrauch zu machen sein. Sie gewährleisten eine strenge Isolierung und haben den großen Vorzug der Sterilisierbarkeit im Dampfdesinfektionsapparat. Käfige, in denen kranke Tiere gesessen hatten, sind von uns stets erst nach Desinfektion im strömenden Dampf wieder in Benutzung genommen.

Über das filtrierbare Virus der Schweinepest und seine biologischen Eigenschaften.

Wie bereits erwähnt, findet sich das Virus im Blut und in den Organen der schweinepestkranken Tiere. Eine Züchtung des Virus auf den gewöhnlichen und auch auf besonders hergestellten Nährböden ist uns bisher nicht gelungen. Alle diesbezüglichen Versuche sind fehlgeschlagen.

In einem Falle scheint eine Anreicherung des Virus in normalem Schweineserum stattgefunden zu haben, doch enthalten wir uns z. Z. noch eines bestimmten Urteils.

Auch berichtet Wassermann[17]), daß das Virus unter günstigen Verhältnissen in verdünntem Schweineblut auch außerhalb des Schweineorganismus sich vermehren zu können scheint. Auch Dorset und seinen Mitarbeitern ist es nicht gelungen, das Virus zu züchten.

Ebenso waren alle unsere Versuche, mit Hilfe des Mikroskops oder Ultramikroskops den fraglichen Erreger zu sehen, ohne Erfolg. Die Amerikaner wollen im Blut kranker Tiere kleine runde Körperchen, bisweilen mit amöboider Bewegung, an den Blutkörperchen gesehen haben; eine ursächliche Beziehung zu der Krankheit anzunehmen, lag ihnen jedoch fern. Derartige Gebilde sieht man ja auch bekanntlich in normalem Blut. Auch unsere Versuche mit Hilfe der Bordet-Gengouschen Komplementbindungsmethode Aufschlüsse über die Art des Erregers zu erhalten, schlugen fehl; im Gegensatz zu den Ergebnissen von Dedjulin war die Reaktion stets negativ.

Bezüglich der Ausscheidung des Virus aus dem Körper ließ sich bisher mit Sicherheit feststellen, daß es durch die Nieren mit dem Harn den Körper verläßt. Auch von Dorset ist in einem Fall die infektiöse Natur des Harns nachgewiesen worden.

Im Gegensatz zum Harn scheint eine regelmäßige Ausscheidung des Virus durch den Darm selbst bei dem Bestehen schwerer Veränderungen der Darmwand nicht stattzufinden, oder wenn sie stattfindet, eine schnelle Vernichtung oder Abschwächung des Virus vor sich zu gehen. Wenigstens haben wir in sechs Fällen bei Verimpfung filtrierten Darminhalts, der von schweinepestkranken, mit schweren diphtherischen Darmläsionen behafteten Schweinen stammte, eine Erkrankung der Impflinge nicht hervorrufen können.

Auch durch die Haut scheint eine Ausscheidung des Virus stattzufinden. Hautausschläge, sogenannte „Pocken", krustöse Veränderungen, makulo-papulöse Exantheme werden ja sehr häufig bei der Schweinepest beobachtet. Durch Einspritzung solcher krustöser Hautveränderungen ist es uns mehrfach gelungen, die Schweinepest bei Ferkeln zu erzeugen. In der Beurteilung dieser Versuche sind wir jedoch sehr vorsichtig, denn es liegt in der Natur des Experiments, daß es nicht mit Sicherheit beweist, ob auch das Virus in der Tat durch die Haut ausgeschieden wird.

Die Aufnahme des Virus geschieht wohl hauptsächlich per os mit der Nahrung. Die Möglichkeit einer Infektion durch dieselbe ist jedenfalls von uns mit Sicherheit nachgewiesen. Einmalige Fütterung von infizierten Futtermitteln (Kartoffeln und Schrot + 10 ccm virulenten Organsaft) genügte, die Krankheit hervorzurufen. Ebenso gelang es bei direkter Einführung des Virus mittels Gelatinekapseln in die Speiseröhre auf nüchternen Magen eine Erkrankung an Schweinepest zu erzeugen. Ob bei der Übertragung der Seuche auch noch Zwischenträger — Läuse usw. — eine Rolle spielen, ist nicht erwiesen. Von Dorset ist bereits die Möglichkeit einer solchen Übertragung in Erwägung gezogen worden. Im Boardslaboratorium (England) sind Übertragungsversuche mit Schweineläusen angestellt worden, jedoch mit negativem Erfolg.

Für die Praxis dürfte wohl die Infektion per os bei der Ausbreitung der Seuche eine ausschlaggebende Rolle spielen. Wir haben ja nachgewiesen, daß der Urin das krankmachende Virus enthält, und es ist eine bekannte Tatsache, daß Schweine, besonders junge Ferkel, mit einer gewissen Vorliebe ihren Urin in die Futtertröge entleeren.

Die Faeces scheinen im Vergleich mit dem Urin nach unsern bisherigen Versuchen eine mehr untergeordnete Rolle zu spielen. Inwieweit bei dieser Infektion per os die Schleimhäute, z. B. der der Nase, die ja auch beim Fressen der Tiere in innige Berührung mit dem verseuchten Futter tritt, mitbeteiligt sind, muß durch weitere Untersuchungen entschieden werden, ebenso die Frage, ob durch die Schleimhäute des Respirationstraktus und durch die Haut eine Infektion stattfinden kann.

Da das Virus längere Zeit außerhalb des Tierkörpers virulent bleibt, so ist mit Rücksicht auf die geringe Menge Virus, die zur Infektion unter Umständen ausreicht, diese Art der Weiterverbreitung durch infiziertes Futter oder auch Personen, die an Schuhen oder Kleidern mit Virus infiziert sind, sehr wohl denkbar; in erster Linie darf wohl für die Ausbreitung der Schweinepest eine Kontaktinfektion angenommen werden, womit die Erfahrungen in der Praxis übereinstimmen, nach welchen der Handel mit Schweinen in den meisten Fällen die Verbreitung der Seuche vermittelt. Ferkel zu schweinepestkranken Tieren hinzugesetzt, erkranken so gut wie regelmäßig. In unserm Seuchenstall gehen nichtschutzgeimpfte Tiere so gut wie regelmäßig nach 14 Tagen an Schweinepest zugrunde.

Eine sehr wichtige Frage ist die nach der Dauer des Aufenthalts des Virus im Körper. Wir können bezüglich dieser Frage zwei Beobachtungen mitteilen, erstens, daß Ferkel, welche die Schweinepest überstanden haben und in das Stadium des Kümmerns geraten sind, in diesem Stadium das Virus noch in infektiösem Zustande im Körper enthalten können, auch wenn außer Marasmus keine offensichtlichen pathologisch-anatomischen Veränderungen bestehen. Im Gegensatz dazu gibt es Ferkel, welche unter gleichen Bedingungen ausgesprochene Kümmerer sind und das Virus im Blut und den Organen in ansteckungsfähigem Zustande nicht mehr beherbergen.

Eine gleichwichtige Frage ist die nach der Haltbarkeit des Virus außerhalb des tierischen Körpers. Nach den in der Praxis gesammelten Erfahrungen scheint sie eine langdauernde zu sein. Es ließen sich über diesen Punkt bisher eingehende Beobachtungen nicht anstellen, immerhin ist aber zu berichten, daß durch monatelanges Aufbewahren virushaltiger Flüssigkeit bei Zimmer- oder Eisschranktemperatur das Virus nicht abgetötet worden ist.

Was das Verhalten des Virus physikalischen Einfüssen gegenüber anlangt, so hat sich in einigen Fällen feststellen lassen, daß durch zweistündiges Erhitzen auf 58° virushaltiges Serum nicht unwirksam gemacht worden ist. Zwei Stunden lang auf 65° erhitztes Blut, das vorher bei 37° eingetrocknet war, wirkte krankmachend. Einstündige Erhitzung flüssigen Materials auf 78° tötete ab, desgleichen halbstündige Erhitzung trockenen Bluts auf 150°, einstündige auf 100°, 76° und 72°. In weiteren Versuchen ist festgestellt, daß virushaltiges Serumfiltrat nach 24stündiger Erwärmung auf 60° und 55° und nach 16stündiger Erwärmung auf 60° seine krankmachende Wirkung verliert, nach 24stündigem Aufenthalt bei 45° und bisweilen 46,5° aber noch vollvirulent bleibt.

Diese Feststellungen sind auch von praktischer Bedeutung insofern, als damit die Möglichkeit nachgewiesen ist, infizierten Dünger durch entsprechende Packung, bei der längere Zeit hindurch die entsprechenden Temperaturgrade erzeugt werden, unschädlich zu machen. Auch für die Fleischbeschau sind diese Tatsachen von Wichtigkeit, denn sie zeigen, daß genügend erhitztes resp. gekochtes Fleisch kranker Tiere den Krankheitsstoff nicht verbreiten kann.

Gegen Kälte ist das Virus sehr widerstandsfähig. Wenigstens war Blut, das 24 Stunden im Gefrierapparat bei — 18° aufbewahrt und dann 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur gehalten war, vollvirulent.

Über die Wirkung des zerstreuten Tageslichts und direkten Sonnenlichts fehlen noch einschlägige Untersuchungen.

Gegen Austrocknung scheint der Ansteckungsstoff verhältnismäßig resistent zu sein. Blut und Serum, das 3 Tage in einer Glasschale bis zur Gewichtskonstanz angetrocknet war, erwies sich als infektionsfähig.

Um den Einfluß der Fäulnis auf das Virus zu erforschen, sind Ferkel mit dem filtrierten Saft 28, 14 und 8 Tage alter vergrabener verfaulter Organe von schweinepestkranken Ferkeln, deren Blut nach der Schlachtung der Tiere höchst virulent war, von uns geimpft worden, ohne daß eine Krankheit aufgetreten wäre. Die mit dem faulen Material geimpften Ferkel wurden drei Wochen nach der Injektion geschlachtet und zeigten völlig normalen Befund.

In einem anderen Versuch wirkte die Verimpfung unfiltrierten Materials (Blut), das 12 Tage im Eisschrank aufbewahrt und faulig übelriechend geworden war, bei subkutaner Injektion nicht krankmachend, während dasselbe gleichalterige mit Karbolglyzerin (0,5 %) versetzte, nicht faulig gewordene, in derselben Dosis verimpfte Material typische Schweinepest hervorrief. Auch diese Beobachtungen dürften eine gewisse praktische Bedeutung beanspruchen.

Bei der Wichtigkeit, welche die Frage der Resistenz des Virus gegenüber chemischen Agentien für die praktische Seuchentilgung und die Gesetzgebung hat, sind von uns eine große Reihe von Versuchen angestellt worden, die aber noch nicht zum Abschluß gelangt sind. Es wurden bis jetzt geprüft Lösungen von Karbolsäure, Sublimat, Formalin, Antiformin, Wittol, Jodjodkalium, Wasserstoffsuperoxyd, Harnstoff, Glyzerin, taurocholsaures Natron, Chloroform, Ozon.

Bezüglich der Technik ist zu erwähnen, daß 10 ccm Serumfiltrat mit gleichen Teilen der wässerigen Lösung des betreffenden Desinfektionsmittels versetzt wurde und daß die Mischung, die also

dann das Desinfektionsmittel im Vergleich zu der zugesetzten Lösung in halber Konzentration enthielt, verschieden lange Zeit bei Zimmer- oder Eisschranktemperatur gehalten wurde. Die Mischung wurde in weiten Reagenzgläsern vorgenommen. Um eine gründliche Durchmischung zu erzielen und zu verhüten, daß etwa an den Wandungen der Gläser haftendes Material mit dem Desinficiens nicht in Berührung kam, wurde der Inhalt des Röhrchens nach Zusatz des Desinfektionsmittels in ein anderes Röhrchen umgegossen. Für die Beurteilung der Wirksamkeit der geprüften Mittel ist nun zu beachten, daß fast sämtliche Desinfektionsmittel in eiweißhaltigen Flüssigkeiten erheblich schlechter wirken als in wässerigen. Es ist also aus den Versuchen nicht mit Sicherheit auf die absolute Resistenz des Virus gegen diese Mittel zu schließen. Es liegt aber in der Natur der Sache, daß zunächst nur mit eiweißhaltigem Material gearbeitet werden konnte, was ja gerade auch für die Desinfektion in der Praxis häufig in Betracht kommt. Gleiche Versuche mit Urin kranker Tiere — der einzigen nicht eiweißhaltigen Flüssigkeit — in dem ja auch das Virus von uns nachgewiesen ist und der bei der Verbreitung der Seuche wohl die Hauptrolle spielt, sind noch im Gange. Die Einspritzung erfolgte stets intramuskulär. Die bisherigen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Karbol.

0,5 $^0/_0$ige Lösungen töteten nach 4 und 8 Tagen nicht ab. — Nach 12 Tagen war in einem Versuche Abtötung beobachtet. — 8 bzw. 10 Wochen langes Aufbewahren virulenten Serums unter 0,5 $^0/_0$igem Karbol hatte dem Serum die krankmachende Wirkung genommen.

1,0 $^0/_0$iges Karbol hatte nach 3 und 4 Tagen das Virus nicht abgetötet.

2,5 $^0/_0$iges Karbol hatte in 2 und 13 Tagen virushaltiges Serum so geschädigt, daß es nicht mehr krank machte, in einem anderen Falle jedoch nach 3 Tagen die Virulenz nicht aufgehoben.

3,3 $^0/_0$iges Karbol hatte nach 8 Tagen das Virus im Blut nicht abgetötet.

Nach Wassermann können $^1/_2$- und 1 $^0/_0$ige Karbollösungen tagelang auf das Virus einwirken, ohne daß es mit Sicherheit zerstört wird.

Sublimat.

0,3 $^0/_{00}$ Sublimatlösungen waren nach achttägigem Aufenthalt im Eisschrank virulent.

0,5 $^0/_{00}$ hatte nach viertägiger Einwirkung bei Zimmertemperatur das Virus im Blute nicht abgetötet.

1,0 $^0/_{00}$ Sublimat-Serum-Mischung hatte nach 3 Tagen in einem Falle eine Abschwächung, keine Abtötung hervorgerufen, in einem anderen Falle hatte das Serum seine Virulenz ungeschwächt behalten.

Chloroform

wirkte nach 24stündiger Einwirkung auf Serumfiltrat nicht abtötend, wohl aber nach 3 und 12 Tage langer Einwirkung.

Formalin

hatte in 2,5 $^0/_0$iger Lösung nach 15 Tagen im Eisschrank virulentes Serum unwirksam gemacht.

Taurocholsaures Natron.

Defibriniertes Blut mit taurocholsaurem Natron (10 %) versetzt und 4 Tage im Eisschranke aufbewahrt, erzeugte bei der Verimpfung eine schwere Form der Schweinepest.

Harnstoff.

Serumfiltrat mit Harnstofflösung (20 %) versetzt und einen Monat lang im Eisschranke aufbewahrt, zeigte sich vollvirulent.

Jodjodkalium.

Eine Mischung von virulentem Serum und Jodjodkalilösung (0,25 %), welche ihrerseits aus 1,8 % Jod und 4,5 % Jodkalium bestand, zwei Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, rief keine Erkrankung an Schweinepest hervor.

Glyzerin.

Virulentes Serum mit Glyzerin (33 %) versetzt und einen Monat im Eisschrank aufbewahrt, erwies sich als vollvirulent.

Ozon.

Die Ozonierung virushaltigen defibrinierten Blutes im Siemensschen Apparat war ohne jeden schädigenden Einfluß auf das Virus.

Wasserstoffsuperoxyd.

Eine im Laboratorium vorhandene Wasserstoffsuperoxydlösung, deren Zusammensetzung nicht näher bekannt war, im Verhältnis von 1:2 zum Serumfiltrat hinzugesetzt, hatte nach zweistündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur die krankmachende Wirkung des Serums aufgehoben. In einem anderen Versuch war durch Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd, das aus 1,0 Perhydrol und 9,0 Aq. dest. hergestellt war, zum Serum (6 %) und zweistündiges Aufbewahren bei Zimmerwärme die krankmachende Wirkung des Serums nicht aufgehoben.

Wittol,

ein neues Desinfektionsmittel, das eine Lösung von freier Kieselfluorwasserstoffsäure und kieselfluorwasserstoffsauren Salzen darstellt, hatte in 2,5 %iger Lösung in 30 Minuten virushaltiges Serum unwirksam gemacht. Die Mischung hatte jedoch bei den Versuchstieren eine umfangreiche Nekrose an der Injektionsstelle hervorgerufen.

Es sind diese Versuche daher vorsichtig zu beurteilen, denn es ist nicht ausgeschlossen, daß die an Ort und Stelle durch das Wittol hervorgerufene Entzündung das Virus im Tierkörper abgeschwächt hat.

Antiformin.

Das Antiformin ist ein patentiertes Desinfektionsmittel*), das bisher wegen seiner schleimlösenden Eigenschaft wohl ausschließlich im Brauereigewerbe Verwendung gefunden hat. Es besteht aus $^1/_2$—1 Teil Alkalihydrat und 1 Teil Alkalihypochlorid (Eau de Javelle), hat aber vor ihm wegen seiner Haltbarkeit und intensiveren Wirkung große Vorzüge. Es hat die von Uhlenhuth zuerst erkannte interessante Eigenschaft, alle möglichen Bakterien

*) Zu beziehen durch Herrn Osk. Kühn, Berlin, Dircksenstraße 20.

— Typhus, Pest, Ruhr, Coli, Diphtherie, Paratyphus, Schweinepest, Rotlauf, Rotz, Milzbrand, Bakterien, Streptokokken, Staphylokokken, u. a. auch Protozoen wie Spirochäten und Trypanosomen — in wässerigen Lösungen bei Verdünnungen von 2—5 % in kurzer Zeit glatt und restlos wie Zucker in Wasser aufzulösen. Diese auflösende Eigenschaft, die auf einer glücklichen Kombination von Chlor und Alkali beruht, wird durch leichtes Erwärmen wesentlich beschleunigt. Eine interessante Ausnahme machen die mit einer Fett-Wachshülle gepanzerten Tuberkelbazillen und die übrigen säurefesten Bakterien. Im Gegensatz zu den meisten anderen geprüften chemischen Mitteln hat das Antiformin den großen Vorzug, in eiweißhaltigen Flüssigkeiten keine Ausfällungen hervorzurufen.

Die in größerer Zahl vorgenommenen Versuche ergaben, daß Serumfiltrate nach 24 stündiger Einwirkung von 1 %igem Antiformin und einstündiger Einwirkung von 2,5 %igem Antiformin noch imstande sind, Schweinepest bei der Verimpfung auf gesunde Ferkel hervorzurufen, während nach zweistündiger Einwirkung derselben Lösung ihre Virulenz aufgehoben wird. In 5 %iger Lösung wird das Virus nach 1 Stunde bereits abgetötet. In virushaltigem Urin vernichtete Antiformin (2 %) das Virus noch nicht nach ca. 10 Minuten*).

In defibriniertem Blut war nach 20 Minuten und zwei Stunden langer Einwirkung von 2,5 %igem Antiformin das Virus noch nicht abgetötet worden. Es kann das daran liegen, daß durch defibriniertes Blut im Vergleich zum Serum das Chlor in stärkerem Maße gebunden wird, oder daß ein Teil des Virus in Folge der durch Zusatz des Antiformins erzeugten gelatinösen Beschaffenheit des Blutes der vernichtenden Wirkung des Desinficiens entgeht.

Aus den angestellten Versuchen geht mit Deutlichkeit hervor, daß das Schweinepestvirus chemischen Agentien gegenüber wenigstens in eiweißhaltigen Lösungen scheinbar eine große Widerstandsfähigkeit besitzt.

Die Desinfektionsversuche mit Urin sind noch im Gange. Sie werden über die absolute Resistenz des Virus Aufschluß geben.

Immunität und Immunisierungen.

Natürliche Immunität.

Die Schweinepest ist eine höchst ansteckende Krankheit, welche ausschließlich Schweine befällt.

Kleinere Laboratoriumstiere und die gewöhnlichen Haustiere verhalten sich gegen das Schweinepestvirus refraktär. Es wurden weiße und graue Mäuse, zahme und wilde Ratten subkutan geimpft und gefüttert, Meerschweinchen und Kaninchen subkutan und intravenös, Tauben, Gänse und Hühner intravenös und intramuskulär, Katzen, Hunde, Affen, Schafe subkutan, Ziegen, Rinder, Esel und Pferde intravenös und intramuskulär mit großen Dosen höchst infektiösen Materiales geimpft, ohne daß sich bei einem dieser Tiere die Krankheit hätte erzeugen lassen.

---

*) Auch durch 2,5 %iges Karbol wird das Virus im Urin nicht nach 10 Minuten abgetötet.

Eine natürliche Immunität bei Schweinen haben wir bei unseren zahlreichen Versuchen nicht beobachtet, sie scheint also, wenn sie überhaupt vorkommt, zu den seltenen Ausnahmen zu gehören.

Alle Schweine scheinen ohne Unterschied der Rasse für diese Seuche gleich empfänglich zu sein, jedoch sind junge Ferkel empfänglicher als ausgewachsene Tiere. Eine Vererbung der durch Überstehen der natürlichen Krankheit erworbenen hochgradigen Immunität auf die Nachkommenschaft scheint nicht stattzufinden.

Der letzteren Frage sind wir experimentell näher getreten. Drei Sauen, welche als Ferkel die Schweinepest überstanden und später durch wiederholt vorgenommene Injektionen mit großen Mengen virulenten Materials hoch immunisiert waren, wurden von einem gleichalterigen ebenso vorbehandelten Eber gedeckt. Sie warfen je 7 und 4 Ferkel, von denen zwei bald an interkurrenten Krankheiten eingingen. Die übrigen machten einen vollkommen gesunden Eindruck und gediehen in den ersten 3 Wochen gut. Sie wurden mit den Muttersauen in einem Stall gehalten, in dem früher kranke Tiere gesessen hatten. Am Ende der 4. Woche wurden 2 Ferkel zugleich mit 2 älteren Kontrollferkeln mit virulentem Material (10 ccm Serumfiltrat) geimpft, gleichwohl aber bei der Mutter gelassen. Um diese Zeit fingen die meisten Ferkel an, ihr Aussehen zu verändern. Sie bekamen eine schmutziggraue Hautfarbe, Durchfall, und blieben in der Entwickelung zurück. In der 6. Woche verendeten 3 ungeimpfte und 1 von den geimpften Ferkeln. Die Obduktion ergab akute katarrhalische Entzündung der ganzen Darmschleimhaut und des Lungengewebes in den Spitzen- und Herzlappen ohne besonderen bakteriellen Befund (kein Pestifer und Suisepticus). Zwei ungeimpfte Ferkel und das zweite geimpfte wurden in der Agonie geschlachtet und zeigten denselben Befund. Die beiden noch übrigen ungeimpften hatten eine Zeitlang ein schlechtes Aussehen, sonst aber keine Krankheitssymptome gezeigt und wurden 12 Wochen alt, der natürlichen Infektion im Seuchenstall ausgesetzt und erkrankten. Mit dem Serumfiltrat von je einem in der Agonie geschlachteten Ferkel wurde je ein Ferkel geimpft. Beide Ferkel erkrankten nicht. Es könnte demnach fraglich erscheinen, ob es sich um Schweinepest gehandelt hat. Doch glauben wir nach dem zeitlichen Auftreten, dem klinischen Verlauf und dem pathologischen Befund, da andere schädliche Einwirkungen nicht stattgefunden hatten, an der Diagnose festhalten zu müssen.

Jedenfalls war eine Immunität gegen Schweinepest von den immunen Eltern auf sie nicht übergegangen, wie die Erkrankung der zwei Ferkel im Seuchenstall beweisen.

Von den Amerikanern ist zuerst die wichtige Tatsache festgestellt worden, daß bei der Schweinepest nach Überstehen der natürlichen oder künstlich mit filtrierbarem Virus hervorgerufenen Krankheit Immunität gegen natürliche Ansteckung oder künstliche Infektion eintritt. Es ist auffällig, daß in Deutschland darüber bisher aus der Praxis keine sicher verwertbaren Erfahrungstatsachen in der Literatur vorlagen. Die Angaben in der Literatur trennen nicht die Schweineseuche von der Schweinepest ab, so daß nicht daraus hervorgeht, ob gegebenenfalls Seuche oder Pest vorgelegen hat. Preiss[32]) äußert sich in seinem auf dem VIII. internationalen tierärztlichen Kongreß in Budapest 1905 gehaltenen Vortage bezüglich der Schweineseuche, die nach ihm stets mit der Pest zusammen auftritt:

„Soweit mir die Literaturangaben bekannt und nach meinen eigenen Erfahrungen scheint ein Schutz nicht bewiesen zu sein, ja ich glaube, es lassen sich eher Beweise gegen die

Existenz eines Schutzes erbringen." Nach Joest ist es nicht mit Sicherheit erwiesen, daß das Überstehen der natürlichen Schweinepesterkrankung eine längere Immunität gegenüber einer erneuten Infektion mit dem Bac. suipestifer verleiht. Koske[6]) schreibt: „Eine natürliche Immunität gegen die Schweinepest ist bisher mit Sicherheit nicht nachgewiesen worden, jedoch scheint sich aus den Beobachtungen der letzten 12 Jahre zu ergeben, daß sich ein gewisser Grad von Resistenz unter den jetzigen Schweinebeständen bereits entwickelt hat, da die Krankheit im Vergleich zu den zuerst aufgetretenen Seuchenzügen sich durch einen milderen Verlauf kennzeichnet. Eine ähnliche Abschwächung beobachtet man auch bei anderen Epidemien. Ob ein Überstehen der Schweinepest natürlicher Infektion einen Schutz vor einer neuen Ansteckung zu gewähren imstande ist, ist bisher nicht bewiesen."

Hutyra und Marek[31]) sagen in ihrem Lehrbuch: „Wenngleich die Schweine aller Rassen und jeden Alters an der Schweinepest erkranken können, sind dennoch einerseits die veredelten, andererseits die jungen Schweine überhaupt bedeutend empfänglicher für die Erkrankung. Der Einfluß des Alters macht sich besonders in schon seit längerer Zeit verseuchten Gegenden geltend. So sind in **Ungarn** im Laufe der auf den Ausbruch der Seuche folgenden ersten Jahre die Schweine ohne Rücksicht auf ihr Alter erkrankt, während sich später die Krankheit immer mehr nur auf die Ferkel beschränkt hat. Die größere Widerstandsfähigkeit der älteren Tiere in verseuchten Gegenden ist aller Wahrscheinlichkeit nach die Folge einer bereits im jüngeren Alter überstandenen milderen Erkrankung."

Wie wir in Erfahrung gebracht haben, stellen die Schweinezüchter in Ungarn wenn möglich nur durchseuchte Tiere ein oder infizieren sie in der Jugend. Durchseuchte Tiere sollen hier um 50% höher im Preise als nicht durchseuchte stehen.

Auch in Amerika war man über das Vorhandensein einer natürlichen und künstlichen Immunität bei der Schweinepest schon lange vollständig im klaren. Dorset gibt an, daß die Farmer für Tiere, welche die Seuche überstanden haben, einen höheren Preis anzusetzen pflegen als für nicht durchseuchte. Diese Anschauung von der Existenz einer erworbenen Immunität wird in folgenden Sätzen zum Ausdruck gebracht:

„Hogs that have recovered from natural attacks of hog cholera are immune from subsequent attacks. This fact is quite generally known among hog raisers and causes the average farmer to place a higher value opon those so-called „cholera proof" hogs than upon nonimmunes. During the course of experimental work in the past few years we have had the opportunity of observing the course of a large number of separate outbreaks of hog cholera, and have tested the immunity of a number of animals that recovered from these natural attacks by means of field exposure and by injections of diseased blood, but have never seen one of them succumb to a second attack. Immunity acquired in this way seems to be remarkably high in degree and very permanent. The same thing has been found to be true of hogs which have recovered from the disease produced by subcutaneous injections of hog cholera

blood, such animals being found immune from hog cholera when exposed to the disease in a natural way and also when injected subcutaneously with blood from diseased animals."

Auch durch unsere Untersuchungen ist zur Evidenz erwiesen worden, daß nach dem Überstehen der natürlichen oder nach Impfung mit infektiösem Virusfiltrat erzeugten Schweinepest eine hochgradige Immunität gegen die natürliche wie künstliche Ansteckung auftritt. Unsere Beobachtungen stimmen mit denjenigen Dorsets überein, der bei Tieren, welche die Krankheit überstanden hatten, nach nahezu einem Jahre durch Nachimpfung mit infektiösem Blut keine Krankheitserscheinungen mehr erzeugen konnte. Jedenfalls ist es sicher, daß es eine erworbene Immunität gibt. Diese Tatsache ist von größter Bedeutung, denn mit dem Nachweis derselben war die Möglichkeit gegeben, auch künstlich eine Immunität zu erzeugen. Nach Feststellung dieser Tatsache sind dann auch, wie bereits erwähnt, sofort sowohl von den amerikanischen Forschern (Dorset, Boxmeyer) als auch von uns und zwar unabhängig von letzteren umfangreiche Immunisierungsversuche in Angriff genommen.

In Deutschland war bis dahin von einer wirksamen Immunisierungsmethode gegen die Schweinepest nichts bekannt. Begreiflicherweise hatten die vor Auffindung des filtrierbaren Virus der Schweinepest angestellten zahlreichen Immunisierungsversuche ihren Ausgang stets von dem bisher als Erreger angesehenen B. suipestifer genommen und hatten so zu brauchbaren Resultaten nicht führen können. Durch subkutane oder intravenöse Inokulation oder durch Fütterung lebender vollvirulenter Bakterien in kleinen Dosen gelang es wohl eine Widerstandsfähigkeit gegenüber tödlichen Dosen der Bakterien, aber keinen Schutz der natürlichen Ansteckung gegenüber zu verleihen (Salmon, Smith[38]). Dasselbe war bei Verwendung abgeschwächter Kulturen oder der Stoffwechselprodukte der Schweinepestbakterien, wie sie besonders von De Schweinitz angewendet wurden, der Fall.

A. Aktive Immunisierung.

Unsere ersten Versuche erstreckten sich gleich denen der Amerikaner auf die Erzeugung einer aktiven Immunität. Es wurde nach Analogie von Immunisierungen bei anderen Krankheiten versucht, auf physikalischem und chemischem Wege aus virushaltigen Flüssigkeiten ein geeignetes Vaccin herzustellen.

Abschwächung durch physikalische Eingriffe. — Erhitzen und Eintrocknen.

In unsern ersten Versuchen wurde flüssiges Material — filtrierter Organsaft und filtriertes Serum — 1 und 2 Stunden lang auf 58° erhitzt und drei Sauen und acht Ferkeln in die Blutbahn oder unter die Haut in gewissen Zwischenräumen eingespritzt. Sämtliche Tiere erkrankten darnach und zwar die intravenös geimpften großen Sauen schon einige Tage nach der Injektion. Bei acht Ferkeln, die dreimal alle 8 Tage 10 ccm subkutan erhielten, traten erst in der zweiten Woche nach der letzten Impfung die ersten Zeichen der Infektion auf, die sich dann schnell zu einem schweren Krankheitsbilde der Schweinepest entwickelten. Ein Ferkel überstand den akuten Anfall, erholte sich zunächst, kam aber dann in das chronische Stadium des Kümmerns. Vier Ferkel

wurden zwecks Gewinnung möglichst virulenten Impfmaterials für Immunisierungszwecke getötet, drei Ferkel verendeten spontan.

Es zeigte sich, daß (filtriertes) Material schweinepestkranker Ferkel nach zweistündiger Erhitzung in flüssigem Zustande auf 58° die Virulenz nicht einbüßt und daher zur Immunisierung ungeeignet ist.

Es war denkbar, daß bei Variation der Temperaturgrade und der Einwirkungsdauer bessere Resultate erzielt werden konnten. Es wurde daher virulentes Serumfiltrat in Reagenzröhrchen von 20 ccm 24 und 16 Stunden lang einer Temperatur von 60°, 24 Stunden einer Temperatur von 55, 46,5, 45° im Brutschrank ausgesetzt und in einmaligen Dosen von 10 ccm Ferkeln intramuskulär eingespritzt. Das 24 Stunden bei 45° und 46,5° erwärmte Serum rief in einigen Fällen typische Pest hervor, in anderen allerdings nicht, während das auf 55 und 66° erhitzte Material keine krankmachende Wirkung ausübte, aber auch keine Immunität verlieh. Denn diese Tiere erkrankten, wenn sie nach 3 Wochen der natürlichen Infektion ausgesetzt wurden.

Diese Mißerfolge führten dazu, anstatt des flüssigen Materials getrocknetes Blut und Serum zu verwenden und auf das in getrocknetem Substrat befindliche Virus verschiedene Temperaturgrade einwirken zu lassen. Das Blut oder Serum wurde in dünner Schicht in Glasschalen ausgegossen, die 24 Stunden bei 37° gehalten wurden, darauf im Achatmörser zu einem feinen Pulver verrieben und dann nach der Löfflerschen Methode im Exsikator bis zur Gewichtskonstanz eingetrocknet, was durchschnittlich in 3 Tagen erreicht wurde. Zum Zwecke der Erhitzung wurde das vollkommen trockene Pulver in ganz dünner Schicht auf Glasschalen gebracht und mit diesen den betreffenden Temperaturen im Brutschrank ausgesetzt. Das trocken erhitzte Blut oder Serum wurde vor der Einspritzung mit der 10—20 fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung versetzt, mehrere Stunden im Schüttelapparat bei Zimmertemperatur geschüttelt und durch ein steriles Gazefilter filtriert. Letzteres war erforderlich, um die Flüssigkeit von ungelösten Teilen, welche sich stets in geringer Menge vorfanden, zu befreien. Sie wurde dann subkutan, intramuskulär oder intravenös eingespritzt. Die letztere Applikationsweise haben wir bei Verwendung von getrocknetem Blut vorgezogen, da wir bei subkutaner und intramuskulärer Einspritzung mitunter Abszeßbildung beobachteten.

37° C.

Um in Erfahrung zu bringen, wie weit die Eintrocknung und Erwärung auf 37° an sich das Virus zu beeinflussen vermochte, wurden Ferkel mit bei 37° getrocknetem, aber nicht weiter erhitztem Material vorbehandelt.

Unser erster Versuch war überraschend günstig. Zwei Ferkel bekamen Blut, das 24 Stunden bei 37° angetrocknet, verrieben und in physiologischer Kochsalzlösung (1 : 10) aufgelöst war, dreimal in Zwischenräumen von 8 Tagen in Dosen von 1,0 und 2,0 g, die etwa 10 bzw. 20 ccm flüssigem Blut entsprachen, subkutan eingespritzt. Die Tiere erkrankten nicht und wurden 8 Tage nach der letzten Impfung zugleich mit einem Kontrollferkel mit 20 ccm virulenten Materials nachgeimpft. Während das Kontrolltier an typischer Schweinepest erkrankte und 3 Wochen nach der Impfung in extremis getötet wurde (Diphtherie in Blind- und Grimmdarm), blieben die vorbehandelten Tiere vollkommen munter und entwickelten sich tadellos. Sie

wurden dann zusammen mit schwerkranken Tieren in eine Bucht gesperrt, ohne daß Krankheitszeichen sich bemerkbar gemacht hätten. $1^1/_2$ Monate nach der ersten Impfung wurde das eine Tier geschlachtet. Es war vollkommen gesund. Das andere Tier wurde, um die Immunität höher zu treiben, wiederholt intravenös mit virulentem Material geimpft, ohne jede äußerliche wahrnehmbare Reaktion.

In diesen beiden Fällen haben wir also eine hochgradige Immunität beobachtet. Das Virus mußte durch das Verfahren so abgeschwächt sein, daß es nicht mehr krankmachend, wohl aber noch immunisierend wirkte. Die Annahme, daß die Tiere von Haus aus immun waren, halten wir für ausgeschlossen, da sonst eine angeborene Immunität bei unseren weiteren zahlreichen Versuchen und auch von anderer Seite nie beobachtet worden ist.

Der Versuch wurde an 2 Ferkeln mit anderem Blutmaterial wiederholt. Gleichzeitig wurde ebenso behandeltes, filtriertes, keimfreies getrocknetes Serum eines anderen Tieres dreimal weiteren 2 Ferkeln eingespritzt. Die 4 Ferkel wurden in einer Bucht gehalten. Die mit Serum geimpften Tiere erkrankten bzw. verendeten an schwerer Pest.

Es war also in diesem Falle das Virus im Serum durch 24stündiges Eintrocknen bei 37° nicht abgetötet worden. Im Gegensatz hierzu zeigten die mit angetrocknetem Blut vorbehandelten Ferkel 5 Tage nach der letzten Injektion zwar die Symptome einer leichten Infektion: mangelnde Freßlust, vereinzelte Pocken, leichte Schwellung der Augen, blieben aber am Leben. Sie wurden 8 Tage nach der letzten Blutinjektion mit virulentem Serum zugleich mit einem gesunden Ferkel nachgeimpft. Letzteres erkrankte an typischer Pest, während die beiden anderen sich als immun erwiesen.

In einem dritten Versuch erhielten 3 Ferkel 1,0, 1,5, 2,0 g subkutan in Substanz von dem 24 Stunden bei 37° getrockneten und wieder aufgelösten Blut. Alle 3 Ferkel erkrankten nach der einmaligen Injektion an Schweinepest. Obwohl die Versuchsanordnung genau dieselbe wie beim ersten und zweiten Versuch war, so erwies sich der Impfstoff noch als vollvirulent.

In einem vierten Versuch wurde 8 Tage lang im Brutschrank bei 37° gehaltenes und wieder aufgelöstes Blut verwendet. Zwei Ferkel erhielten je 20 ccm dieser Lösung, welche 10 ccm flüssigen Blutes entsprach, intramuskulär eingespritzt. Sie erkrankten danach an der septikämischen Form der Schweinepest, die innerhalb 8 und 9 Tagen zum Tode führte.

Es ergab sich also aus den Versuchen, daß man durch einfaches Eintrocknen virulenten Materials bei 37° einen geeigneten Impfstoff nicht erhält. Wir gingen nun gleich zu höheren Temperaturen über, da bei den Versuchen mit dem flüssigen Material festgestellt war, daß zweistündiges Erwärmen auf 58° das Virus nicht abgetötet hatte, und ließen Temperaturen von 65°, 72°, 76°, 78°, 100°, 150° auf das zur Gewichtskonstanz eingetrocknete Blut einwirken.

65° C.

Zwei Stunden lang auf 65° erhitztes Blut in Dosen von 1,0 und 2,0 g intramuskulär verimpft, rief bei zwei Versuchsferkeln Schweinepest hervor. Das mit der größeren Dosis geimpfte verendete, das andere seuchte durch und war dann immun.

72 ° C.

Zwei Ferkel bekamen dreimal in achttägigen Intervallen je 1 g 1 Stunde lang auf 72 ° erhitztes Blut intravenös eingespritzt Diese Tiere zeigten während der Vorbehandlung keine Symptome einer Krankheit, nur blieben sie im Wachstum zurück. Eins von ihnen wurde 8 Tage nach Abschluß der Vorbehandlung geschlachtet und zeigte in beiden Lungen chronische Bronchitis und chronische Lungenentzündung, Veränderungen, die infolge von Erkältungseinflüssen entstanden sein mochten. Das andere Ferkel wurde der natürlichen Infektion ausgesetzt, erkrankte darnach schwer, hielt sich dann längere Zeit, verendete aber schließlich.

76,5 ° C.

Zwei Ferkel, welche in gleicher Weise mit demselben nur auf 76,5 ° erhitzten Material vorbehandelt waren, blieben wärend der Vorbehandlung vollkommen gesund, erkrankten jedoch an Schweinepest, nachdem sie 8 Tage nach der letzten Injektion der natürlichen Ansteckung ausgesetzt waren.

78 ° C.

Drei Ferkel (a, b, c) mit Blut nach einstündiger Erhitzung auf 78 ° in Dosen von 1,0, 1,5, 2,0 g geimpft, erkrankten sämtlich, nachdem sie der natürlichen Infektion ausgesetzt wurden, jedoch in verschiedenem Grade. Ferkel a zeigte einen multiplen krustigen Hautausschlag, Diphtherie der Backenschleimhaut, der Blind- und Grimmdarmschleimhaut, beiderseitige katarrhalische Lungenentzündung, akute fibrinös-mortifizierende Entzündung im Anhangslappen der rechten Lunge und in einzelnen Läppchen des Zwerchfellappens, sero-fibrinöse Herzbeutelentzündung, Blutungen in der Nierenrinde.

Ferkel b (1,5) hatte nur eine leichte Diphtherie des Blind-, Grimm- und Mastdarms, beiderseitige chronische katarrhalische Entzündung der Lungen.

Ferkel c zeigte bei der Obduktion völlig normalen Befund; war aber stark abgemagert (Kümmerer).

150 ° C.

Sechs Ferkel wurden mit demselben nach der Löfflerschen Methode zubereiteten Blut (halbstündiges Erhitzen des bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Blutes auf 150 °) geimpft. Je vier mit 1,0 g, je zwei mit 2,0 g. Sämtliche Ferkel blieben gesund und entwickelten sich in regelrechter Weise. Ein mit 2,0 g geimpftes Ferkel wurde 14 Tage nach der Impfung mit virulentem flüssigen Blut nachgeimpft und gleichzeitig der natürlichen Infektion ausgesetzt. Es erkrankte danach in der zweiten Woche und war nach weiteren 20 Tagen tot. Die übrigen Ferkel wurden noch zweimal mit demselben Material und der gleichen Dosis in achttägigen Intervallen subkutan und intravenös nachgeimpft und 14 Tage nach der letzten Injektion zum Teil mit virulentem Material nachgeimpft, zum Teil der natürlichen Ansteckung ausgesetzt. Sämtliche Tiere sind an Schweinepest erkrankt.

Die Versuche mit angetrocknetem, verschieden stark erhitzten Blut haben also bisher zu ermutigenden Ergebnissen nicht geführt. Ob bei Variation des Grades und der Dauer der Temperatureinwirkung auf das Impfmaterial brauchbare Resultate zu erzielen sind, erscheint fraglich. Jedenfalls darf angenommen werden, daß andere

von uns nicht geprüfte Temperaturgrade, welche eine Abtötung des Virus bewirken, das Material in einen immunisatorisch brauchbaren Impfstoff nicht verwandeln werden. Die Verhältnisse liegen hier ähnlich wie bei anderen Immunisierungen. Das Virus wird entweder abgetötet und ist dann für die Immunisierung ungeeignet oder es bleibt am Leben und wirkt dann unter Umständen noch krankmachend.

Einwirkung chemischer Mittel.

Ganz ähnliche Resultate ergaben die Versuche mit chemischen Mitteln, welche gelegentlich der Prüfung der Desinfektionsmittel von uns angestellt worden sind. Diejenigen Ferkel nämlich, welche nach Einspritzung der mit dem Desinfektionsmittel versetzten Flüssigkeit gesund geblieben waren, wurden ca. 3—4 Wochen nach der Injektion oder nach Wiederholung derselben zum Zweck der Immunitätsprüfung der natürlichen Ansteckung ausgesetzt. Bemerkt soll werden, daß in jedem Falle ursprünglich virulentes Material Verwendung gefunden hat, wie durch Kontrollimpfungen stets nachgewiesen worden ist.

Ferkel, welche 8 bzw. 10 Wochen altes, mit 0,5 % Karbol versetztes, früher virulentes Serum zweimal in Dosen von 20 und 30 ccm subkutan erhielten, erkrankten prompt, nachdem sie 3 Wochen nach der Injektion der natürlichen Ansteckung ausgesetzt waren, desgleichen ein Ferkel, welches 50 ccm desselben Materials bekommen hatte. Drei Ferkel, mit je 10 ccm Serumfiltrat, das durch Chloroform abgetötet war, gespritzt und nach 2 und 3 Wochen in den Seuchenstall gesetzt, verendeten an Schweinepest, desgleichen vier Ferkel, die mit je 10 ccm Serumfiltrat geimpft waren, in welchem das Virus durch Wasserstoffsuperoxydlösungen resp. Sublimat abgetötet war.

Sämtliche Tiere waren also für die natürliche Ansteckung voll empfänglich. Das Virus war also durch diese Eingriffe zu stark geschädigt, daß es eine Reaktion auf den Impfling im Sinne einer Antikörperbildung nicht mehr auszuüben imstande war. Es müssen daher weiterhin schonendere Methoden gesucht werden. Daß es solche gibt, scheint nicht ausgeschlossen, da wir mit Blut nach Antrocknung und Erwärmung in einigen Fällen Immunität hervorrufen konnten. Auch die amerikanischen Forscher haben mit virulentem Material, dem durch chemische Mittel die krankmachende Wirkung genommen war, eine aktive Immunität nicht erzielen können. Im Gegensatz dazu will Marxer[36]) ein Verfahren der aktiven Immunisierung gegen Schweinepest mit abgetötetem Virus gefunden haben. Als Abtötungsmittel benutzte er eine 10 %ige Harnstofflösung, mit der das virushaltige Serum oder Blut Tage lang bei einer Temperatur von 37° geschüttelt wurde. Zwei Tage lang geschütteltes Serum rief in Dosen von 1,0 ccm und 5,0 ccm keine Krankheit, aber auch keine Immunität hervor. Marxer nimmt aber an, daß sie, ohne selbst krank zu werden, infektionstüchtiges Virus ausgeschieden haben, da mehrere Ferkel, die in denselben Stall gesetzt wurden, in denen vorher die behandelten Tiere gesessen hatten, an Symptomen der Schweinepest erkrankten. Dreitägiges Schütteln defibrinierten Bluts wirkt noch krankmachend. Erst nach viertägigem Schütteln mit 10 %iger Harnstofflösung soll das Virus im defibrinierten Blut so unschädlich gemacht sein, daß es nicht mehr krankmachend wirkt, auch nicht mehr im infektionsfähigen Zustande ausgeschieden wird, wohl aber Immunität verleiht.

Jedenfalls blieben drei Ferkel, welche 10 ccm vorbehandeltes Virus bekommen hatten, gesund und waren gegen die natürliche Ansteckung geschützt. Desgleichen drei Ferkel, welche 5,0—5,5 ccm Virus erhalten hatten, dagegen gingen drei mit weniger als 5 ccm vorbehandelte Tiere nach der Überführung in den Seuchenstall an Pest ein. Außer Harnstoff hat Marxer mit Galaktose in ähnlicher Weise virushaltiges Blut vorbehandelt und damit ebenfalls aktiv immunisieren können.

Auch wir haben, von derselben Idee ausgehend, ein Ferkel mit Harnstoffvirus (s. oben) eingespritzt. Die Mischung wirkte aber, im Eisschrank aufbewahrt, selbst nach 4 Wochen noch krankmachend. Bei der Marxerschen Methode scheint also auch die Temperatur, das Schütteln, zusammen mit dem Harnstoff, das abtötende Moment darzustellen. Das geht aus Versuchen hervor, die wir nach Publikation der Marxerschen Untersuchungsergebnisse nach der von ihm gegebenen Vorschrift, jedoch mit der Abweichung anstellten, daß die Harnstoff-Virus-Mischung aus äußeren Gründen nicht geschüttelt werden konnte, sondern nur vier Tage bei 37° aufbewahrt wurde. Die mit dieser Mischung geimpften Ferkel erkrankten im Gegensatz zu dem Kontrollferkel nicht an Pest. Es hatte also das Virus die krankmachende Wirkung verloren, andererseits aber auch keine Immunität hervorgerufen, denn sämtliche geimpften Ferkel erkrankten an Schweinepest, nachdem sie der natürlichen Ansteckung ausgesetzt waren. Das stimmt auch mit unsern andern zahlreichen Versuchen überein, bei denen mit sicher abgetötetem Virus eine Immunität nicht erzeugt werden konnte.

Wir haben weiter schonende Methoden angewandt, indem wir Virus zu gleichen Teilen mit Rindergalle versetzten und 24—48 Stunden bei 37° hielten. Die Tiere erkrankten nicht, waren aber später auch nicht immun. Die Kontrollen sind typisch erkrankt.

In mehreren Versuchen haben wir Virus mit 1%igen Antiforminlösungen versetzt und bei 37° gehalten (24—48 Stunden). Diese Tiere erkrankten nicht, waren aber der natürlichen Infektion gegenüber in vielen Fällen immun, in anderen wieder nicht, trotzdem sie das gleiche Impfmaterial erhalten hatten. Mehrfache Injektion mit 5%igem Antiforminzusatz zu dem Virus machte nicht krank, aber auch nicht immun. Die Art der Abschwächung hängt also vom Zufall ab, wir haben sie nicht sicher in der Hand.

Auch die Bemühungen der Amerikaner, das Virus durch Trocknen, Hitze und chemische Einflüsse abzuschwächen, führten nicht zu befriedigenden Resultaten. Das ist auch nach ihrer Ansicht z. T. bedingt durch eine ungleiche Resistenz der verschiedenen Virusarten diesen Einflüssen gegenüber. Bald schien der Schutz, der durch künstlich abgeschwächtes Virus erzeugt wurde, komplett zu sein, bald wirkte das in gleicher Weise vorbehandelte Material tödlich, indem es keine Abschwächung zeigte, oder aber die Tiere zeigten zwar keine Krankheit nach der Einspritzung, erkrankten aber prompt, wenn sie der natürlichen Infektion ausgesetzt wurden. In Folge der sehr wenig ermutigenden Experimente haben Dorset und seine Mitarbeiter ihre Bemühungen in dieser Richtung aufgegeben.

Abschwächung des Virus im Immuntier.

In der Erwägung, daß das in den immunen Schweinekörper eingespritzte Virus in den ersten 24 Stunden unter dem Einfluß der Immunkörper nicht abgetötet, sondern nur abgeschwächt würde und so immu-

nisierende Eigenschaften entfalten könnte, waren von uns Immunschweine mit großen Virusdosen intravenös geimpft und nach 24 Stunden zur Ader gelassen worden. Es wäre das eine neue Methode, die bisher unseres Wissens noch nicht angewandt ist. Das Blutserum zeigte aber keine aktiv immunisierende noch auch krankmachende Eigenschaften. Das Virus muß also im immunen Schweinekörper sehr schnell — jedenfalls innerhalb 24 Stunden — paralysiert werden.

Zu denselben Ergebnissen führten Versuche zur Abschwächung des Virus in unempfänglichen Tieren (Kaninchen etc.).

Abschwächung des Virus durch längeres Stehenlassen.

Virus, welches längere Zeit im Eisschrank aufbewahrt und seine Virulenz verloren hatte, rief keine Immunität hervor, auch konnte mit kleineren nicht krankmachenden Dosen von Virus eine sichere Immunität nicht erzielt werden.

Eine wirksame aktive Immunisierungsmethode kennen wir also zurzeit nicht. Von der Simultanimpfung wird weiter unten die Rede sein.

B. Passive Immunisierung.

Serumgewinnung.

Das Schutzserum gegen Schweinepest wird von Schweinen gewonnen. Dorset und seine Mitarbeiter sowie wir selbst haben die Gewinnung des Serums von Schweinen vorgeschlagen, und zwar deshalb, weil das zur Immunisierung benutzte Virus (Blut) ja Schweineeiweiß darstellt, das von artfremden Tieren nur sehr schlecht vertragen wird. Schweineeiweiß ist für Rinder, Esel, Pferde, Ziegen, Kaninchen etc. an und für sich toxisch, so daß bei intravenöser einmaliger Injektion größerer Mengen der Tiere rasch zugrunde gehen. Dann aber bilden sich auch bei weiteren Einspritzungen zum Zwecke der Immunisierung gegen das eingespritzte Blut Antikörper (Hämolysine, Agglutinine, Präzipitine), die eine Steigerung der Dosis nicht gestatten, im Gegenteil dazu zwingen, bei Weiterbehandlung der Tiere mit der Dosis herabzugehen. Ferner ist ja die auf andere Weise zu erklärende Anaphylaxie gegen das fremdartige Eiweiß ein Übelstand, der bei der Immunisierung schwer ins Gewicht fällt.

Alles das sind Schwierigkeiten, die einer sachgemäßen Immunisierung der genannten Tiere hindernd im Wege stehen.

Das Auftreten der Überempfindlichkeit kann man ja z. T. umgehen durch schnell hintereinander zu verabreichende Mengen von großen Dosen Bluteiweiß. So gelingt es bei vorsichtiger Behandlung von Kaninchen mit Schweineeiweiß hochwertige präzipitierende Sera zu erhalten, ohne daß man die Tiere an anaphylaktischen Erscheinungen verliert. Trocknet man das Eiweiß an, so kann man es auch seiner toxischen Komponente z. T. entkleiden, ohne das Virus selbst zu zerstören, Wir haben auf diese Weise Kaninchen 5—6 mal mit 5—10 ccm Virus (= Serum von pestkranken Schweinen) vorbehandelt. Das so gewonnene Schweinepestserum erwies sich aber selbst in Dosen von 20, 30 und 50 ccm als völlig unwirksam.

Wir haben dann versucht, durch Ausfällung mit Alkohol und nachfolgendes Antrocknen das Virus seiner schädlichen Wirkungen zu entkleiden. Dadurch gelang es zwar, die Eiweißflüssigkeit für Kaninchen ungiftig zu machen; das Virus ging aber dabei zugrunde.

Durch Aussalzen des virulenten Serums mit Ammonsulfat und Dialysieren gegen strömendes Wasser gelang es uns ferner, einen ungiftigen Impfstoff herzustellen; auch das Virus war nicht zerstört, wohl aber abgeschwächt. Alle diese Eingriffe sind wohl nicht geeignet, das Virus für die Vorbehandlung in schonender Weise vorzubereiten. — Nach einer Mitteilung in der Berliner tierärztl. Wochenschr. 1908, Nr. 7, will Koops[37]) ein Fällungsmittel in Anwendung gebracht haben, das dem schweinepesthaltigen Blute „Eiweißstoffe und rote Blutkörperchen" entzieht, ohne das Virus in seiner Wirkung zu schädigen, und so bei Pferden eine Überempfindlickeit sowie eine Präzipitin- und Hämolysinbildung verhindert. Merkwürdigerweise wird aber der Name des Präparats verschwiegen. Versuche mit derartig hergestelltem Immunserum sind bis jetzt nicht publiziert.

Um die schädlichen Einwirkungen bei Einführung fremdartigen Eiweißes bei der Immunisierung auszuschalten, haben wir auch Rinder und Pferde per os zu immunisieren versucht. Die auf diese Weise mit großen Mengen vorbehandelten Tiere vertrugen auf diesem Wege eingeführtes Serum ausgezeichnet. Sie lieferten aber keine genügenden Mengen von Antikörpern, so daß das Serum zu Schutzimpfungen nicht brauchbar war.

Neuere Untersuchungen, die noch im Gange sind, werden darüber Aufschluß geben, ob der Urin kranker Tiere, den man in großen Mengen gewinnen kann, sich auch zur Immunisierung von Schweinen, Pferden usw. eignen wird. Durch diese Methode würde sich in einfacher Weise die Überempfindlichkeit gegen fremdes Eiweiß vermeiden lassen, zumal wenn man den Urin, um kleine Flüssigkeitsmengen zu erhalten, einengt. Vorläufig sind wir noch auf das Schwein als Serumlieferanten angewiesen.

Am rationellsten ist es ja von vornherein die Tierart zur Herstellung eines Immunserums zu wählen, für welche das Serum Verwendung finden soll. Dabei treten die oben erwähnten Eigenschaften nicht auf. Außerdem ist es eine bekannte Tatsache, daß gleichartiges Heil- und Schutzserum aus dem Tierkörper nicht so schnell ausgeschieden wird wie ein fremdartiges.

Zur Vorbehandlung können alle Schweine, gleichgültig welchen Alters, die einen natürlichen Anfall oder die künstlich hervorgerufene Schweinepest überstanden haben und wieder vollkommen genesen sind, verwendet werden. Aus Zweckmäßigkeitsgründen wird man älteren Tieren, welche die spontane Infektion überstanden haben, den Vorzug geben. Die älteren und größeren Tiere gestatten auch eine größere Ausbeute an Serum und eine intensivere Vorbehandlung. Bei den spontan durchseuchten besteht auch nicht die Gefahr der Impfverluste, welche bei der künstlichen Erzeugung der Krankheit nicht ausgeschlossen sind. Man kann allerdings auch durch eine Simultanimpfung, ohne die Tiere krank zu machen, eine Grundimmunität erzeugen und dann die Tiere mit steigenden Dosen systematisch weiter behandeln. Auf die Art der Vorbehandlung und die Wertigkeit des Serums ist es aber ohne Einfluß, ob man auf diese oder jene Art immun gewordene Tiere als Serumlieferanten heranzieht.

Es war nun von Interesse, zunächst festzustellen, ob Schweine, welche die natürliche Pest überstanden hatten, ohne weitere Vorbehandlung in ihrem Blute schon genügende Mengen für die Praxis verwertbare Schutzstoffe haben würden. Es wurden von uns daher mehrere Ferkel mit 10, 20, 30 ccm Serum einer großen Sau geimpft, welche acht Wochen zuvor akute Pest überstanden hatte, und zur Zeit der

Abnahme des Serums völlig gesund war. Die Ferkel wurden in dem Seuchenstall mit schwerkranken Tieren zusammengesetzt, gingen aber sämtlich an Pest zugrunde.

Die Art der Vorbehandlung besteht in intravenöser, intramuskulärer, intraperitonealer oder subkutaner Injektion virushaltiger Flüssigkeiten (Serum, Blut, Organsaft, Urin, Galle) von frisch geschlachteten oder eben verendeten Schweinen in steigenden Dosen und in bestimmten Intervallen. Auch kann man Schwanzblut und Urin schwer kranker Ferkel zur Immunisierung verwenden. Über die Menge der zu injizierenden Flüssigkeiten, die Häufigkeit der Injektionen, die Dauer der Zwischenpausen lassen sich bestimmte, ein für allemal gültige Regeln nicht aufstellen.

Dorset, der sich ein Verfahren zur Gewinnung eines Serums gegen Schweinepest in Amerika und Frankreich hat patentieren lassen, wendet zwei Methoden, eine schnelle (quick method) und eine langsame (slow method) an. Um zunächst eine Grundimmunität zu erzeugen, erhalten die Tiere mit natürlich oder künstlich erworbener Immunität 20 ccm Virus eingespritzt. Hiernach beginnt erst die eigentliche Immunisierung.

Schnelle Methode (quick method).

Es werden einem Schweine, bei dem man eine Grundimmunität auf die beschriebene Weise erzeugt hat, auf einmal — auf 100 Pfund Körpergewicht berechnet — 1000 ccm defibriniertes virulentes Pestblut subkutan eingespritzt. Genau drei Wochen später wird ihm dann aus dem Schwanz soviel wie möglich Blut entzogen und aufbewahrt. Dieser Aderlaß wird in Intervallen von 7 oder 8 Tagen wiederholt bis zu drei Aderlässen. In den meisten Fällen wird noch ein vierter Aderlaß, aber erst 1 Monat nach dem dritten, vorgenommen.

Langsame Methode (slow method).

Bei dieser Methode werden die Tiere dreimal mit steigenden Mengen defibrinierten Blutes subkutan gespritzt. Die erste Dose beträgt 100 ccm Virus, die zweite Dosis, die nach 10—14 Tagen appliziert wird, 250 ccm, die dritte und letzte Dose, welche ca. 12 Tage später eingespritzt wird, 500 ccm Blut, in jedem Falle auf 100 Pfund Körpergewicht berechnet. 9—10 Tage nach der letzten Injektion wird aus dem Schwanz Blut genommen und dieser Aderlaß zwei- bis dreimal wiederholt. Von den in dieser Weise in den Jahren 1905—1906 vorbehandelten 13 Schweinen haben alle mit einer Ausnahme ein wirksames Serum geliefert.

Die Wirksamkeit der Sera war fast die gleiche, ein wenig besser bei der „quick method,“ die nach ihrer Ansicht vielleicht auch für die Praxis die rationelle ist. Die Blutabnahmen zu verschiedenen Zeiten dienten lediglich zu dem Zwecke festzustellen, wie lange das Serum nach der letzten Injektion seine schützende Kraft behält. An Stelle der wiederholten Aderlässe kann das Tier auch getötet und das Blut durch Einführung einer Kanüle in das Herz gewonnen werden.

Das Blut wird in der Regel aus dem Schwanz der Tiere gewonnen und in großen sterilen Schalen aufgefangen. Um möglichst einen Verlust an Serum zu vermeiden und um nicht zu lange warten zu müssen, wird nach dem Eintritt der Gerinnung der Blutkuchen durch ein steriles Tuch gepreßt, und das sehr stark blutkörperchenhaltige Serum, das eher als defibriniertes Blut bezeichnet werden könnte, mit 0,5 %

Karbol versetzt und in sterile Flaschen abgefüllt. Das defibrinierte Blut wird dann gleich mit Karbol versetzt oder aber das Serum zuvor von den Blutkörperchen durch Zentrifugieren getrennt. Das Serum kann in Intervallen solange den Tieren abgezogen werden, bis es seine Wirksamkeit verloren hat. Zu diesem Zeitpunkt kann dann das Tier von neuem mit krankem Blut in der oben geschilderten Weise gespritzt werden.

Die von uns ausgearbeitete Methode der Serumgewinnung beruht naturgemäß auf denselben Prinzipien, wie die der Amerikaner, weicht aber in manchen Einzelheiten von ihr ab. Für unsere ersten Versuche, mit denen sofort nach Feststellung der Filtrierbarkeit des Schweinepestvirus begonnen war, dienten junge Läufer, die als ältere Ferkel in unseren Versuchen oder unter natürlichen Verhältnissen die Schweinepest überstanden hatten. Die Vorbehandlungsdauer erstreckte sich auf 2—4 Monate, indem vier- bis sechsmal Einspritzungen mit anfangs kleinen 30—50 ccm betragenden bis zu 100 ccm steigenden Dosen vorgenommen wurden. Anfangs gaben wir die ersten Injektionen subkutan, die späteren intravenös, nachher haben wir die virushaltigen Flüssigkeiten nur intravenös einverleibt, da bei der subkutanen Impfung wiederholt Abszesse und Infiltrationen beobachtet wurden. Als Impfmaterial verwandten auch wir neben Serumfiltrat unfiltriertes Material und defibriniertes Blut. Wir sind aber von letzterem abgekommen, da bei subkutaner Verimpfung Abszeßbildung nach intravenöser Applikation mitunter septikämische Zustände auftraten, denen einzelne Tiere zum Opfer fielen, und haben infolgedessen nur noch keimfreies Serumfiltrat verwendet. Die Zufälle sind nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, wie mannigfaltig die Bakterienflora ist (Bac. suipestifer, Bac. suisepticus Coli usw.), die schweinepestkranke Tiere in ihren Organen und im Blut beherbergen. Diese infektiösen Begleitzustände schädigen, wenn sie nicht direkt zum Tode führen, zweifellos die spezifische Antikörperproduktion und setzen andererseits den Schlachtwert der Serumtiere herab. Es ist auffallend, daß Dorset und seine Mitarbeiter auf die Keimfreiheit des einzuspritzenden Materiales, wie es scheint, kein großes Gewicht legen, denn es ist an keiner Stelle erwähnt, daß sie zur Vorbehandlung filtriertes Serum verwenden; es ist vielmehr stets von defibriniertem Blut die Rede.

Nach Abschluß der Vorbehandlung werden die Schweine zum Zweck der Serumgewinnung meist durch Entblutung getötet. Gegen Ende der Vorbehandlung wurde durch Aderlaß eine Blutprobe entnommen und das Serum durch Impfung einiger Ferkel auf seine schützende Kraft der natürlichen Infektion gegenüber, d. h. im Seuchenstall, geprüft.

Nach unseren Erfahrungen können für eine rationelle Serumgewinnung folgende Anweisungen gegeben werden: Größere Schweine, welche die natürliche oder künstlich hervorgerufene Schweinepest überstanden und sich wieder vollständig erholt haben, bekommen in ca. 14tägigen Intervallen fünf- bis sechsmal möglichst frisches von schwerkranken Schweinen gewonnenes und keimfrei filtriertes Serum oder Organsaft intravenös eingespritzt. Die Einspritzung geschieht am besten in die Ohrvenen mittels einer mit Duritschlauch versehenen Spritze von 25 bis 50 ccm, wie sie zu Rotlaufimpfungen verwendet wird. Den Tieren wird zu diesem Zweck ein Strick mit einer Schlinge um den Oberkiefer geschlungen, fest angezogen und an einem Pfosten oder eisernen Ring der Stallwand befestigt. Die Tiere bemühen sich loszukommen, indem sie nach hinten drängen, und ziehen so den Strick und die Schlinge fest an und halten vollkommen still. Darauf wird eine Ohrvene nach Abtragen

der dicken Haut mittels Schere freigelegt, in dieselbe eine Kanüle eingestochen und auf diese der Duritschlauch der Spritze aufgesetzt. Als Anfangsdosis können 50—60 ccm keimfreies Serumfiltrat injiziert werden. Bei jeder folgenden Dosis wird um dieselbe Menge gestiegen. Es empfiehlt sich nicht, größere Mengen als 100 ccm auf einmal sondern in kurzen Pausen zu injizieren. Wenn man diese Vorsichtsmaßregel beachtet, lassen sich unangenehme Zwischenfälle vermeiden. Nach der vierten oder fünften Injektion werden dem Tier aus Ohr oder Schwanz 60 bis 100 ccm Blut abgezogen.

Das daraus gewonnene Serum wird in Dosen von 20—30 ccm einem oder besser zwei Ferkeln eingespritzt, welche im Seuchenstall der natürlichen Infektion ausgesetzt werden. Erweisen sie sich mindestens 4 Wochen lang als geschützt, so wird die letzte Injektion vorgenommen und drei Wochen später das Schwein zur definitivem Serumgewinnung verwendet.

Dabei kommt es darauf an, möglichst viel Blut zu gewinnen und es möglichst steril aufzufangen. Die letztere Forderung kann durch Anwendung eines mit einem hohen sterilisierten Glasgefäß mittels Gummischlauchs verbundenen Trokars, der in das Herz des durch Schlag betäubten Tieres gestoßen wird, erfüllt werden (s. oben). Das Blut wird etwa 6 Stunden bei Zimmertemperatur, dann bis zum nächsten Tage bei Eisschranktemperatur gehalten, wonach das Serum sich gewöhnlich vollkommen abgesetzt hat. Es wird dann mittels Pipetten in sterile, braune Flaschen gefüllt. Der Blutkuchen wird in einem sterilen Tuche ausgepreßt und der blutkörperchenhaltige Preßsaft in einer besonderen Flasche aufgefangen.

Bei dieser Art der Blutgewinnung geht ein ziemlich hoher Prozentsatz verloren. Wenn man von einer sterilen Entnahme des Blutes Abstand nehmen will, worauf man um so eher verzichten kann, als das Serum später einen Zusatz von 0,5 % Karbol zwecks Konservierung erhält, so empfiehlt es sich, das Blut mittels Durchschneidung der Axillaris zu gewinnen, wobei die Entblutung eine vollkommene ist. Das durch Schlag betäubte Tier wird auf einen Tisch gelegt, die Axillargegend wie zu einer Operation desinfiziert und ein langer tiefer Schnitt bis zu der Durchschneidung der Arteria axillaris ausgeführt. Das Blut fließt in der Rinne des Schnittes nach unten und wird hier in dicht an die Haut gehaltene sterile Glasgefäße aufgefangen. Bei dieser Methode, die eine Verunreinigung des Blutes durch Luftkeime nicht ausschließt, geht kaum 1 ccm Blut verloren. Die weitere Behandlung ist die oben beschriebene, die Konservierung erfolgt durch Zusatz von Karbol in Gestalt der bekannten Karbolglyzerinlösung. Wie Versuche ergeben haben, bleibt das Serum monatelang haltbar und wirksam.

Die Frage nach der Zweckmäßigkeit der fraktionierten Blutabnahme erscheint diskutabel. Jedenfalls ist es ja bekannt, daß nach Aderlässen bei serumspendenden Tieren die Wertigkeit des Serums trotz weiterer Vorbehandlung vielfach nicht wieder den früheren Grad erreicht, oft sogar auf einer recht niedrigen Stufe stehen bleibt, so daß man sich jetzt bei der Diphtherieserumgewinnung entschließt, Pferde, die Serum mit einem hohen Titer liefern, ausbluten zu lassen, indem man der qualitativen Ausbeute vor der quantitativen den Vorzug gibt. Bei Schweinen, die wenig Serum liefern, liegen die Verhältnisse jedoch erst etwas anders.

Sehr zweckmäßig ist in dieser Hinsicht die Blutabnahme aus der Schwanzarterie, wie sie von Dorset vorgeschlagen wurde. Man

hat dabei nicht nötig, das Tier zu opfern und kann es zu weiterer Behandlung und späteren Blutentnahmen verwenden. Auf diese Weise wird sich das Serum für die Praxis auch billiger herstellen lassen, als wenn man die Tiere, wenn sie hochwertiges Serum liefern, schlachtet. Wir haben uns in letzter Zeit dieser Methode mit Vorliebe bedient. Der Schwanz des Schweines wird sorgfältig mit Alkohol, Äther und Sublimat desinfiziert. Sodann wird ein 1—2 cm langes Stück mit einer Schere abgeschnitten und der Schwanz in einen sterilen Zylinder hineingehalten. Ist die Arterie durchschnitten, so läuft das Blut in freiem Strahle in das Glas hinein. Auf diese Weise kann man in $^1/_2$—$^3/_4$ Stunden leicht 1 Liter Blut gewinnen. Diese Prozedur kann man nach zwei Tagen wiederholen. Die Tiere werden zum Zwecke der Blutentnahme auf einen Tisch geschnallt oder auch, wie bei der Einspritzung (s. oben), durch eine Maulschlinge festgehalten. Das gewonnene Serum wird zusammengemischt und mit Karbol versetzt. Die Länge des Schwanzes ist dann für die Zahl der Wiederholungen der Blutentnahme maßgebend.

Die Serumgewinnung im Großen gestaltet sich auf diese Weise ökonomisch und verhältnismäßig billig. Auch die geschlachteten Serumtiere sind vollwertig, das Fleisch ist vollkommen genußtauglich.

Die nach der beschriebenen Methode vorbehandelten Schweine lieferten in der Regel ein brauchbares, wirksames Serum. Wir haben eine Reihe von natürlich durchseuchten zentnerschweren Tieren nach dem Dorsetschen Verfahren immunisiert, dabei aber keine Vorzüge vor dem unserigen wahrgenommen, im Gegenteil die durch Verwendung unfiltrierten Materials beobachteten Zufälle unangenehm empfunden.

Ferner haben wir versucht, bei Schweinen durch Immunisierung per os ein wirksames Serum zu bekommen. Die Herstellung eines Immunserums auf solche Weise würde sehr einfach, bequem und für die Versuchstiere gefahrlos sein. Sie böte vor allen Dingen die Möglichkeit, große Mengen Virus auch ohne vorherige Filtration, die im Großen technisch nicht ganz einfach ist, einzuverleiben. Immune Schweine bekamen in bestimmten Intervallen zwei Monate hindurch die Organe oder ganze Kadaver schweinepestkranker Tiere zu fressen. Sie zeigten nach der ersten Fütterung Verdauungsstörungen, erholten sich aber und ließen bei den späteren Fütterungen keine krankhaften Reaktionen, auch keine Beeinträchtigung der körperlichen Entwicklung erkennen. Ihr Serum verlieh aber gesunden Ferkeln, in Mengen von 20 und 30 ccm eingespritzt, keinen Schutz gegen die natürliche Infektion mit Schweinepest.

Unschädlichkeit des Serums.

Die für die Verwendung des Schweineimmunserums in der Praxis notwendige Voraussetzung der Unschädlichkeit des Serums haben wir in allen unseren Versuchen erfüllt gefunden. Die zahlreichen geimpften Ferkel haben niemals eine Störung in ihrer Entwicklung oder ihrem Befinden erkennen lassen, die auf die Serumeinspritzung zurückzuführen wäre. Auch die amerikanischen Forscher heben ausdrücklich hervor, daß von 58 im Jahre 1906 mit Serum allein behandelten Schweinen kein Tier nach der Einspritzung Krankheitserscheinungen gezeigt hat.

Von großem wissenschaftlichen und praktischen Interesse war es, festzustellen, innerhalb welcher Zeit das zur Vorbehandlung immuner Schweine eingespritzte virulente Material im Körper der Immuntiere neutralisiert wird. Zu dem Zweck wurde einem

drei Monate alten immunen Ferkel 150 ccm virulentes Serum intravenös injiziert. 24 Stunden darnach wurde das Tier getötet und das ganze Blut (500 ccm) auf ein Läuferschwein verimpft, ohne daß letzteres erkrankt wäre oder überhaupt die geringste Reaktion gezeigt hätte. Der Versuch wurde dann an einem zweiten älteren Ferkel mit demselben Ergebnis wiederholt. Außerdem wurden einer großen Immunsau, die mehrmals mit virulentem Material vorbehandelt war, 500 ccm virulentes Blut und Blutserum frisch geschlachteter schwerkranker Schweine zum Zweck der Immunisierung intravenös einverleibt. Dieser Sau wurden 24 und 48 Stunden nach der Injektion je 100 ccm Blut aus den Ohrvenen abgenommen und mit dem daraus gewonnenen Serum je zwei Ferkel geimpft. Diese Ferkel blieben während einer vierwöchigen Beobachtungszeit völlig gesund und entwickelten sich in regelrechter Weise. Sie erkrankten aber sämtlich, nachdem sie der natürlichen Infektion ausgesetzt waren. Eine zweite große Immunsau, welche bereits einmal 600 ccm virulentes Blut subkutan erhalten hatte, bekam 750 ccm Blut und Serum intravenös eingespritzt. 24 Stunden darnach wurden ihr 100 ccm Blut abgenommen. Das daraus gewonnene Serum (30 ccm) wurde zwei Ferkeln zu gleichen Teilen eingespritzt. Sie blieben vollkommen gesund.

Aus den Versuchen geht hervor, daß das zur Vorbehandlung in den immunen Schweinekörper bis zu $^3/_4$ Liter eingeführte Virus innerhalb 24 Stunden paralysiert wird. Da zwischen der letzten Injektion virulenten Materials und der Tötung zum Zweck der Serumgewinnung meist 2—3 Wochen vergehen, so ist es ausgeschlossen, daß zu dieser Zeit auch nur noch eine Spur von Virus in dem Körper der Tiere vorhanden ist. Die Gefahr einer Verschleppung des Infektionsstoffes durch das Fleisch derartig vorbehandelter Schweine besteht somit nicht.

Schutzwert des Schweinepestserums.

Wie die Versuche im Laboratorium zeigen, hat das auf die beschriebene Weise gewonnene Immunserum eine ausgesprochene Schutzkraft. Das ist von Dorset, Boxmeyer und uns unabhängig von einander festgestellt und von Wassermann u. a. bestätigt worden.

Man kann sich davon am besten überzeugen, wenn man schutzgeimpfte Ferkel mit nicht geimpften oder Normalserum gespritzten Tieren in einen schwer verseuchten Stall bringt. Nicht geimpfte oder mit Normalserum geimpfte Tiere erkranken dann prompt und gehen in der Regel nach 10—14 Tagen an Pest zugrunde, während die mit Immunserum geimpften Ferkel gesund bleiben. Wie bei allen passiven Immunisierungen ist die Dauer des Schutzes eine zeitlich begrenzte und von der Wertigkeit und der Menge des eingespritzten Immunserums abhängig. Wir haben bei unserem Serum in der Dosis von 20—50 ccm regelmäßig einen Schutz von 4—6, ja acht Wochen und länger beobachten können, bisweilen blieben die Tiere im Seuchenstalle dauernd gesund. In diesem Falle muß man annehmen, daß sie sich durch fortgesetzte Aufnahme von Virus aktiv immunisiert haben. Das ist jedoch nur als Ausnahme zu betrachten. Wird das Serum nach einigen Wochen ausgeschieden und der Schutz läßt nach, so erkranken die Tiere und zwar in diesem Falle meist chronisch, während nicht geschützte Tiere in einem verseuchten Stalle meist an akuten Erscheinungen zugrunde gehen. Sie

werden dann zu sogenannten Kümmerern. Um die Serumschutzwirkung zu illustrieren, sei folgender Laboratoriumsversuch angeführt (siehe: Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. XXVII). Das Schwein (75 kg), von dem das Immunserum stammte, war nur mit mäßigen Dosen Virus in folgender Weise vorbehandelt:

27. 6.	50 ccm	Virus (Serum) + Organsaft	subkutan.
15. 6.	50 ccm	do.	intravenös.
4. 2.	50 ccm	do.	do.
19. 7.	100 ccm	do.	do.
3. 8.	100 ccm	do.	do.

Es wurden nun zur Kontrolle Ferkel mit normalem Schweineserum und mit dem im Handel bisher ausgegebenen, gegen den Bac. suipestifer gerichteten Serum eingespritzt. (Polyvalentes Schweinepestserum Gans, Braun-Klett etc.)

Alle Tiere erhielten 50 ccm, da bei der noch wenig intensiven Vorbehandlung des Immunschweines noch nicht mit einer hohen Wirksamkeit gerechnet werden konnte.

Es erhielten am 20. VIII. 07:

Ferkel 1	50 ccm	normales Schweineserum,				
„ 2	50 ccm	do.	do.			
„ 3	50 ccm	polyvalentes Bac. pestifer-Serum G. (im Handel befindlich),				
„ 4	50 ccm	Bac. pestifer-Serum Spt. X (im Handel befindlich).				
„ 5	50 ccm	Schweinpest-Immunserum (unser Serum).				
„ 6	50 ccm	do.	do.	do.	do.	
„ 7	50 ccm	do.	do.	do.	do.	
„ 8	50 ccm	do.	do.	do.	do.	
„ 9	50 ccm	do.	do.	do.	do.	
„ 10	50 ccm	do.	do.	do.	do.	

Diese Tiere kamen, mit Ausnahme von Nr. 10, in einen Seuchenstall mit drei schwerkranken Tieren zusammen. Nr. 10 wurde isoliert gehalten, um zu sehen, ob das Serum an sich irgend welchen schädigenden Einfluß ausübe. Das war nicht der Fall. Die Kontrollferkel 1—4 zeigten schon nach acht Tagen die ersten Krankheitserscheinungen und sind sämtlich an Pest zugrunde gegangen (2. IX., 10. IX., 12. IX. und 16. IX.), während die schutzgeimpften Tiere gesund blieben und sich gut entwickelten. Nach 6—8 Wochen waren alle Tiere noch völlig munter. Zwei wurden dann aus dem Seuchenstall herausgenommen — sie blieben vollkommen gesund. Zwei blieben dann weiterhin im Seuchenstall sitzen und fingen später an zu kümmern, ein Zeichen, daß sie bis dahin geschützt und nicht von Haus aus immun waren.

Von den im Laufe unserer Versuche mit 20 und mehr ccm Immunserum geimpften und sofort in den Seuchenstall gesetzten Ferkeln erkrankte innerhalb der ersten vier Wochen nicht eins, während die Kontrolltiere sämtlich erkrankten und verendeten.

Zur Feststellung der kleinsten noch schützenden Dosis wurde das Serum, welches im vorigen Schutzversuch in Mengen von 50 ccm bei subkutaner Impfung Ferkel vor der Erkrankung an Schweinepest bewahrt hatte, in verschiedenen abgestuften Mengen je zwei Ferkeln subkutan eingespritzt. Das Serum war mit einer Karbolglyzerinlösung (5,5 ccm Karbol, 20,0 Glyzerin, 74,5 Aq. dest.) im Verhältnis von 10:1 versetzt und vier Wochen im Eisschrank aufbewahrt worden. Der Versuch sollte gleichzeitig über den Einfluß der Konservierungsflüssigkeit auf die Wirksamkeit des Immunserums Auskunft geben.

Es erhielten am 12. IX. 07 subkutan:

Nr. 40 und 41	50 ccm normales Schweineserum.
Nr. 42 „ 43	50 ccm Immunserum.
Nr. 44 „ 45	30 ccm do.
Nr. 46 „ 47	20 ccm do.
Nr. 48 „ 49	10 ccm do.
Nr. 50 „ 51	5 ccm do.

Sämtliche Ferkel wurden am Tage nach der Einspritzung in einen verseuchten Stall mit zwei schwerkranken Ferkeln zusammengesetzt. Die beiden mit normalem Schweineserum geimpften Tiere erkrankten prompt im Anfang der zweiten Woche, das eine verendete am 14, das andere am 18 Tage. Von den übrigen Tieren erkrankte Nr. 50 (mit 5 ccm Immunserum geimpft) unter schweren klinischen Erscheinungen (ausgedehnte Hämorrhagien der Haut, blutigen Stuhl, starke Abmagerung). Es wurde am 30. IX., dem Verenden nahe, geschlachtet. Bei der Obduktion fand sich eine schwere akute hämorrhapische und diphtherische Entzündung der Schleimhaut des Magens, des Blind- und Grimmdarms. Nr. 51 (ebenfalls mit 5 ccm Immunserum geimpft) ist gesund geblieben, dagegen ist Nr. 48 (mit 10 ccm Immunserum geimpft) leicht erkrankt (abgemagert, vereinzelte Pocken, leichter Durchfall). Die übrigen Tiere sind nicht an Pest erkrankt.

Ein weiterer Versuch dürfte auch interessant sein: Wir haben zwei natürlich immun gewordene Sauen am 8. X. 1907 mit je 750 ccm einer Mischung virulenten Blutes und Serums subkutan und intravenös eingespritzt und am 25. X. 1907 geschlachtet. Mit diesem Serum wurden am 26. X. 1907 sechs Ferkel intramuskulär gespritzt und sofort zu schwerkranken Tieren gesetzt und zwar erhielten:

Ein Ferkel	20 ccm Immunserum
„ „	15 ccm do.
Zwei „	10 ccm do.
„ „	5 ccm do.
„ „	20 ccm Normalserum.

Die beiden mit normalem Serum als Kontrolle geimpften Ferkel erkrankten alsbald und verendeten am 11. bezw. 13. XI. an typischer Schweinepest. Die mit 5,0 ccm Immunserum geimpften Ferkel fingen am Ende der dritten Woche an krank zu werden, wurden am Ende der vierten Woche geschlachtet und erwiesen sich als mit Schweinepest behaftet. Die übrigen blieben dauernd gesund. Es muß besonders hervorgehoben werden, daß in die Bucht, in welcher diese schutzgeimpften Ferkel untergebracht waren, immer wieder von neuem, unbehandelte Ferkel und solche, die aus anderen Versuchen stammten und auf das Vorhandensein von Immunität geprüft werden sollten, gesetzt worden und alsbald an der schwersten Form der Schweinepest erkrankt sind.

Es kamen im Laufe des Versuchs folgende Ferkel in den Stall:

Am 31. X. 07	drei Ferkel.	Am 17. XI. 07	ein Ferkel
Am 1. XI. 07	drei „	Am 19. XI. 07	ein „
Am 11. XI. 07	vier „	Am 21. XI. 07	ein „
Am 13. XI. 07	ein „	Am 26. XI. 07	ein „

Bis auf zwei sind sämtliche Ferkel der Schweinepest zum Opfer gefallen, während die schutzgeimpften sich auch tatsächlich als geschützt erwiesen. Es sind das Verhältnisse, wie sie in der Praxis kaum vorkommen werden, und es ist auffallend, daß der passive Serumschutz in unseren Fällen so lange angehalten hat. Es ist, wie bereits erwähnt,

möglich, daß die Tiere sich durch fortgesetzte Aufnahme von Virus im Seuchenstall aktiv immunisiert haben.

Auch bei der Mischung von Virus und Immunserum kann man sich von der Schutzkraft des Serums leicht überzeugen. Wird Serum mit Virus im bestimmten Verhältnis zusammengemischt und unmittelbar danach Schweinen eingespritzt, so erkranken die Tiere nicht; während die Tiere, die dasselbe Virus mit normalem Schweineserum vermischt erhalten, an Pest erkranken.

Selbstverständlich ist dabei Voraussetzung, daß das Serum zu dem Virus in einem richtigen Verhältnis steht, wie aus folgender Übersicht hervorgeht.

I.

1.	10 ccm Virus + 10 ccm Immunserum, gemischt	gesund
2.	10 ccm Virus + 10 ccm Immunserum, gemischt	gesund
3.	10 ccm Virus + 10 ccm Immunserum, gemischt	gesund
3.	(dasselbe) 10 ccm Virus + 10 ccm Normalserum gemischt	krank † an Pest

oder

II.

1.	10 ccm Virus + 10 ccm Immunserum, gemischt	gesund
2.	10 ccm Virus + 5 ccm Immunserum, gemischt	krank, an Pest gestorben.
3.	10 ccm Virus + 1 ccm Immunserum, gemischt	krank, an Pest gestorben.

Man sieht aus diesem letzten Versuch, daß es natürlich auf die richtige Zusammensetzung der Mischung ankommt, um das Virus vollkommen zu neutralisieren.

Diese Versuche stehen in vollem Einklang mit denjenigen der Amerikaner, die allerdings Virus und Immunserum ausschließlich getrennt eingespritzt haben. Wir entnehmen ihren an Hunderten von Tieren angestellten Versuchsprotokollen folgende Tabelle.

Nr.	Versuch	Ergebnis
Nr. 1536.	5 ccm Immunserum + 2 ccm Virus (getrennt)	gesund.
„ 1538.	5 ccm Immunserum + 2 ccm Virus	gesund.
„ 1539.	10 ccm Immunserum + 2 ccm Virus	gesund.
„ 1540.	10 ccm Immunserum + 2 ccm Virus	gesund.
„ 1542.	15 ccm Immunserum + 2 ccm Virus	gesund.
„ 1545.	2,0 ccm Virus allein	krank. an Pest gestorben.
„ 1546.	2,0 ccm Virus allein	krank. an Pest gestorben.

oder

Nr.	Versuch	Ergebnis
Nr. 1520.	5,0 ccm Immunserum + 2,0 ccm Virus	krank, erholt sich.
„ 1521.	5,0 ccm Immunserum + 2,0 ccm Virus	krank, erholt sich.
„ 1523.	10,0 ccm Immunserum + 2,0 ccm Virus	krank, erholt sich.
„ 1524.	10,0 ccm Immunserum + 2,0 ccm Virus	krank, erholt sich.
„ 1526.	15,0 ccm Immunserum + 2,0 ccm Virus	gesund.
„ 1527.	15,0 ccm Immunserum + 2,0 ccm Virus	gesund.
„ 1529.	2,0 ccm Virus allein	krank, an Pest gestorben.
„ 1530.	2,0 ccm Virus allein	krank, an Pest gestorben.

Die letztgenannten Tabellen führen uns zur Besprechung der

Simultan-Impfung

wie sie von Dorset und seinen Mitarbeitern bevorzugt wird. Die Laboratoriumsversuche von Dorset wurden in der Weise angestellt, daß Serum und Virus an getrennten Körperstellen in verschiedener Dosierung injiziert wurden.

Es kam in allen Fällen hochvirulentes Virus zur Verimpfung.

Nach der Injektion wurden die Tiere drei Wochen in einem seuchenfreien Stalle beobachtet.

Es wurden im Ganzen 1905—1906 168 Schweine simultan geimpft. Von diesen zeigten 35 = 21 % nach der Impfung sichtbare Krankheitserscheinungen und 15 = 9 % sämtlicher Tiere starben.

Die Dosen von Immunserum, die mit dem Virus gegeben wurden, schwankten zwischen $2^1/_2$—20 ccm. Das Virus betrug 1—2,0 ccm.

54 Schweine wurden mit der Dosis Virus allein geimpft. Diese erkrankten sämtlich = 100 % und es starben an Pest 50 = 92,5 %. Diese Zahlen beweisen eklatant die Wirksamkeit des Serums.

Dorset spricht die Überzeugung aus, daß, wenn in allen Fällen höhere Serumdosen oder geringere Mengen Virus angewendet wären, die Prozentzahl der durch die Impfung hervorgerufenen Todesfälle auf ein Minimum reduziert seien.

Von den simultan geimpften Tieren wurden 136 nach 3 Wochen bis $3^1/_2$ Monate der natürlichen Infektion ausgesetzt. Von diesen 136 Tieren starben 4 = 3 %, während von 68 ungeimpften unter denselben Bedingungen gelassenen Kontrolltieren 56 = 82 % zugrunde gingen.

Von den vier eingegangenen Tieren zeigte eins bei der Sektion typische Schweinepestveränderungen, während bei den drei anderen nicht mit Sicherheit anzunehmen ist, ob sie an Pest gestorben sind.

Auch wir haben Versuche mit der simultanen Impfung angestellt. Bei der Mischung von Serum und Virus haben wir recht wechselvolle Resultate erzielt.

Es wurden gemischt 10 ccm Virus und 10 ccm Immunserum. Mit dieser Mischung, die unmittelbar vor der Einspritzung hergestellt war, wurden vier Ferkel geimpft; sie erkrankten danach nicht.

Nr. 1 kam nach 8 Tagen in den Seuchenstall und ging an Pest zugrunde.

Nr. 2, 3, 4 kamen nach 17 Tagen in den Seuchenstall und gingen ebenfalls an Pest ein.

Das Virus war virulent, denn das Kontrolltier mit 10 ccm Virus + 10 ccm Normalserum erkrankte nach der Impfung typisch und ging an Pest ein.

Es war also eine aktive Immunität nicht eingetreten, wie man sie hätte erwarten sollen.

In anderen Fällen haben wir bei andern Mischungsverhältnissen eine aktive Immunität erzielt.

Mischung	Ergebnis
10 ccm Virus + 5 ccm Immunserum	gemischt, nach 3 Wochen in den Seuchenstall dauernd gesund geblieben.
10 ccm Virus + 1 ccm Immunserum	gemischt, nach der Impfung erkrankt, † an Pest.
10 ccm Virus + 10 ccm Immunserum	gemischt, nach 3 Wochen in den Seuchenstall dauernd gesund.
10 ccm Virus + 10 ccm Normalserum	gemischt, nach der Impfung erkrankt und an Pest gestorben.

Auch bei getrennter Einspritzung von Virus und Immunserum haben wir ungleichmäßige Resultate erzielt; wenn wir z. B. 20 ccm Immunserum auf der einen Seite und 1—2 ccm Virus auf der andern Seite einspritzten, so haben wir, wenn die Tiere 3 Wochen später der natürlichen Infektion ausgesetzt wurden, bald eine anhaltende Immunität erzielt, in vielen Fällen wieder nicht.

Wurden die simultan geimpften Tiere jedoch sofort in den Seuchenstall gesetzt, so erkrankten sie, wie zu erwarten war, meist recht schnell.

Der Schutz tritt eben erst nach 3 Wochen ein; unmittelbar nach der Impfung scheinen die Tiere trotz einer größeren Serumdosis (10 ccm) nicht geschützt zu sein.

Wenn wir uns überlegen, woher die ungleichmäßigen Resultate bei der Simultanimpfung kommen, so liegt es klar auf der Hand, daß sie bedingt sind durch die Unmöglichkeit, Virus und Immunserum in richtigem Verhältnis abzustimmen. Zur Erzeugung einer aktiven Immunität ist nötig ein gewisses Plus von virulentem Material, das die immunisierende Reaktion im Tierkörper auslösen muß. Wir haben aber kein Mittel in der Hand, das Virus sowohl wie das Serum und zwar schnell innerhalb 24 Stunden gegeneinander auszutitrieren. Eine solche Titration müßte schnell erfolgen. Jetzt dauert sie, da die Prüfung an Ferkeln vorgenommen werden muß, 3—4 Wochen. Inzwischen haben sich aber Virus und Serum in ihrem Titer wieder geändert, so daß wir dann nichts mehr über ihre Wirksamkeit aussagen können. Ist das Serum im Vergleich zum Virus zu stark, so wird eine vollständige Neutralisierung des Virus stattfinden — es wird keine aktive Immunität auftreten. Ist das Virus zu stark, so wird das Tier, wenn auch unter Umständen nur leicht erkranken. Das haben auch die Versuche der Amerikaner gezeigt, die auch beweisen, daß solche Tiere andere anstecken können, wenn auch das Virus abgeschwächt erscheint.

Da wir also kein Mittel in der Hand haben, mit Sicherheit in jedem Falle eine Impfkrankheit zu verhindern, so ergibt sich dadurch unserer Ansicht nach von selbst, daß eine Simultanimpfung nur in verseuchten Beständen in Frage kommen kann. In unverseuchten Beständen würde die Simultanimpfung immerhin eine nicht zu unterschätzende Gefahr bedeuten und daher nach dem heutigen Stand der Forschung unserer Ansicht nach nicht angängig sein.

Über die Anwendung der Simultanimpfung in der Praxis sprechen sich die Amerikaner nicht aus, ihre bisher publizierten Versuche sind lediglich Laboratoriumsexperimente.

Nun ist aber weiterhin zu bedenken, daß der momentane Serumschutz bei der simultanen Impfung durch das beigegebene Virus herabgemindert wird, und es ist daher zu überlegen, ob man auch in verseuchten Beständen überhaupt simultan impfen oder nicht lieber die völlig gefahrlose Serumimpfung allein anwenden soll. Der Schutz bei der Simultanimpfung dauert, wenn er überhaupt eintritt, allerdings länger, aber es dürfte zu erwägen sein, ob man unter Zuhilfenahme der sonstigen Maßnahmen der Seuchenbekämpfung (Abschlachten der kranken Tiere, Absonderung der gesunden und schutzgeimpften Tiere, Desinfektion usw.) nicht auskommt, eventuell bei wiederholter Einspritzung von Serum. Auch dürfte zu erwägen sein, daß unter dem Serumschutz eine aktive Immunisierung eintreten kann. Derartige Erfahrungen kann man nur in der Praxis sammeln und zwar auch nur dann, wenn das Immunserum ein möglichst hochwertiges ist.

Wir stehen ja erst im Beginn der Forschungen. Heute ist es noch nicht möglich, ein bestimmtes Urteil abzugeben, es ist überhaupt noch nicht möglich zu sagen, ob eine Serumprophylaxe der Schweinepest in der Praxis erfolgreich sein wird, trotzdem sie im Versuchsstall ihre Feuerprobe aufs beste bestanden hat. Das wird nicht allein davon abhängen, ob sich ein hochwertiges Serum im großen billig genug wird darstellen lassen, sondern auch von anderen Faktoren, die sich im Laboratorium nicht übersehen lassen.

Bis jetzt läßt sich nur soviel sagen, daß ein Serumschutz bei Schweinepest über jeden Zweifel erhaben ist.

Prüfung des Serums.

Jedes Serum, das in der Praxis Verwendung finden soll, muß auf Keimfreiheit und seine Schutzkraft geprüft werden. Am zweckmäßigsten erscheint uns die Prüfung des Serums im Seuchenstall, in dem sich fortgesetzt schwerkranke Tiere befinden. Solche Prüfung entspricht am besten den Verhältnissen der Praxis. Außerdem ist es verhältnismäßig leicht, einen Seuchenstall mit ziemlich gleichbleibender Virulenz herzurichten, während es leider unmöglich ist, für die Prüfung stets ein gleichmäßig infektiöses Virus bereit zu halten. Die Virulenz schwankt in weiten Grenzen, und einen Maßstab für die Virulenz haben wir z. Zt. nicht, da kleine Versuchstiere für das Schweinepestvirus nicht empfänglich sind.

Wir spritzen vier Ferkeln (sechs Wochen alt) 5, 10, 20, 30 ccm Serum ein. 1 bis 2 Kontrollferkel, die mit normalem Schweineserum geimpft werden, müssen prompt erkranken. Die schützende Serumdosis muß etwa 20—30 ccm betragen, d. h. die Tiere müssen mindestens vier Wochen gesund bleiben.

Heilwirkung des Immunserums.

So ausgesprochen auch die Schutzwirkung des Serums ist, so gering ist die Heilwirkung, wie wir im Laboratoriumsversuch und in der Praxis feststellen konnten. Dorset kommt auf Grund eingehender Versuche zu demselben Ergebnis:

12 Schweine, welche sicher infiziert waren, wurden mit Serum behandelt und zwar nach verschiedenen Zeiten. Es ergab sich, daß 15—25 ccm Serum genügten, das Leben der Tiere zu retten unter der Voraussetzung, daß das Serum innerhalb von 4 Tagen nach der Infektion gegeben wurde. Wenn es später gegeben wurde, so waren selbst große Mengen, 35—50 ccm, nicht imstande die Tiere zu retten. Damit stimmen unsere Erfahrungen vollkommen überein.

Es mag das wohl zum Teil daran liegen, daß sobald die durch das Virus bedingten Veränderungen im Darm (Blutungen, Entzündungen) gesetzt sind, sekundär eine Einwanderung nicht nur des Bac. suipestifer, sondern aller möglicher anderer Bakterien in das Blut und die Organe stattfindet, und diese Begleitbakterien dann ihre deletäre Wirkung im Tierkörper entfalten. Gegen derartige Mischinfektionen kann natürlich das Schweinepestimmunserum nicht wirken, genau wie das bei der Diphtherie des Menschen genugsam bekannt ist. Ob in solchen Fällen eine Kombination mit polyvalentem und antitoxischem Pestiferserum mehr auszurichten vermag, darüber werden unsere weiteren Versuche Aufschluß geben.

Auch wird es sich zeigen, ob bei weiterer Hochtreibung des Immunserums bessere Resultate erzielt werden. Ein definitives Urteil über diese Frage läßt sich zurzeit noch nicht fällen.

Anwendung des Schweinepestimmunserums in der Praxis.

Auf Grund der Erfolge der im Laboratorium mit dem gegen das Schweinepestvirus hergestellten Immunserum vorgenommenen Impfungen sind auch von uns Versuche in der Praxis ausgeführt worden. Ihre Zahl ist noch eine verhältnismäßig geringe, gestattet aber doch den Schluß, daß wie es im Versuchsstall gelungen ist, die Tiere gegen die Schweinepest zu schützen, das auch unter praktischen Verhältnissen möglich

ist. Es mag ausdrücklich hervorgehoben werden, daß von uns in der Praxis bisher nur mit Serum allein geimpft worden ist. Es lag uns daran, zunächst überhaupt einmal klar zu beurteilen, was das Serum allein zu leisten vermag, auch sollte eine Erkrankung der Tiere in Folge der Impfung, wie sie bei Anwendung der Simultanmethode nicht ausgeschlossen ist, auf jeden Fall vermieden werden. Bei der Anwendung des Serums macht sich nun der Umstand, daß es in allererster Linie ein Schutzserum und kein Heilserum darstellt, übel bemerkbar. In vielen Fällen, in denen eine Impfung gewünscht wird, hat die Seuche schon längere Zeit bestanden, und ist der größte Teil der noch lebenden Tiere bereits infiziert und es ist dann nicht verwunderlich, daß solche Tiere „trotz der Impfung" noch erkranken. Es folgt daraus, daß eine Impfung mit dem Serum nur in den Fällen sicheren Erfolg verspricht, in welchen die Gefahr der Durchseuchung aber nicht die Gewißheit der bereits erfolgten Infektion der zu impfenden Tiere besteht. In all den Fällen, in welchen nach diesen Gesichtspunkten die passive Immunisierung vorgenommen ist, sind gute Resultate zu verzeichnen gewesen (s. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. XXX).

Es müssen aber noch weitere Versuche angestellt werden, ehe wir die Schutzimpfung für die allgemeine Praxis empfehlen können. Wir stehen, wie gesagt, noch im Versuchsstadium.

Da der Serumschutz aber nur ein beschränkter sein kann, wird man auf jeden Fall auch mit sonst zu Gebote stehenden Mitteln den Seuchenherd bekämpfen müssen.

Es werden alle offensichtlich kranken Tiere möglichst schnell geschlachtet und beseitigt werden müssen. Dazu kommt Absonderung der schutzgeimpften Tiere.

Es wird sich auch empfehlen, die jungen Ferkel bei Seuchengefahr frühzeitig schutzzuimpfen. Besonders wird die Impfung auch in Frage kommen, wenn die Einschleppung der Schweinepest durch angekaufte Tiere zu befürchten ist.

Literatur.

1) De Schweinitz und Dorset, A firn of Hogcholera not caused by the Hogcholerabacillus. Bureau of Animal Industry. Oktober 1903. Zirkular 41.
2) Poels, Verslag van de Werkzaamsheden der Rijikseruminrichting 1904/05.
3) Dorset, Bolton und Mc Bryde, The etiology of Hogcholera. Biochemie Division. Bureau of Animal Industry U. St. Depart. of Agric 1905, Bull. Nr. 2.
4) Mc Clintock, Boxmeyer und Siffer, J. I., Studies on Hogcholera. Journal of Diseases 1905. 1. März.
5) Ostertag, Ist das Virus der Schweinepest und Schweineseuche filtrierbar? Berliner tierärztl. Wochenschr. 1906, Nr. 34.
6) Koske, Untersuchungen über Schweinepest. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 1904, Bd. XXIV, Heft 2.
7) Board of agriculture and fisheries. Annals reports of proceedings under the diseases of animal acts ect. for the year 1905.
8) Hottinger, Über das Verhältnis des Bac. suipestifer zur Schweinepest. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 1905, Bd. XLVII, Heft 5.
9) Ders., Bacillus suipestifer. Centralbl. für Bakt. XLVIII, Heft 1 und 2.
10) Theiler, Die Schweinepest und Schweineseuche in Südafrika. Fortschritte der Veterinärhygiene 1906, Heft 6.
11) Hutyra, Zur Ätiologie der Schweinepest und der Schweineseuche. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1906, Nr. 32.
12) Ders., Zur Ätiologie der Schweinepest und Schweineseuche. Zeitschr. für Infektionskrankh. der Haustiere 1907, Bd. II, Heft 4 und 5.
13) Ostertag und Stadie, Weitere Untersuchungen über die Filtrierbarkeit des Virus der Schweineseuche und der Schweinepest. Zeitschr. für Infektionskrankh. usw. der Haustiere 1907, Bd. II, Heft 2 und 3.

14) Stadie, Bemerkungen zu dem Vortrag Uhlenhuths: „Über die Ätiologie und die Bekämpfung der deutschen Schweinepest". Berliner tierärztl. Wochenschrift 1907, Nr. 46.
15) Uhlenhuth, Hübener, Xylander und Bohtz, Untersuchungen über das Wesen der Bekämpfung der Schweinepest. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. XXVII, Heft 3.
16) Uhlenhuth, Deutsche militärärztl. Zeitschr. 1907, Nr 11. Vereinsbeilage.
17) Uhlenhuth, Über Schweinepest. Verhandlungen der 79. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte zu Dresden am 17. IX. 1907.
18) Ders., Ergebnisse neuerer Untersuchungen über Schweinepest. 14. Internationaler Kongreß für Hygiene und Demogr. 1908, Bd. IV, pag. 50.
19) Uhlenhuth und Hübener, Weitere Mitteilungen über Schweinepest. Sitzung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie vom 13. VI. 1908. — Centralbl. für Bakt., Bd. XLII, Beiheft.
20) Uhlenhuth, Über die Ätiologie und die Bekämpfung der deutschen Schweinepest. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1907, Nr. 44.
21) Dorset, Bureau of Animal Industry. Februar 1904. Zirkular 43.
22) Dorset, Bryde und Niles, Further experiments concerning the production of immunity from Hogcholera. U. S. Depart. of Agric. Bureau of Animal Industry. January 18 1908. Bulletin 102.
23) Wassermann, Wissenschaftliches über Schweinepest und Schweineseuche. Mitteilungen der Vereinigung deutscher Schweinezüchter 1908, 15. Jahrg., Nr. 7.
24) Carrée, Lechlainche und Valleé, Revue génèrale de Medicine vétèrinaire, Nr. 125, 1. Mars 1908.
25) Schreiber, Zur Ätiologie der Schweinepest. Berl. tierärztl. Wochenschr. 1907, Nr. 18.
26) Grabert, Zur Herkunft des Bac. suispestifer. Zeitschr. für Infektionskrankh. der Haustiere 1907, Bd. III, Heft 1 und 2.
27) Lourens, Untersuchungen über die Filtrierbarkeit der Schweinepestbazillen. Centralbl. für Bakt. 1907.
28) Glaesser, Studie über die Ätiologie der Schweinepest. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1907, Nr. 14.
29) Prettner, Über aktive und passive Immunisierung gegen Schweinepest. Zeitschrift für Infektionskrankh. der Haustiere 1907, Bd. I, pag. 451.
30) Velzen, Über das Vorkommen pathogener Mikroorganismen bei gesunden Schweinen. Centralbl. für Bakt., Bd. XL, pag. 802.
31) Gardenghi, Ref. Centralbl. für Bakt., Bd. XL.
32) Morgan, Some observations upon the Mikroorganismus of meat poisoning and their Allies. British med. Journal 1905. June 10.
33) Uhlenhuth, Über Antiformin. Diskussionsbemerkungen. Deutsche militärärztl. Zeitschr. 1908, Heft 7.
34) Ders., Freie Vereinigung für Mikrobiologie. Sitzung vom 13. VI. 1908. Centralbl. für Bakt., Bd. XLII, Beiheft.
35) Uhlenhuth und Xylander, Antiformin, ein bakterienauflösendes Desinfektionsmittel. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 29.
36) Neisser, M., Bakterizide Antigene, deren Antikörper bakt., aggl. und präz. Eigenschaften aufweisen. Handb. der Technik und Methodik der Immunitätsforschung von Kraus u. Levaditi, Bd. I.
37) Pick, E. P., Darstellung der Antigene mit chemischen und physikalischen Methoden. Handb. der Technik und Methodik der Immunitätsforschung von Kraus und Levaditi, Bd. I.
38) Joest, Schweineseuche und Schweinepest. Monographie 1906.
39) Hutyra und Marek, Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere 1905.
40) Preiss, Die Bekämpfung der Schweineseuche und Schweinepest mit Berücksichtigung der Schutzimpfungen. Vortrag gehalten auf dem VIII. internationalen tierärztlichen Kongreß in Budapest 1905.
41) Löffler, Über ein neues Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 52.
42) Kitt, Lehrbuch der pathologischen Anatomie der Haustiere.
43) Ostertag, Das Veterinärwesen der Ver. Staaten von Nordamerika. Reisestudien.
44) Marxer, Eine aktive Immunisierung gegen Schweinepest mit abgetötetem Virus. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1908, Nr. 23.
45) Koops, Vorläufige Mitteilung über die Möglichkeit, das Pferd zur Lieferung eines Immunserums gegen Schweinepest heranzuziehen. Berliner tierärzt. Wochenschrift 1908, Nr. 7.
46) Glaesser, Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der deutschen Schweinepest. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1908, Nr. 40 und 41.

XXVII.

Rinderpestserum.

Von

Professor W. Kolle

in Bern.

Geschichtliche Bemerkungen über die Herstellung eines Rinderpestserums.

Die Methoden zur Herstellung eines Rinderpestserums haben ihren Ausgangspunkt genommen von den Beobachtungen von Semmer und Nencki. Diese Forscher stellten zuerst die Schutzkraft des Serums von Rindern, welche die Seuche überstanden hatten, bei gesunden Tieren gegen Rinderpest fest. In der Folge wurden diese Beobachtungen durch Theiler und Pitchford, sowie ferner durch die Experimente von Tokishige und Inigakushi, von Koch, Kolle und Turner bestätigt und erweitert. Die letzteren Autoren namentlich waren es, welche zuerst vermittelst der systematischen Hochtreibung der Immunität ein hochwertiges Serum erzielten und in Fortsetzung der Kochschen Versuche die kombinierten Serumimmunisierungsverfahren ausarbeiteten.

Methodik der Herstellung des Rinderpestserums.

Die Methodik der Gewinnung eines hochwertigen Rinderpestserums verlangt eine Besprechung:

1. der Gesichtspunkte für die Auswahl der für die Serumlieferung bestimmten Tiere,
2. der genauen Angaben über die Art und Weise der Herstellung der Grundimmunität der Serumtiere,
3. der Methoden der Hochtreibung der Immunität und die Bestimmung des Zeitpunktes der Gewinnung des Serums,
4. über das Material, welches zur Hochtreibung der Immunität benutzt wird,
5. der Wertbestimmung des Serums.

Zum Schlusse möge dann der Plan eines Seruminstituts nebst Ratschlägen für die Einrichtung eines solchen mitgeteilt werden.

1. Gesichtspunkte für die Auswahl der zur Serumlieferung bestimmten Tiere.

Alle Tiere, die zum Zwecke der Gewinnung eines hochwertigen Serums für die Immunisierung bestimmt sind, müssen in erster Linie

frei von Krankheiten sein, namentlich von solchen chronischen Infektionskrankheiten des Blutes, welche bei dem Immunisierungsprozeß wieder aufflackern und so einen Verlust des Tieres herbeiführen können.

Die gefürchtetste Komplikation der Rinderpest stellt in dieser Beziehung die Infektion der Rinder mit Piroplasmen dar. Wird ein solches Rind, welches aus einer texasfieberverseuchten Gegend stammt und in seinem Blute Piroplasmen beherbergt, zur Herstellung der Grundimmunität z. B. der Simultanmethode unterworfen, so kommt es häufig infolge Ausbruchs der Rinderpest zu einem gleichzeitigen Aufflammen des Texasfiebers. Die Tiere sterben dann durch die doppelte Infektion, welche zur Entstehung eines Circulus vitiosus führt.

Aber auch akute Infektionskrankheiten können bei der Immunisierung störend einwirken. Es sind dies namentlich die Maul- und Klauenseuche, sowie die Lungenseuche und die hämorrhagische Septicämie, welche das Immunisierungswerk behindern. Es kommt deshalb darauf an, durch tierärztliche Untersuchung, durch Anfertigung von Blutpräparaten, eventuell durch Quarantäne-Maßnahmen diese Krankheiten von den Rinderpestseruminstituten fernzuhalten. Während man sich gegen die letztgenannten Krankheiten durch die mitgeteilten Maßnahmen schützen kann, ist ein Schutz gegen die Blutinfektionskrankheiten, wie Texasfieber, Küstenfieber und tropische Piraplasmen im allgemeinen nur dadurch möglich, daß man die Tiere zur Serumgewinnung und, wie hier gleich vorweg bemerkt sein möge, zur Gewinnung virulenten Blutes, welches ja den Immunisierungstieren eingespritzt werden muß, einzig aus solchen Gegenden bezieht, in welchen diese Krankheiten nicht vorkommen.

Im weiteren muß verlangt werden, daß die Tiere, welche für die Serumgewinnung bestimmt sind, eine gewisse Empfänglichkeit für den Rinderpest-Infektionsstoff besitzen. Sie müssen mindestens so empfänglich sein, daß sie bei Anwendung der Simultanmethode eine, wenn auch nur leichte Erkrankung durchmachen. Es bestehen nicht unerhebliche Differenzen der einzelnen Rassen bezüglich der Empfänglichkeit für Rinderpest. So wurde durch Rogers in Indien festgestellt, daß die Bergrinder sich ganz anders verhalten als die Niederungs- oder Steppenrinder. Auch in Rußland sind von Semmer ähnliche Beobachtungen bereits früher gemacht worden, und neuerdings haben Bitter und Todd festgestellt, daß das einheimische egyptische Rind, der sog. Buffalo oder Gooma, außerordentlich wenig empfänglich ist für Rinderpest, während die von Cypern stammenden Tiere eine außerordentlich hohe Empfänglichkeit für Rinderpest aufweisen. Auch die Erfahrungen der anderen bereits genannten Forscher sprechen dafür, daß nicht unerhebliche Differenzen in der Empfänglichkeit der verschiedenen Rassen vorkommen. Die individuellen Differenzen der einzelnen Tiere einer Rasse treten aber gegenüber den Unterschieden in der Empfänglichkeit der einzelnen Rassen ganz in den Hintergrund. Es wird Sache der Erfahrung des Immunisators sein, aus welcher ihm zur Verfügung stehenden Tierrasse er sich die geeigneten Immunisierungstiere, sowie die Tiere, welche das infektiöse Blut liefern sollen, auswählt.

Eine fast selbstverständliche Forderung besteht darin, daß alle für Serumgewinnung bestimmten Tiere kräftig sind. Sie dürfen nicht zu jung sein, denn man hat im allgemeinen mit ausgewachsenen, etwas älteren Tieren viel bessere Erfahrungen bei der Hochtreibung der Immunität gemacht als mit jungen Tieren.

Wir kommen nun zur Frage der Herstellung einer Grundimmunität bei den serumliefernden Tieren. Nach dem Vorgange von Kolle und Turner werden zur Gewinnung des Serums wohl heutzutage überall, und das wird auch durch die neueren Erfahrungen in Egypten und auf den Philippinen vollauf bestätigt, hauptsächlich in erster Linie Tiere benutzt, welche mittels der Simultanmethode eine aktive Immunität gegen Rinderpest erworben haben. Die Tiere werden in Stallungen gebracht und mit Hilfe des genannten Verfahrens einer leichten Rinderpestattacke unterworfen, dadurch, daß man ihnen auf der einen Seite des Körpers einen Kubikzentimeter des infektiösen Blutes und auf der anderen Seite eine bestimmte Dosis des Serums injiziert. Die Tiere, welche gegen die Unbilden der Witterung zu schützen sind, werden täglich zweimal gemessen, und die im Anus festgestellten Temperaturen werden in Protokolle eingetragen, wo auch Bemerkungen über das Allgemeinbefinden und die Symptome täglich eingetragen werden. Wenn die Dosen des Serums richtig gewählt sind, eine Forderung, auf die ich noch weiter unten eingehen werde, ist der Verlauf der Rinderpest im allgemeinen ein nicht allzuschwerer. Die Tiere pflegen unter Rückkehr der Temperatur zur Norm langsam zu genesen und werden nun beobachtet und gepflegt, bis sie sich vollkommen erholt haben.

Es sind sich zurzeit alle Forscher darüber klar, daß das Serum dieser Tiere, obwohl es eine spezifische Schutzkraft besitzt, doch für praktische Immunisierungsverfahren oder als Heilmittel nur dann in Frage kommen kann, wenn die Immunität der serumliefernden Tiere erhöht worden ist. Pitchford und Theiler versuchten eine Verstärkung der Immunität dadurch zu erreichen, daß sie den Tieren 10—14 Tage nach vollkommener Genesung von der natürlichen Krankheit eine Injektion von 100—200 ccm des Blutes kranker Tiere subkutan machten.

Auch Bordet und Danysz verfuhren in der gleichen Weise. Die Methoden der systematischen Hochtreibung des Rinderpestserums rühren von Kolle und Turner her. Diese Forscher übertrugen die zuerst von Ehrlich und seinen Mitarbeitern bei der Gewinnung hochwertigen Diphtherie- und Tetanusserums in die Immunisierungspraxis eingeführten und mit so viel Erfolg angewandten Methoden der Hochtreibung der Immunität von den Antitoxinen auf die Immunisierung bei Rinderpest. Da der Rinderpesterreger weder bekannt ist, noch gezüchtet werden konnte, und auch Gifte des Erregers bisher weder nachgewiesen noch zu erhalten waren, so mußte zwecks Gewinnung eines hochwertigen Serums auf das Blut kranker Tiere, in welchem der Infektionserreger in großen Mengen enthalten ist, zurückgegriffen werden. Man hat sich allgemein dahin geeinigt, dieses infektiöse Blut kranker Tiere als „virulentes" Blut zu bezeichnen.

Die Methoden, wie sie von den genannten Autoren angewandt wurden, gestalteten sich im einzelnen in der folgenden Weise. Die Rinder erhalten, nachdem sie sich von der die Simultaninjektion begleitenden Rinderpestattacke völlig erholt haben, zunächst eine Injektion von 100 ccm virulenten Blutes. Es folgt auf diese Injektionen, wie aus beifolgenden Kurven zu ersehen ist, meist eine Fieberreaktion von mehrtägiger Dauer, und ungefähr eine Woche, nachdem dieselbe abgelaufen ist, werden dem Tier 200 ccm injiziert; dann jedesmal, ungefähr um die gleiche Zeit nach Ablauf einer solchen Reaktion, eine größere Menge, 300—400—500 ccm und mehr. Sobald das Tier 1000 ccm erhalten hat, wird es, wenn es eine gute Reaktion gezeigt hat, zum ersten Male zur

Ader gelassen und an je 3 aufeinanderfolgenden Tagen je einmal 4500 ccm Blut entnommen. Es erfolgt sodann die Injektion einer großen Dosis virulenten Blutes, worauf abermals zum Zwecke der Serumgewinnung zweimal zur Ader gelassen wird.

Eine Modifikation dieser Methode haben später NICOLLE und ADIL-BEY eingeführt. Nach Erzeugung der Grundimmunität mittels der Simultanmethode injizierten diese Autoren den Rindern 8—14 Tage nach dem Überstehen der modifizierten Attacke 4—5 l virulentes Blut und zugleich nochmals Serum in der Dosis von 10—20 ccm. In ähnlicher Weise ist DUDUKALOW verfahren und auch BITTER und TODD haben die Hochtreibung der Immunität bei Rindern nach Überstehen der Simultaninjektion durch zweimalige Injektion von 4 Litern virulenten Blutes in Zwischenräumen von 14 Tagen ausgeführt. Die Tiere werden dann dreimal zur Ader gelassen in Zwischenräumen von 14 Tagen. Es werden jedesmal 4 Liter Blut den Tieren abgezapft und dann erhalten die Tiere wieder zwei Einspritzungen von je 4 Litern virulenten Blutes in Zwischenräumen von 14 Tagen.

Es muß nun die Frage erörtert werden, wie und von welchen Tieren das infektiöse Blut gewonnen wird, welches zur Herstellung der Grundimmunität und später zur Hochtreibung derselben benutzt wird. Es werden gesunde Tiere, welche auf Grund der tierärztlichen Untersuchung als frei von akuten und chronischen Infektionskrankheiten, namentlich aber auf Grund der Blutuntersuchung als frei von Texasfieber befunden werden, und welche aus texasfieberfreien Bezirken stammen, nachdem ihre Temperatur durch mehrtägige Messung als normal festgestellt ist, mit einer ganz geringen Menge, nämlich $^1/_{10}$—$^1/_{20}$ ccm virulenten Blutes, welches von einem in gleicher Weise infizierten rinderpestkranken Tiere gewonnen ist, eingespritzt. Es wird also durch Übertragung des Infektionsstoffes von Tieren, welche außer der Rinderpest vollkommen frei von Blutinfektionskrankheiten sind, auf gleichartige Rinder eine fortlaufende Passage des Virus in möglichst virulenter Form erzielt. An Stelle der Injektion ist von manchen Autoren vorgeschlagen worden, den Speichel oder das Sekret der Nase, welches ja auch den Infektionserreger enthält, zur Infektion gesunder Tiere zu benutzen, dadurch, daß man die infektiösen Sekrete auf die Nasen- und Mundschleimhaut einreibt. Diese Methode ist aber verhältnismäßig unsicher und gibt in gutgeleiteten Experimentalstationen keine bessern Resultate als die subkutane Injektion des virulenten Blutes.

Ein sehr empfehlenswertes Material zur Erzeugung der Krankheit mittels subkutaner Injektion ist das Blut von Schafen, welche mit Rinderpestinfektionsstoffen injiziert sind. KOCH hatte durch seine Versuche als erster nachgewiesen, daß Schafe für Rinderpest empfänglich sind, und daß es gelingt, durch Übertragung des Blutes der Schafe, die der Seuche allerdings nicht zu erliegen pflegen, sondern nur leicht erkranken, von Schaf zu Schaf in fortlaufender Kette eine Steigerung der Virulenz des Infektionsstoffes für Rinder zu erzielen. Die Benutzung dieses Schafblutes bietet nicht unerhebliche Vorteile. Da das Schaf für die meisten Rinderkrankheiten, namentlich für die gefürchteten Blutinfektionen der Rinder, nicht empfänglich ist, so kann man unter allen Umständen durch Schafblut wohl den Erreger der Rinderpest, nicht aber die genannten Krankheitserreger übertragen.

Um nun möglichst große Mengen virulenten Blutes zu gewinnen, werden die Tiere, deren Temperaturen sorgfältig auf Kurven aufgezeichnet

werden, am 3. Tage nach Beginn des Fiebers, bzw. am 5. oder 6. Tage nach der Injektion des Infektionsstoffes unter aseptischen Kautelen zu Tode geblutet. Es empfiehlt sich, das Blut aus der Carotis zu gewinnen, da man auf diese Weise erheblich mehr Blut erhält, als wenn man die Tiere aus einer Vene verbluten läßt. Das Blut läßt man mittels eines Schlauches in sterile Flaschen laufen, in denen es entweder durch Schütteln mittels Glasperlen, welche in den Flaschen mitsterilisiert waren, defibriniert, oder indem man das Blut mit einer geringen Menge Natriumzitrat versetzt. Der Zusatz dieses Mittels in der Menge von 1% verhindert die Gerinnung des Blutes, ohne innerhalb 24 Stunden eine wesentliche Schädigung der Rinderpesterreger herbeizuführen (Fig. 1).

Fig. 1. Entblutung eines rinderpestkranken Tieres aus der Arteria carotis zur Gewinnung virulenten Blutes. In dem sterilen Gefäß befindet sich Natriumcitrat. Versuchsstation bei Kairo.

Das in dieser Weise unter aseptischen Kautelen gewonnene und von andern Krankheitserregern und Bakterien, abgesehen von Rinderpestmikroben, freie Material wird nun möglichst bald zur Injektion der Rinder, sei es zur Erzielung der Grundimmunität mittels der Simultanmethode, sei es bei immunen Tieren zur Hochtreibung der Immunität, subkutan injiziert. Damit nach Einverleibung größerer Mengen des Blutes keine Abszedierungen im Unterhautzellgewebe entstehen, ist es notwendig, das Blut an einer ganzen Anzahl Körperstellen einzuverleiben. Eine sehr praktische Vorrichtung ist im Seruminstitut zu Kairo angewandt worden, wie auf Abbildung 5 zu ersehen ist. An der Decke sind mehrere (4—5) Gefäße angebracht, aus welchen das Blut unter eigenem Druck mittels Schläuchen in die verschiedenen Stellen des Unterhautzellgewebes, da wo die Nadeln, die mit den Schläuchen in Verbindung stehen, eingestochen werden,

einfließt. Die Immunisierungstiere werden dauernd beobachtet und es wird ihr Körpergewicht festgestellt.

Nach der Einverleibung kleinerer und größerer Mengen des virulenten Blutes pflegt bei den Immuntieren eine allgemeine und lokale Reaktion, verbunden mit Temperatursteigerung, selten zu fehlen. An der Injektionsstelle tritt eine mehr oder minder starke Schwellung auf, die indessen innerhalb 2—3 Tagen sich wieder zurückbildet. Die Temperatur ist während 18—24, oft auch nach 36 Stunden erhöht, soll dann aber zur Norm zurückkehren. Auch die allgemeinen Reaktionserscheinungen, bestehend in Abgeschlagenheit und Freßunlust, müssen dann wieder verschwunden sein, wenn es sich um eine reine Reaktion auf die Einverleibung der Rinderpestmikroben handelt. Nur solchen Tieren, welche völlig normale Verhältnisse aufweisen, wird in Zwischenräumen von 8—14 Tagen eine neue Injektion virulenten Blutes gemacht. Die Dosierung ist verschieden, je nachdem man die Methode von Kolle und Turner oder von Nicolle und Bitter und Todd anwendet (Fig. 2 und 3).

Was nun den Zeitpunkt der Entnahme des Serums betrifft, so muß man daran festhalten, die Blutung zum Zwecke der Serumgewinnung 10 bis 14 Tage nach der letzten Injektion des virulenten Injektionsstoffes, wenn die Tiere wiederum völlig normal sind, vorzunehmen. Es werden den Tieren 4—5 l Blut, je nach Größe und Kräftezustand auf einmal entnommen. Wenn die Tiere kräftig sind, kann man mit Zwischenräumen von 2 Tagen diese Blutungen zweimal wiederholen. Andere Autoren ziehen es vor, zur Blutentnahme einen Zwischenraum von 6—7 Tagen zu lassen. Jedenfalls müssen aber, nachdem die Tiere dreimal geblutet sind, unter allen Umständen neue, eine oder mehrere Injektionen virulenten Blutes erfolgen, da sonst der Wert des Serums zu rasch sinkt.

Um aus dem Blute möglichst große Mengen Serum zu gewinnen, sind verschiedene Verfahren empfohlen worden. Die einfachste Methode ist, das Blut spontan gerinnen zu lassen, und das Serum, sobald es sich abgeschieden hat, abzugießen.

In dem Blutkuchen ist stets noch eine große Menge Serum enthalten, welches nur durch Pressen erhalten werden kann. Für diesen Zweck hat man verschiedene Flaschenapparate angegeben. Man kann das Serum auch durch Zentrifugieren gewinnen, indem man das Blut zunächst defibriniert und nun aus dem defibrinierten Blut das Serum durch Zentrifugieren abtrennt. Das Serum wird in größere Gefäße abgefüllt und dort mit soviel 5%iger Karbolsäurelösung vermischt, daß ein Gehalt des Serums von 0,5% Phenol zustande kommt. Es wird dann in Flaschen, die aus braunem Glase hergestellt sind und am besten 100—200 ccm Inhalt haben, abgefüllt.

Wertbestimmung des Serums.

Für fast alle Serumpräparate ist eine exakte Wertbestimmungsmethode eine unerläßliche Vorbedingung sowohl für die Kontrolle der Methode der Hochtreibung der Immunität wie für die praktische Verwendbarkeit eines Serums. Das für die praktische Wertbestimmung des Serums einzig in Frage kommende Tier ist das Rind. Es sind ja zwar auch noch andere Tiere für Rinderpest empfänglich. Die gewöhnlichen Versuchstiere, namentlich Vögel, ferner Hunde, Katzen, Esel, Kaninchen, Meerschweinchen, Mäuse und Ratten, besitzen allerdings eine vollkommene natürliche Immunität gegen Rinderpest. Auch Schafe und Ziegen sind

Fig. 2. Entnahme von Blut aus der Vena jugularis des gefesselten Tieres in das zur Serumgewinnung bestimmte Gefäß.

Fig. 3. Hofraum zur Fesselung der Immuntiere und Blutentnahme für die Serumgewinnung.

für das Rinderpestkontagium nicht so empfänglich, daß sie zur Wertbestimmung des Serums benutzt werden könnten. Ähnlich liegen die Verhältnisse für Antilopen, Büffel, Kamele und Schweine. Diese Tiere können zwar gelegentlich spontan an Rinderpest erkranken oder experimentell infiziert werden, aber sie sind teils zu schwer zu erhalten, teils zu ungleich empfänglich, als daß sie für praktische Immunisierungsversuche benutzt werden könnten.

Aber mit Rücksicht auf die Unterschiede in der Empfänglichkeit, welche bei verschiedenen Rassen der Rinder für Rinderpest vorhanden sind, ist es notwendig, zur Wertbestimmung völlig empfängliche, gesunde, namentlich mit den Blutinfektionserregern nicht behaftete Tiere zu benutzen.

Das Serum wird in folgender Weise auf seinen Gehalt an Immunstoffen geprüft. 10—12 möglichst gleich große, kräftige, nicht zu junge Tiere von möglichst gleichem Körpergewicht werden mit je 1 ccm virulenten Blutes injiziert und es erhalten 3 Tiere Dosen des Serums entsprechend 15 ccm für je 300 kg lebendes Gewicht.

10 oder 12 Tiere werden mehrere Tage lang beobachtet, und ihre Temperaturen werden festgestellt. Nachdem darauf ihre Gewichte ermittelt sind, wird jedes Tier mit 1 ccm virulenten Blutes injiziert und zu gleicher Zeit werden injiziert:

3 Tiere mit Dosen des Serums entsprechend 15 ccm für je 300 kg lebendes Gewicht,

3 Tiere mit Dosen des Serums, entsprechend 20 ccm für je 300 kg lebendes Gewicht,

3 Tiere mit Dosen des Serums, entsprechend 25 ccm für je 300 kg lebendes Gewicht,

3 Tiere mit Dosen des Serums, entsprechend 30 ccm für je 300 kg lebendes Gewicht.

Es hat sich bei den ausgedehnten, von Kolle und Turner in Südafrika auf der Experimentalstation in Kimberley, sowie auch in den von Bitter und Todd im Seruminstitut zu Kairo ausgeführten Versuchen gezeigt, daß eine Titrierung bei Benutzung dieser Methode leicht gelingt. Wenn z. B. die Tiere, welche 15 ccm erhielten, sämtlich starben oder auch nur 2 davon, dann gibt für die Tiere, welche 20 ccm erhielten und mit dem Leben davonkommen, die Dose von 20 ccm den Titer des Serums an, denn in diesem Falle haben, wie die Erfahrung gezeigt hat, die mit 25 ccm injizierten Tiere nur leichte Attacken, während die Tiere der vierten Serie folglich gar nicht erkranken. Man wird sich hieraus eine Vorstellung des Prüfungsmodus machen können. Wer mit der Serumherstellung vertraut ist, sieht, wie eng sich dieses Verfahren an Ehrlichs Wertbestimmungsmethode anschließt. Die Einzelheiten eines solchen Serumversuches werden in das Kontrollbuch eingetragen, wobei der Versuch mit einer Nummer, entsprechend der Nummer des Serums, versehen wird. Es ist aus diesem Buch ersichtlich:

1. das Datum, an dem der Aderlaß der das Serum liefernden Tiere stattfand,
2. die Nummern der serumspendenden Tiere,
3. das Resultat der Wertbestimmung,
4. die Kontrollnummer.

Nachdem die Titrierung des Serums beendet ist, wird dasselbe in Flaschen abgefüllt, verkorkt, versiegelt, mit Stempel und Kontrollnummer versehen und ist nun zur Versendung fertig. Bei etwaigen Klagen muß die

Kontrollnummer stets angegeben werden. Mit Hilfe des Kontrollbuchs lassen sich dann alle Einzelheiten ausfindig machen. Die zur Prüfung benutzten Tiere werden, soweit sie eine milde Rinderpestattacke überstanden haben, zur Hochtreibung der Immunität benutzt.

Es sei noch auf eine ganz brauchbare Methode zur Ermittlung des Gewichts von Rindern hingewiesen, die für alle Fälle in Frage kommt, wo man keine Wage zur Verfügung hat. Diese Methode wurde von Dr. G. Turner ausgearbeitet und bedient sich folgender Formel: Wenn g den Umfang eines Tieres, hinter dem Schulterblatt gemessen, darstellt l die Länge des Tieres von dem letzten Halswirbel bis zum Kreuzbein, w das gesuchte Gewicht bedeutet, so ist $w = \frac{g^2 : l}{0{,}142}$. Mit Hilfe dieser Formel läßt sich ziemlich sicher auch ohne Wage das Körpergewicht eines Tieres ermitteln. Was nun die Haltbarkeit des Serums betrifft, so ist dieselbe eine langdauernde. Das seinerzeit im Jahre 1898 in Kimberley hergestellte Rinderpestserum erwies sich im Jahre 1904 bei Ausbruch der Rinderpest in Egypten als wirksam. Es hatte also seine spezifischen Eigenschaften fast 5 Jahre bewahrt. Das Rinderpestserum kann auch in trockenem Zustande aufbewahrt werden und behält auch in dieser Form seine Wirksamkeit. Man muß nur immer im Auge behalten, daß das trockene Serumpräparat, auch wenn es in luftleeren Flaschen aufbewahrt wird, im Laufe der Zeit — zwischen 12 und 18 Monaten — seine Löslichkeit zu verlieren pflegt. Es dürfte deshalb der Aufbewahrung des Serums in flüssigem Zustande der Vorzug zu geben sein.

Was nun die spezifischen Eigenschaften des Rinderpestserums betrifft, so ist uns der Rinderpesterreger noch nicht bekannt und wir sind deshalb nicht in der Lage, ähnliche experimentelle Studien zur Klärung der Wirksamkeit des Serums vorzunehmen, wie dies mit andern Serumpräparaten, die mit rein gezüchteten Mikroben hergestellt sind, der Fall ist. Deshalb sind wir über diese Fragen noch ziemlich im Unklaren. An Tatsachen läßt sich nur feststellen, daß das Rinderpestserum

1. den Rindern eine langdauernde Immunität gegen Infektion mit Rinderpest verleiht. Diese Wirksamkeit ist eine spezifische. Es wurde experimentell von Kolle und Turner festgestellt, daß 100—200 ccm hochwertigen Serums eine über 3 Monate sich erstreckende Immunität gesunden Rindern zu verleihen imstande sind. Ganz gleiche Erfahrungen wurden in Bestätigung dieser Versuche später in Egypten durch Bitter und Todd gemacht.

Es ist bekanntlich namentlich von Robert Koch empfohlen worden, die Bekämpfung der Rinderpest an Orten, wo andere Methoden nicht heranzuziehen sind, in der Weise vorzunehmen, daß eine Zone von immunen Tieren durch passive Immunisierung aller empfänglichen Rinder in einem bestimmten Distrikte oder Lande mit Hilfe der Seruminjektion allein gebildet wird.

Wie die Erfahrungen in Egypten 1904—1905 namentlich gezeigt haben, kann mittels dieser von Koch empfohlenen Serumimmunisierung jedenfalls ein praktischer Erfolg in der Bekämpfung der Rinderpest erzielt werden. Störend für die Durchführung der passiven Immunisierung im großen Umfange ist allerdings die verhältnismäßig erhebliche Menge Serum, welche zur Erzielung einer längerdauernden Immunität (50 bis 100 ccm) notwendig ist.

2. Das Rinderpestserum besitzt aber auch eine ausgezeichnete Heilkraft. Es ist von allen Experimentatoren, die mit Rinderpestserum ge-

arbeitet haben, festgestellt, daß es mit genügend großen Dosen des Serums gelingt, nicht nur Rinder, welche sich in der Inkubationszeit befinden, also schon infiziert sind, sondern auch Rinder, die bereits Krankheitssymptome aufweisen und Fieber haben, durch Injektion genügend großer Mengen des Serums am Leben zu erhalten.

3. Das Rinderpestserum, zusammen mit dem Infektionsstoff letzterer an einer anderen Körperstelle gesunden Rindern einverleibt, hat die Entwicklung einer nicht zum Tode führenden leichten Rinderpestattacke zur Folge. Es wird das Rinderpestserum auf Grund dieser Beobachtungen, die namentlich von Kolle und Turner wissenschaftlich durchgearbeitet sind, zur sog. kombinierten Immunisierung in Form der Simultanmethode in weitem Umfange angewendet. Wird das Serum 12—24 Stunden vor der Injektion gegeben, so ist der Ablauf dieser modifizierten Rinderpestattacke nicht so typisch und regelmäßig wie bei Benutzung der Simultanmethode. Wird das Serum 12—24 Stunden nach der Injektion gegeben, so werden die Resultate noch unsicherer, namentlich gehen bei Benutzung dieser Methode ein größerer Prozentsatz Tiere zugrunde als bei der Simultanmethode, bei der die Verluste 1—2 % betragen.

Fig. 4. Inneres des Laboratoriums für mikroskopische und bakteriologische Arbeiten in Kimberley.

4. Mischt man Rinderpestserum mit dem Infektionsstoff und läßt das Gemenge im Reagenzglase längere Zeit stehen, so wird der Infektionsstoff durch das Serum abgetötet, wie sich durch Injektion des Gemenges in empfängliche Versuchstiere nachweisen läßt. Die Tiere erkranken nach Injektion des Gemisches von Serum und Infektionsstoff nicht und erweisen sich auch bei der nachfolgenden Prüfung als nicht immun.

Auf Grund dieser Tatsachen können wir über die Eigenschaften des Rinderpestserums folgendes feststellen:

Das Rinderpestserum enthält antiinfektiöse Stoffe spezifischer Art, welche gesunden Rindern eine ausgesprochene Schutzwirkung im Tierkörper gegen die Infektion verleihen, und die eine ausgesprochene Heil-

wirkung bei infizierten Tieren zu Beginn der Infektion besitzen. Das Serum wirkt auch im Reagenzglas auf die spezifischen Erreger ein. Es

Fig. 5. Vorrichtung der Versuchsstation in Kairo zur Injektion des virulenten Blutes bei den Immuntieren zwecks Hochtreibung der Immunität nach BITTER u. TODD. Das virulente Blut fließt von dem an der Decke angebrachten Gefäß gleichzeitig unter eigenem Druck durch 4 Schläuche in das Subkutangewebe.

hat sich, da der Rinderpesterreger bisher noch unbekannt ist, indessen nicht feststellen lassen, welcher Art diese antiinfektiösen Stoffe sind.

Praktische Ratschläge für die Einrichtung eines Seruminstituts.

Die Herstellung des Rinderpestserums geschieht am besten in einer Zentralstation, deren Einrichtung auf Grund der in Südafrika, Egypten und auf den Philippinen gemachten Erfahrungen folgenden Gesichtspunkten Rechnung tragen muß:

1. Zur Ausführung der mikroskopischen Untersuchungen, sowie für bakteriologische Arbeiten, die sich auf Kontrolle der Sterilität des Blutes und wissenschaftliche Untersuchungen in Verbindung mit der Immunitätsforschung beziehen, ist ein Laboratorium notwendig, welches mit den gewöhnlichen bakteriologischen Apparaten versehen ist (Fig. 4).

2. In Verbindung mit diesem Laboratorium ist ein größerer Raum herzustellen, in dem Autoklaven und Trockensterilisierungsapparate untergebracht werden, um die Instrumente, Gefäße und Apparate, die zur Serumherstellung benötigt werden, keimfrei zu machen.

Fig. 6. Stallungen zum Schutze der Immuntiere während der Reaktionen. Rinderpest-Versuchsstation in Kimberley.

3. Für die Vornahme der Infektionen bei den immunisierten Tieren, welchen zwecks Hochtreibung der Immunität größere Mengen Blut injiziert werden müssen, empfiehlt es sich, einen besonderen Raum mit Dach und Oberlicht zu konstruieren, in welchem eine Vorrichtung, wie sie auf beiliegender Figur abgebildet ist, für die Ruhestellung der Tiere während der Injektion angebracht ist. Man kann das Blut entweder mit großen Spritzen injizieren, oder aber aus Gefäßen, welche über dem Tierstand angebracht sind, unter eigenem Druck in das Unterhautzellgewebe fließen lassen. Die auf der Figur abgebildete Einrichtung hat sich nach Angaben von Bitter und Todd in Kairo sehr bewährt (Fig. 5).

4. Für die Entnahme sowohl des virulenten Blutes, bei welcher die Tiere zu Tode geblutet werden, sowie auch zur Gewinnung des Serums ist ein größerer Hofraum oder eine größere Halle erforderlich. Die Tiere werden am besten gefesselt und zu Boden geworfen. Die Blutentnahme für die Gewinnung des Serums erfolgt aus der Vena jugularis, während die Tiere, welche das virulente Blut liefern sollen, aus der Arteria carotis entblutet werden.

5. Zur Aufbewahrung des virulenten Blutes, sowie zur Aufnahme der Gefäße, in welchen sich das Serum aus dem gewonnenen Blute abscheiden soll, ist ein Kühlraum anzubringen, der bei grösseren Betrieben nicht zu klein sein darf.

Fig. 7. Ansicht der Versuchsstation mit Isolierstall.

6. Es müssen Stallungen für die Immunisierungstiere hergerichtet werden. In wärmeren Ländern ist es zwar nicht notwendig, alle Tiere dauernd in Stallungen unterzubringen, weil die Tiere an den Aufenthalt im Freien gewöhnt sind. Aber während des Ablaufes der Erkrankung, die sich nach der Simultanmethode einstellt, sowie bei den Reaktionen, welche der Einverleibung des virulenten Blutes bei Anwendung von Hochtreibungs - Verfahren folgen, braucht man Stallungen. In der großen Versuchsstation in Kimberley, in welcher zur Zeit mehr als 100 Immunisierungstiere gleichzeitig vorhanden waren, von denen ungefähr der dritte Teil gleichzeitig dem Immunisierungsverfahren unterworfen wurde, wurde ein großer Stall in Zeltform eingerichtet, so daß die Wände leicht entfernt werden konnten, um den Tieren Schatten und zugleich frische Luft zu gewähren (Fig. 6).

7. Zur Beobachtung der frischen

Tiere, die dauernd von auswärts zur Gewinnung des virulenten Blutes und zur Ergänzung der Immuntiere herbeigeschafft werden müssen, empfiehlt es sich, einen abgesonderten Stall einzurichten, dessen Größe sich nach der Anzahl der Immuntiere richtet (Fig. 7).

In Verbindung mit einem Obduktionsraum, in dem jedes gestorbene Tier genau untersucht werden kann, ist eine Kadaververnichtungsanstalt oder ein großes Grab anzulegen zur Beseitigung von Kadavern.

Der Betrieb einer solchen größeren Station läßt sich nur mit einem größeren Personal durchführen, bei dem ein wissenschaftlich gebildeter Tierarzt, sowie ein Aufseher nicht fehlen dürfen. Zur Listenführung sowie zur Aufstellung der Temperaturkurven und Führung der Journale wird ein Bureau eingerichtet, in dem ein Sekretär mit Gehilfen die nötigen schriftlichen Arbeiten besorgt. An der Spitze einer solchen Serumstation sollte ein erfahrener Bakteriologe stehen, der mit den Immunisierungsmethoden im allgemeinen und mit der Herstellung des Rinderpestserums im besonderen vertraut ist.

Literatur.

Anderson, Outbreak of cattle plague in Rina. Ind. med. Gaz., Vol. XXXVI. Ref. Baumgartens Jahresber. 1901, Bd. XVII.

Annual report of the imperial bact. for the year 1898—1899. Kalkutta 1899.

Bitter, Bulletin quarantenaire 1903.

Bitter u. Todd, Reports to the Egyptian Government. Kairo 1908.

Bitter, Internationaler Kongreß für Tierheilkunde. Budapest 1906.

Carré und Fraimbault, Note sur la contagiosité de la peste bovine au porc. Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, Tome XII, pag. 848.

Dieckerhoff, Geschichte der Rinderpest und ihre Literatur. Berlin 1890. Euslin.

Dschunkowsky und Kupzis, Über die Bereitung des trockenen Antirinderpestserums. Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVI.

Dudukalow, Die Rinderpestschutzimpfungen als Mittel zur Bekämpfung der Rinderpest (russisch). Ref. Baumgartens Jahresber. 1900, Bd. XVI.

Friedberger und Fröhner, Lehrbuch der spez. Pathologie und Therapie. Stuttgart 1900. Enke.

Gerlach, Die Rinderpest. Hannover 1867. Schmorl & v. Seefeld.

Hutcheon, Rinderpest in South-Afrika. The Journal of compar. path. London 1902.

Jobling, Prelim. report of the study of Rinderpest of cattle and carabaos in the Philippine Islands. Manila 1903.

Koch, R., Berichte über seine in Kimberley gemachten Versuche bezüglich Bekämpfung der Rinderpest (Kap der guten Hoffnung, Agrikulturdepartement). Centralbl. für Bakt., Bd. XXI, Nr. 13 und 14.

Ders., Bericht über seine in Kimberley ausgeführten Experimentalstudien zur Bekämpfung der Rinderpest. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 15 und 16.

Ders., Reiseberichte. Berlin 1898. J. Springer.

Kohlstock, Die sanitären Maßnahmen gegen die Rinderpest in Südwestafrika. Deutsches Kolonialblatt, Jahrg. 8, 1897, Nr. 22. 15. Nov. Ref. Centralbl. für Bakt., Bd. XXII, Nr. 24/25, pag. 787.

Ders., Die Bekämpfung der Rinderpest in Deutsch-Südwestafrika. Deutsche militärärztliche Zeitschr. 1898.

Kolle, W., Weitere Studien über Immunität bei Rinderpest. Deutsche med. Wochenschrift 1898, Nr. 25.

Ders., Beiträge zur Klärung der Frage über die Wirkungsweise der Rinderpestgalle. Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankh., Bd. XXX, pag. 33.

Ders., Beiträge zur Serotherapie. Berliner klin. Wochenschr. 1899, Nr. 24.

Ders., Rinderpest. Ergebnisse der allgemeinen Pathologie usw. von Lubarsch und Ostertag 1901 (6. Jahrg. 1899).

Kolle, W. und Turner, G., Über den Fortgang der Rinderpestforschungen in Kochs Versuchsstation in Kimberley. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 50 u. 51.

Dies., Über Schutzimpfungen und Heilserum bei Rinderpest. Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankh., Bd. XXIX, pag. 309.

Krause, Zur Kochschen Rinderpestimpfung. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 39, pag. 630.
Lingard, Reports to the Indian Government. Governments Printings.
Maberly, The Rinderpest in South-Africa. The Lancet 1898, 5. Nov.
Mense, cit. nach Sobernheim, pag. 286.
Nencki und Sieber, Zur Ätiologie der Rinderpest. St. Petersburger Archiv für Veterinärwiss., Heft 7, pag. 309.
Nencki, Sieber und Wyznikiewicz, Untersuchungen über Rinderpest. Centralbl. für Bakt., Bd. XXIII, Nr. 13.
Dies., Über die Rinderpest. Berliner klin. Wochenschr. 1897, Nr. 24.
Dies., Recherches sur la peste bovine. Arch. des sciences biol. St. Petersbourg 1898, Tome VI, pag. 374 und 1899, Tome VII, pag. 303.
Dies., Die Immunisation gegen Rinderpest nach den im Institut für experimentelle Medizin in St. Petersburg und auf der Station „Iknewi“ im Gouvernement Tiflis gesammelten Erfahrungen. Arch. intern. de pharm. Vol. V, Fasc. 5 u. 6.
Nicolle und Adil-Bey, Études sur la peste bovine. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, 1901, 1902.
Nikolski, Schutzimpfung bei Rinderpest (russisch). Ref. Baumgartens Jahresber. 1901, Bd. XVII.
Réfik-Bey, Modifications leucocytaires dans la peste bovine. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902.
Réfik-Bey und Réfik-Bey, La peste bovine en Turq. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII, pag. 596.
Reinhard, Bemerkungen zu Kochs Berichten. Münchener med. Wochenschr. 1897, pag. 324.
Ders., Zuschriften aus Prätoria an die Münchener med. Wochenschr. 1897, Nr. 34, pag. 953 und Nr. 37, pag. 1033.
Rogers, Experiment. Untersuchungen über die verschiedenen Methoden der Schutzimpfung usw. Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankh. 1900, Bd. XXXV.
Ders., Report on an experiment. investigation of the methods of inoculation ag. Rinderpest usw. Calcutta 1900.
Semmer, Ätiologie der Rinderpest und die Bekämpfung dieser Seuche. Deutsche Zeitschr. für Tiermed., Bd. XXII, pag. 32.
Sobernheim, Neuere Forschungen auf dem Gebiete der Rinderpest. Arch. für Schiffs- und Tropenhygiene 1900, Bd. IV.
Tartakowski, Zur Empfänglichkeit der Kamele für einige Infektionskrankheiten. Journal der russ. Gesellschaft für Volksgesundheitspflege. St. Petersburg 1899.
Ders., Contribution à l'étiologie de la peste bovine. Arch. des sciences biol. St. Petersbourg 1896, Tome IV, Nr. 3, pag. 295.
Theiler, Rinderpest in Südafrika. Schweizer Archiv für Tierheilkunde, Bd. XXXIX, pag. 49.
Ders., Rinderpest in Südafrika. Daselbst 1897, Bd. XXXIX, pag. 49.
Ders., Experimentaluntersuchungen über Rinderpest. Daselbst 1897, Bd. XXXIX, pag. 193.
Ders., Blutserum immuner Tiere im Kampfe gegen die Rinderpest. Deutsche tierärztliche Wochenschr. 1890, Nr. 24.
Ders., Das Wiedererscheinen der Rinderpest und die Erfolge der Schutzimpfung in Südafrika. Monatshefte für prakt. Tierheilkunde 1901, Bd. XIII.
Tokishige-Inigakushi, Derzeitige Resultate von Immunisierungsversuchen gegen die Rinderpest. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1897, Nr. 27.
Woronzew und Eckert, Die Rinderpest bei Schafen und Ziegen (russ). Beilage zum Journal für öffentl. Veterinärmed. 1896. Ref. Baumgartens Jahresber. 1896, Bd. XII, pag. 692,
Zuschrift aus Senekal (Oranje-Freistaat) an die Münchener med. Wochenschr. 1897.

XXVIII.

Serum gegen Schafpocken (Serovaccination).

Von

Dr. C. Levaditi,

Laboratoriumsvorsteher am Institut Pasteur in Paris.

Diese unter dem Namen „Clavelée" bekannte in Südfrankreich und namentlich auch in Algier und Tunis weit verbreitete Seuche, charakterisiert sich durch heftiges Fieber, Schwellung und Rötung des Kopfes und einen mehr oder weniger reichlichen pustulösen Ausschlag an den äußeren Bedeckungen. Die Krankheit ist hochgradig-kontagiös; dies und die hohe Mortalität (50—60 %) macht sie zum Schreckgespenst des Schafzüchters und verleiht therapeutischen, namentlich aber prophylaktischen Maßnahmen große nationalökonomische und auch wissenschaftliche Bedeutung; wir werden sehen, daß auch vom rein mikrobiologischen Standpunkt aus die Clavelée zu den interessantesten Infektionskrankheiten gehört.

Die Beobachtung hat gelehrt, daß die endemischen Herde des französischen Südens (Camargue und Crau) dadurch unterhalten werden, daß aus Algier immer frisches Infektionsmaterial in Gestalt von kranken oder in Genesung befindlichen Tieren eingeführt wird. Dies geschieht zu gewissen Jahreszeiten, wenn die einheimischen Herden in den Alpen grasen. Kehren diese Herden auf ihre, inzwischen von afrikanischem Vieh benutzten Weideplätze und Hürden zurück, so ist eine Infektion unvermeidlich.

Nocard hat seinerzeit empfohlen, die bedrohten Herden einem der Jennerschen Impfung analogen Verfahren zu unterwerfen. Aber die Resultate dieser „Clavelisation" waren in anbetracht des in seiner Virulenz inkonstanten, unkontrollierbaren Virus wenig zufriedenstellend.

Später war es namentlich Borrel[1]), der durch ausgedehnte und sorgfältige Untersuchungen am Pasteurschen Institut dem Studium der Clavelée gänzlich neue Wege gewiesen hat. Borrel konnte feststellen, daß das Schafpockenvirus zu den unsichtbaren Mikroorganismen gezählt werden muß, daß es durch gewisse Porzellanfilter filtrierbar ist und daß durch Injektion reinen Materials ein Antiserum erzeugt wird, das heilende und präventive Eigenschaften hat.

Im nachfolgenden werden wir uns daher auf die Darstellung der Borrelschen Anschauungen beschränken, da sie diejenigen sind, die zur Förderung der Frage wohl ohne Zweifel am allermeisten beigetragen haben.

Das Virus, dessen Eigenschaften, Gewinnung.

Nach Borrel und den meisten anderen Autoren, die sich damit beschäftigt haben, gehört der supponierte Erreger nicht zu den im Kreislauf lokalisierten resp. dort sich vermehrenden Mikroben.

Das Blut eines kranken Tieres ist in keinem Stadium der Krankheit geeignet, diese auf ein anderes Schaf zu übertragen. Bosc ist der einzige, der auf Grund eines positiven Impfversuches mit 200 ccm Blut anderer Ansicht ist. Sein Versuch ist jedoch, wie Borrel richtig bemerkt, möglicherweise nicht ganz einwandfrei.

Ebensowenig wie im Blut scheint der Schafpockenerreger in den mit der Hautaffektion zugleich anschwellenden Lymphdrüsen lokalisiert zu sein, was, im Gegensatz zu Borrel, ebenfalls von Bosc behauptet wird.

Der Ort der Entwicklung und des Wachstums ist vielmehr die Hautpustel, aus der man bei geeigneter Technik in bequemer und sicherer Weise das Virus gewinnen kann.

Der Erreger der Schafpocken gehört, wie schon bemerkt, zu den filtrierbaren Mikroorganismen, also, von diesem Gesichtspunkte aus, in die gleiche Kategorie mit den Erregern der Rinderperipneumonie (Roux, Nocard und Borrel), der Maul- und Klauenseuche (Löffler), der Lyssa (Celli, Remlinger, Scheider) u. a.

Daß das Schafpockengift in der Tat gewisse Porzellanfilter anstandslos passiert, hat Borrel durch folgende Versuche bewiesen, deren Technik ein etwas längeres Verweilen erheischt:

Da die Erfahrung lehrt, daß sowohl das Virus der Peripneumonie als auch das der Maul- und Klauenseuche um so schlechter filtriert, je reicher das Suspensionsmedium an Eiweiß ist, muß man auch für die Schafpocken ein möglichst eiweißarmes Ausgangsprodukt zur Verfügung haben. Borrel empfiehlt zu diesem Zweck die Ausschabung von Hautpusteln inklusive der Regio papillaris bei einem schon mehrere Stunden vorher gefallenen Tier; dadurch vermeidet man, daß Blut ins Material gelangt.

Der Ertrag einer Pustel von ungefähr 5—6 cm Durchmesser wird mit 100 cm Leitungswasser aufgeschwemmt und durch gewöhnliches Fließpapier vorfiltriert; die suspendierten gröberen Gewebsstückchen würden sonst die Poren des Porzellanfilters leicht verlegen. Mit der so erhaltenen Flüssigkeit, die ganz außerordentlich virulent ist (da sie in einer Verdünnung von 1:100000 noch imstande ist, bei kutaner Applikation beim Schaf eine Pustel an der Impfstelle zu erzeugen), wird nun eine Chamberlandkerze, ein Berkefeldfilter oder ein Garros-scher Filtriertrichter in nachstehender Weise beschickt.

a) Porzellankerzen nach Chamberland (Fig. 1, *A*).

Es gelangen vier verschiedene Modelle zur Verwendung, die Borrel mit F^2, F^3, F^4 und F^{10} bezeichnet. Dies heißt, daß jede dieser Kerzen

2-, 3-, 4- und 10mal soviel Filtrat pro Zeiteinheit liefert, wie eine gewöhnliche F-Kerze.

In ein genügend weites Reagenzglas *a*, dessen unteres abgeschnürtes Ende ein spitz ausgezogenes Abflußrohr *e* trägt, wird die Porzellankerze *b* mittelst eines Watterings fest eingesetzt. Ihr oberes Ende wird, nachdem die zu filtrierende Flüssigkeit in die Höhlung eingefüllt ist, durch einen Gummipfropf *d* verschlossen. Letzterer trägt ein kurzes Glasrohr, das mit einer Druckbirne *f* in Verbindung steht. Ein mäßiger Druck genügt, um die Flüssigkeit durch die poröse Tonwand in das Glas *a* durchtreten zu lassen.

b) Berkefeldfilter (Fig. 1, *B*).

Man bedient sich des kleinen Modelles mit metallischem Ansatzstück. Ein ziemlich weites Glasrohr *a*, dessen unteres Ende in eine seitlich ausgezogene feine Spitze *e* ausläuft, trägt in seinem mittleren Teil eine starke Einschnürung *c*, durch die das metallene Ansatzrohr des Filters in den unteren Teil des Glases eingeführt und mit Rohwatte festgezwängt wird. In dessen oberen Teil, der nun das eigentliche Filter beherbergt, wird die zu filtrierende Flüssigkeit eingefüllt, das Glasrohr mit einem Kautschukstöpsel *d* verschlossen und wiederum durch eine Druckbirne *f* ein leichter Überdruck hergestellt, der die Flüssigkeit durch das Filter und das Ansatzrohr in den Teil *a* treibt.

Fig. 1. Porzellanfilter. *A* nach Chamberland, *B* nach Berkefeld, *C* nach Garros.

c) Filtriertrichter nach Garros (Fig. 1, *C*).

Diese Trichter werden aus gebrannter sog. Asbesttonerde hergestellt. Ihre Wandstärke beträgt ca. 2 mm. Um das Filter genügend porös zu machen, empfiehlt Borrel das Brennen bei sehr hoher Temperatur vorzunehmen. Der mit Wasser getränkte Trichter soll leicht durchscheinend sein. Filtriert wird folgendermaßen:

Ein gewöhnlicher Glastrichter *b* wird in der oberen Öffnung des Glasgefäßes *a* mittelst etwas Watte *d* befestigt. In den Glastrichter kommt das Garrossche Filter *c*. Das Filtrat wird durch den Ansatz *e* abgelassen. Die Filtration erfolgt bei atmosphärischem Druck.

Bei diesen Versuchsanordnungen gelang es Borrel mehrfach, die Filtrierbarkeit des Virus der Schafpocke nachzuweisen, und zwar 3mal von 10 bei Anwendung von Berkefeldkerzen und Garrosschen Trichtern, stets bei Benutzung der Chamberlandkerzen F^4 und F^5, seltener F^2 und F^3; dagegen niemals, wenn durch die gewöhnliche F-Kerze filtriert wurde.

Das Filtrat gezüchtet auf den verschiedensten Nährböden bleibt steril, wenn man zur Herstellung der Emulsion abgekochtes Wasser verwendet. Nimmt man dagegen rohes Wasser, so erweisen sich häufig die betreffenden Filtrate als nicht steril. Nach kurzem Stehen bei 20° C hat Borrel in solchen Flüssigkeiten kleinste Vibrionen (Wasservibrionen) und ein Protozoon, den Micromonas Mesnili, gefunden; beide Lebewesen sind äußerst lebhaft beweglich.

Aus dem letzterwähnten Befunde ergibt sich, daß die Filtrierbarkeit eines Virus bei der beschriebenen Versuchsanordnung durchaus kein strikter Beweis für die „Unsichtbarkeit" des betreffenden Erregers ist. Bei den Schafpocken handelt es sich also möglicherweise um ein sehr kleines an der Grenze der Sichtbarkeit liegendes Lebewesen (Bacterium oder Protozoon), dessen schnelle Eigenbewegung seinen Durchtritt durch die Poren des Porzellans ermöglicht.

Die Gewinnung des Virus im Großen und seine Konservierung.

Angesichts der Unmöglichkeit, den Schafpockenerreger in vitro zu kultivieren, ist man gezwungen, zur Gewinnung größerer Mengen für Immunisierungszwecke den kostspieligen Weg der Tierpassage zu beschreiten.

Borrel hat zu diesem Zwecke versucht, Virus in die Brustdrüsen milchender Schafe zu injizieren, ist aber von dieser Methode wieder abgekommen, da die Milch zwar infektiös wird, bei der Reinjektion aber nur sehr langsam zur Resorption gelangt. Auch die Pleura hat sich als ungeeigneter Herstellungsort für größere Mengen Lymphe herausgestellt. Jetzt bedient sich Borrel ausschließlich der subkutanen Injektion zur Gewinnung dieser als „Claveau" bezeichneten Lymphe. Er verfährt folgendermaßen:

Ein Kubikzentimeter eines reinen durch Abschaben einer gewöhnlichen Pustel gewonnenen Virus wird mit 500 ccm physiologischer Kochsalzlösung (7,5 ‰) verdünnt. Mit Hilfe einer langen Kanüle werden 300—400 ccm dieser Aufschwemmung unter die vorher sorgfältig glatt rasierte Bauchhaut eines jungen Schafes gebracht und zwar in der Weise, daß durch Hin- und Herschieben der Nadel in verschiedenen Richtungen, das Virus möglichst gleichmäßig verteilt wird. Das Tier bleibt etwa noch eine Stunde liegen, um die vollständige Resorption zu sichern.

Gegen Ende des vierten Tages beginnt sich an der Injektionsstelle eine leichte Schwellung auszubreiten. Dies ist der Anfang der Pustelbildung, welche ihr Maximum am 8. Tage erreicht. Ihre Oberfläche soll dann ungefähr 80 qcm betragen. In diesem Stadium wird das Tier durch Stich in die Oblongata getötet und die Pustel in folgender Weise weiter verarbeitet:

Mit einem Thermokauter wird die ganze affizierte Hautpartie so umfahren, daß ein geschlossener Ring entsteht. Innerhalb dieses Ringes werden die oberflächlichen Epithelschichten bis auf das Stratum Malpighii glatt abgetragen; die so gebildete Wundfläche wird tüchtig ausgeschabt und die austretende Flüssigkeit mit einer großen Kugelpipette abgesaugt. Dann wird das ödematöse Gewebe bis auf die Muskelfaszie steril abpräpariert und in toto zerrieben.

Borrel benutzt zu diesem Zweck einen von ihm angegebenen Zerreibungsapparat, der auch zur Herstellung von Bakterien- und Zellemulsionen dient. (Fig. 2.)

Ein Metallzylinder *a* mit abschraubbarem Glasdeckel *b* ist auf der Unterlage *c* unbeweglich montiert. Durch den Zylinder geht eine bewegliche Achse *d*, die ein System von fünf dünnen, sehr elastischen Metallplatten *m* trägt, deren Breite größer ist als der Radius des Zylinderquerschnittes. Eine einfache Transmissionsvorrichtung *e* am freien Ende der Achse gestattet, den Apparat durch einen Elektromotor in Betrieb zu setzen. Das zu zerreibende Material wird zwischen die einzelnen Flügelblätter *m* eingefüllt und der Druck der rotierenden Flächen gegen die Zylinderwandung durch Variieren der Tourenzahl des Motors in einfachster Weise reguliert: je größer der letztere, desto größer jener Druck, desto energischer also die gewünschte Wirkung. Natürlich muß der leere, sorgfältig gereinigte und getrocknete Apparat vor dem Gebrauch sterilisiert werden. Man wickelt ihn am besten in Filtrierpapier und bringt ihn in einen der üblichen Trockenheizöfen (four Pasteur).

Fig. 2. Zerreibungsapparat nach Borrel.

Fig. 3. Latapies Apparat zur Herstellung von Organbrei.

Das gleiche Resultat wie mit der Borrelschen Vorrichtung erreicht man auch mit dem Apparat von Latapie. (Fig. 3.)

Ein Metallzylinder *a*, mit einer durch aufschraubbaren Deckel *g* verschlossenen Öffnung *b*, trägt an einer seiner Stirnseiten einen Piston-

kolben *c*, der durch Drehen einer Schraube in das Innere des Zylinders vorgetrieben werden kann. Am anderen Ende befindet sich ein rotierendes Messersystem, das durch die Handhabe *d* in Bewegung gesetzt wird. Das Rohr *e* gestattet beliebige Mengen physiologischer Salzlösung in die Gegend des Messers zu bringen, wenn der Apparat im Gang ist. Das Ganze ist auf einem Grundbrett fest montiert.

Vor dem Gebrauch wird alles gut sterilisiert. Sodann bringt man das fein zerkleinerte Gewebe durch die Öffnung *b* in den Zylinder und preßt es mit dem Kolben allmählich gegen die Messer. Gleichzeitig wird Salzlösung durch *f* eingeführt und die entstehende Emulsion bei *e* aufgefangen.

Herstellung der Schafpockenlymphe (Claveau).

Nach Einbringung des, wie oben beschrieben, gewonnenen virulenten Gewebes in den BORRELschen Apparat, läßt man diesen so lange laufen, bis sich 100 ccm reiner Virus gebildet hat. Dann gibt man nach und nach ein Liter isotonischer Salzlösung in den Apparat. Mit der daraus wiedergewonnenen Flüssigkeit werden die ersten 100 ccm reinen Preßsaftes verdünnt. Diese Lösung ist das „Claveau“ BORRELS.

Man kann den Zerreibungsprozeß natürlich noch weiter fortsetzen und noch vorhandenes Virus durch allmählichen Zusatz von Spülflüssigkeit langsam auslaugen. Das so gewonnene Präparat kann zur Herstellung eines Antiserums Verwendung finden.

Konservierung der Lymphe.

Das Schafpockenvirus unterliegt schon bei gewöhnlicher Temperatur einer raschen Abschwächung. Bei 45° C wird es schon in ganz kurzer Zeit unwirksam, bei 37° genügen 48 Stunden, um es abzutöten (BORREL). Daher ist die beste Konservierungsmethode, die Lymphe in kleinen zugeschmolzenen Glasröhren auf Eis zu halten. Dieses Verfahren haben auch die Zentralbereitungsstellen zu befolgen, deren Aufgabe es ist, das Virus den Orten zuzuführen, wo Massenimpfungen stattfinden sollen. Da das Glyzerin die Wirksamkeit des Virus in kürzester Zeit sehr vermindert, darf es nur der Lymphe zugesetzt werden, die zum unmittelbaren Versand bestimmt ist. Solche glyzerinisierte Lymphe muß dann in den nächsten 8 auf die Absendung folgenden Tagen zur Verwendung gelangen (BORREL).

Konservierung des Virus im Blutegel.

BOSC[2]) in Montpellier empfiehlt folgendes Verfahren zur unbegrenzten Konservierung des Schafpockenvirus: An eine durch Skarifikation mit infektiösem Material erzeugte 8 Tage alte Pustel werden mehrere kräftige Blutegel angelegt. Nachdem sie wieder abgefallen sind, gibt man sie in ein Becherglas mit etwas Wasser und schützt sie vor Licht und Wärme am kühlen Ort. Entnimmt man zu verschiedenen Zeiten durch leichten Druck auf solchen Blutegel einen Topfen des aufgesaugten Blutes und verimpft ihn auf Schafe, so zeigt sich, daß das Blut mindestens 2 Jahre lang virulent bleibt.

Schutzimpfung gegen Schafpocken.

Aktive, gemischte und passive Immmunisierung Serumtherapie. therapie.

Schon seit geraumer Zeit ist verschiedentlich versucht worden, den Viehbestand vor den Verheerungen durch die Pockenkrankheit auf die Weise zu schützen, daß man — rein empirisch — ganze Herden mit einem abgeschwächten resp. verdünnten Virus impfte. Es entstehen dann unter günstigen Umständen nur lokale Pusteln an der Impfstelle, ohne weitere Ausbreitung des Prozesses, und das so behandelte Tier zeigt nach Abheilung des Geschwürs eine erhebliche Immunität gegenüber einer Infektion auf natürlichem Wege. Diese so ausgeführte „Clavelisation" ganzer Herden bringt jedoch viele Nachteile und Unzulänglichkeiten mit sich.

Es ist zur Stunde nicht möglich, mit voller Sicherheit ein so abgeschwächtes Virus herzustellen, daß es mit genügender Gleichmäßigkeit Pustelbildung hervorruft, ohne zur Allgemeinerkrankung zu führen. Selbst bei peinlichster Beobachtung aller von Borrel für die Herstellung und Konservierung ausgearbeiteten Vorschriften gelingt es nicht, größere Fehlschläge zu vermeiden, für die sowohl die verschiedene und wechselnde Empfänglichkeit verschiedener Schafrassen, als auch ganz besonders die Schwankungen in der Wirksamkeit der Lymphe verantwortlich gemacht werden müssen.

Bei entsprechenden Versuchen an einem großen Material wechseln tödlich verlaufende Infektionen mit Fällen ab, wo die übliche subkutane Injektion nicht die Spur einer Reaktion hervorruft. Diese Methode ist also für die Praxis nicht verwendbar, namentlich nicht, wenn es sich um eine so empfindliche Rasse handelt, wie den französischen Widder.

Dagegen ist sie, nach Borrel, sehr wohl geeignet für Algier und Tunis, weil die dortigen Tiere im allgemeinen wenig empfänglich sind und somit die Gefahr der Allgemeininfektion auch bei weniger vorsichtiger Anwendung des Verfahrens weit geringer ist als in Frankreich selbst.

Um die geschilderten Mängel der einfachen Clavelisation auszuschalten, hat Borrel ein Verfahren angegeben, das er Serovaccination nennt; Voraussetzung dafür ist die Herstellung eines genügend aktiven Antiserums.

Duclert (1900) war der erste, der das Blutserum von schwerer Schafpockeninfektion genesener Tiere auf etwaige Schutzkraft prüfte. Die subkutane Injektion von 190 ccm solchen Serums schützte in seinen Versuchen gesunde Tiere vor nachfolgender Infektion. Diese Resultate konnten jedoch von Nocard nicht bestätigt werden. Erst 1902 gelang es Borrel, ein Serum herzustellen, das sowohl präventive wie kurative Eigenschaften hatte und auch im Neutralisierungsversuch in vitro sich als wirksam erwies. Eine Bestätigung dieser Befunde erfolgte einige Monate später (September 1902) durch Bosc, der an Eseln experimentierte.

Herstellung des Serums.

Dazu werden Tiere verwendet, die eine schwerere Infektion erfolgreich überwunden haben. Man injiziert diesen Tieren 300—500 ccm des reinen, auf vorhin beschriebene Weise gewonnenen Impfmaterials unter die Bauchhaut. Nach 5—6 Injektionen, zwischen die jedesmal eine Pause

von 14 Tagen eingeschaltet wird, kann man das Tier entbluten; das Serum ist dann genügend aktiv. Nach Borrel genügt das von einem Hammel gelieferte Virus vollkommen zur Immunisierung von 12 Serumtieren.

Folgendes Schema (Borrel) gibt das Beispiel einer erfolgreich durchgeführten Immunisierung:

15. Juli.
Erste Injektion von 200 ccm Virus. Starkes Ödem, das nach 10 Tagen vollkommen zurückgegangen ist.

30. Juli.
Zweite Injektion 200 ccm Virus. Großes Ödem, verschwindet nach 6—8 Tagen.

15. August.
Dritte Injektion 300 ccm Virus. Geringes Ödem, wird rasch resorbiert.

30. August.
Vierte Injektion 300 ccm Virus. Kein Ödem mehr.

15. September.
Fünfte Injektion 300 ccm Virus. Kein Ödem.
Blutentnahme am 22. IX. 500 ccm.
„ am 27. IX. 300 ccm.

30. September.
Sechste Injektion 300 ccm Virus. Geringes Ödem.

7. Oktober. Blutentnahme.

usw. usw.

Zur Blutentnahme dient eine Flasche mit weitem Hals und Gummistopfen mit doppelter Bohrung: das eine Glasrohr ist mittelst Schlauch mit der Punktionsnadel verbunden; durch das andere wird aspiriert. Nach sorgfältigem Rasieren und Desinfizieren der Haut wird die Kanüle in die Jugularis eingeführt. Man hilft mit Aspirieren nach und erhält so ganz beträchtliche Blutmengen. Nach Borrels Angaben liefert ein Hammel mit Leichtigkeit einen Liter Blut im Monat.

Prüfung und Anwendung des Immunserums.

a) Im Reagenzglasversuch.

Man stellt eine frische Emulsion von 150 Teilen Nährbouillon und 1 Teil Virus dar, welches man durch Punktion einer Pustel entnimmt, und filtriert durch Fließpapier. Ein Tropfen dieser Mischung genügt, um eine enorme Pustel hervorzurufen.

Man mischt nun je 1 ccm Filtrat mit 1,0, 0,5, 0,25 ccm, drei Tropfen, zwei und einem Tropfen Serum und injiziert die einzelnen Dosen Hammeln. Kontrolltiere erhalten gleichzeitig das reine oder in Wasser verdünnte Virus.

Es läßt sich auf diese Weise zeigen, daß 0,5 ccm Serum genügen, um jegliche Reaktion zu verhüten.

b) Prophylaktisch.

Mehreren Hammeln werden verschiedene hohe Dosen reinen Serums (2—20 ccm) subkutan injiziert; am nächsten Tage erhalten diese und einige Kontrolltiere subkutan je 1 ccm der vorhin erwähnten, filtrierten Giftemulsion. Die Erfahrung lehrt, daß bei dieser Anwendungsweise schon 2 ccm genügen, um die Allgemeininfektion zu verhüten, während Mengen von 15—20 ccm auch die lokale Pustelbildung verhindern.

c) Sero-Clavelisation.

Der Inhalt eines Virusröhrchens, wie sie von der Zentralversandstelle*) abgegeben werden, wird unmittelbar vor dem Gebrauch mit

*) Für Frankreich liegt Herstellung und Abgabe des Schafpockenvirus in den Händen des Pasteurschen Instituts in Paris.

10 ccm Immunserum sorgfältig vermengt und sämtliche Tiere der Herde mit je 0,1 dieser Mischung geimpft. Der Injektionsort der Wahl ist bei Tieren, denen der Schwanz noch nicht amputiert ist (s. u.), das äußerste Schwanzende; sonst am vorteilhaftesten die vordere Thoraxwand, kurz hinter dem Ansatz der Vorderbeine. An dieser Stelle ist die Haut sehr zart und glatt. Nach 8—9 Tagen werden die Tiere kontrolliert. Diejenigen, die keine Lokalerscheinungen zeigen, bekommen nun reines Virus in physiologischer Kochsalzlösung. Droht im weiteren Verlauf Allgemeininfektion, so schreitet man mit einer Serumeinspritzung von 5—10 ccm dagegen ein.

Den am Schwanz geimpften Tieren amputiert man die entstandene Pustel am besten und erleichtert sich so erstens die Weiterbehandlung, zweitens die Vermeidung einer ungewünschten Kontaktinfektion auf andere Individuen.

d) Die Serotherapie der Clavelée.

Man injiziert das reine Serum ins Unterhautzellgewebe, am besten in die Nähe der Achselhöhle.

Der Nutzen einer exakt durchgeführten Serumbehandlung kranker oder nur gefährdeter Herden ist ein sehr großer [s. Martel[3]]. Die noch intakten Tiere erlangen eine ziemlich weitgehende und lang anhaltende Giftfestigkeit (Minimum 40 Tage, Borrel); die kurz oder leicht erkrankten werden durch die Behandlung durchweg gebessert, und die von der Seuche schon intensiver ergriffenen weisen eine entsprechend geringere Mortalität auf.

Was die Dosis anbetrifft, so beträgt sie pro Stück (nach Borrel):

„10 ccm, wenn in der betreffenden Herde viele kranke Tiere sind; 5 ccm, wenn die Epidemie in den ersten Anfängen ist, vielleicht in der ganzen Herde nur 2—3 sichere Fälle festzustellen waren. Stets erhalten die Erkrankten 10 ccm. In einer Herde, welche noch nicht befallen, aber der Gefahr sehr ausgesetzt ist, genügen für jedes Tier prophylaktisch 5 ccm Serum."

Literatur.

1) Borrel, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1902, Juli 26. — Ibid. 1902, Dec. 20. — Ann. de l'Inst. Pasteur 1903, Vol. XVII, pag. 123. — Ibid. 1903, Vol. XVII, pag. 81. — Ibid. 1903, Vol. XVII, pag. 732.

2) Bosc, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1902, April 26. — Compt. rend de l'Acad. des Sciences 1902, Sept. 1. — Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1905, Vol. LVIII, pag. 299.

3) Martel, Bull. de la Société centrale de méd. vétérin. 1903, 8. Serie, Vol. X, pag. 259.

XXIX.

Rabizides Serum.

Von

R. Kraus

in Wien.

Einleitung.

Die ersten Studien über Antikörper (rabizide Substanzen) im Blut mit Lyssavirus behandelter Tiere verdanken wir Babes und seinen Schülern. Im Jahre 1889 haben Babes und Lepp zum erstenmal solche Körper in Tierversuchen zu beweisen versucht.

Folgende Versuche von Babes sollten die Schutz- und Heilkraft eines mit Lyssavirus gewonnenen Serums demonstrieren:

1. Es wurden 2 Hunde täglich mit 5 ccm Serum vorbehandelt, dann am 7. Tage subdural mit Straßenvirus infiziert. Bloß 1 Hund widerstand der Infektion.

2. 2 Kaninchen ebenso behandelt gehen erst 50—62 Tage ohne Lyssa zugrunde.

3. Alle mit Virus fixe infizierten, mit Serum vorbehandelten Tiere erkranken an Lyssa.

4. Von 4 passiv immunisierten Hunden, die von wütenden Hunden gebissen wurden, bleibt 1 Hund am Leben.

Die weitere Arbeit von Babes und Cerchez im Jahre 1891 führt folgende Versuche an:

1. 1 Kaninchen bekommt 2 ccm Serum eines immunisierten Hundes, und wird mit Virus fixe subd. infiziert. Bekommt Lyssa.

2. 2 Kaninchen und 2 Hunde bekommen Serum vorher und werden nachher subd. mit Virus fixe infiziert. Es bleibt blos 1 Hund am Leben.

3. 4 Hunde bekommen subd. Straßenvirus, nachher subkutan Serum. 2 Hunde gehen nach 52—63 Tagen an Lyssa zugrunde.

4. Kaninchen werden subd. mit Straßenvirus infiziert und gehen trotz Serumbehandlung an Lyssa zugrunde.

Nach Durchsicht der Protokolle derjenigen Versuche, in welchen Serum getrennt injiziert wurde, sei es prä- oder postinfektionell, müssen wir gestehen, daß die Resultate nicht so einwandfrei sind, als daß man, so wie es Babes in seiner Arbeit tat, sie als beweisend für die prä- oder postinfektionelle Wirksamkeit eines derartigen Serums ansehen könnte.

Wir können nach den vorliegenden Protokollen und den weiteren Arbeiten von ALADOR, MIRONESCU, TALASESCU zugeben, daß es BABES gelungen ist, den Nachweis rabizider Substanzen zu erbringen, insofern als die Vitroversuche rabizide Wirkungen ergeben haben. Die Behauptung BABES aber, daß Serum immunisierter Tiere sowohl die Wut heilt als auch einen sichtbaren Einfluß auf die Dauer und Entwicklung der Krankheit haben solle, können wir nach dem Ausfall der mitgeteilten Versuche nicht für gerechtfertigt halten.

TIZZONI und seine Schüler SCHWARTZ und CENTANNI haben auf Grund der Arbeiten von BABES die Frage der Serumtherapie gegen Hundswut einer weiteren eingehenden Untersuchung unterzogen. In der im Jahre 1895 erschienenen Monographie „Modo di preparare siero Antirabico ad alto Potere curativo e metodo di determinare La potenza“ haben TIZZONI und CENTANNI die von BABES behaupteten prä- und postinfektionellen Wirkungen des rabiziden Serums bestätigen können. Die Arbeit beschäftigt sich zunächst mit der Darstellung des Serums, Anwendung des Serums und bringt zahlreiche Versuche, welche die Schutz- und Heilwirkung des Serums beweisen sollen. Auf Grund ihrer günstigen experimentellen Resultate empfehlen TIZZONI und CENTANNI die Serumtherapie auch bei Menschen anzuwenden.

TIZZONI, welcher auf Grund seiner Versuche für die Serumtherapie begeistert eingetreten ist, hat allerdings seit dem Jahre 1895 nichts verlauten lassen, ob er die Konsequenzen seiner Experimente gezogen hat und die gebissenen Menschen bloß mit Serum behandelt hat.

Betreffs der Anwendung der Serumtherapie bei Menschen läßt sich derzeit kein endgültiges Urteil abgeben. Die im Jahre 1904 und 1906 von BABES mitgeteilte Statistik (Zeitschr. für Hygiene 1904 und La Sem. med. 1906) läßt sich nicht verwerten, da Fälle, die bloß mit Serum behandelt worden waren, nirgendwo angeführt werden. Aus den kombiniert behandelten Fällen, die mit Serum und Virus (Simultanmethode) gleichzeitig behandelt wurden, kann man über die Wirksamkeit des Serums wenig bestimmtes aussagen.

Die von BABES eingeführte Serovaccination bei Menschen hat in den letzten Jahren auch MARIE (1904) fortgesetzt. Ob diese Art der Immunisierung bessere Resultate liefert als die aktiven Immunisierungen allein, ist nicht entschieden. Der Vorteil dieser Schutzimpfung sollte jedenfalls auch darin gelegen sein, große Mengen virulenten Virus, welches durch Zusatz des rabiziden Serums unschädlich gemacht wird, auf einmal injizieren zu können. Da, wie wir aber gesehen haben (Band I dieses Handbuches), virulentes Virus fixe für den Menschen von der Subkutis aus unschädlich ist, wäre eigentlich der Zusatz des Serums überflüssig. Wohl wäre denkbar, daß eine Serovaccination (wobei Serum und Virus getrennt einverleibt werden), wie sie auch BABES neben der aktiven Schutzimpfung durchgeführt hat, eher einen Wert hätte, insofern die rabiziden Substanzen des Serums das durch Biß eingedrungene Virus früher schädigen könnten ehe der Organismus selbst Immunkörper zu produzieren vermag. Auch darüber ist aber derzeit kein Urteil abzugeben, da die Statistik von BABES bei direkt behandelten Fällen keinen Unterschied gegenüber den bloß aktiv immunisierten aufzuweisen imstande ist.

I.

Zur **Darstellung des Serums** hat Babes Kaninchen, Esel, Hunde und Schafe zuerst nach der Methode Pasteurs vorbehandelt und dann mit großen Mengen virulenten Virus fixe weiter injiziert. Tizzoni hat, um ein wirksames Serum zu gewinnen, sich der sogenannten italienischen Immunisierungsmethode bedient, indem er mit durch Magensaft abgeschwächten Virus Tiere (Schafe) vorbehandelt hatte, ehe virulentes Virus injiziert wurde. Wir konnten in unseren Versuchen sowohl von Kaninchen, Schafen, Hunden und Pferden ein rabizides Serum gewinnen, wenn wir die Tiere zuerst nach Pasteur oder Högyes vorbehandelt hatten und dann mit großen Mengen virulenten Materials (Virus fixe emulgiert in physiologischer Kochsalzlösung) subkutan weiter injizierten. Ob dem Virus fixe bessere immunisierende Eigenschaften zukommen als dem Straßenvirus ist bis jetzt nicht entschieden. Nach eigenen Versuchen an Kaninchen haben Immunisierungen mit gleichen Mengen Straßenvirus und Virus fixe nicht dasselbe Resultat geliefert.

Im großen und ganzen kann man ganz allgemein behaupten, daß alle Verfahren, welche imstande sind Tiere aktiv zu immunisieren, so daß sie gegen eine nachträgliche Infektion geschützt sind, geeignet sind, die Produktion von rabiziden Körpern zu bedingen. Die Menge dieser Antikörper wird wohl wie bei den anderen Antikörpern von der Tierart und hauptsächlich von der Menge des einverleibten Antigens und von der Dauer dieser Immunisierung abhängen. (Tizzoni und Centanni haben sich mit der Frage beschäftigt, wieviel Antigen injiziert werden soll, um ein sehr wirksames Serum zu gewinnen. Als bestes Verfahren geben die Autoren an, die wiederholte Immunisierung mit verdautem Virus $^1/_3$ und $^1/_4$ gr pro Kilogramm 8—10 Tage und nachträgliche Infektion virulenten Materials; 4 Injektionen.)

Über die **Natur des Antigens** wissen wir derzeit sehr wenig. Bereits Parteur hat sich mit dieser Frage beschäftigt und nahm neben dem Virus eine vakzinierende Substanz an ohne irgend einen positiven Beweis hierfür erbringen zu können. Die späteren Arbeiten versuchen den direkten Beweis für ein Antigen zu erbringen. In Analogie mit den bakteriellen Antigenen hat man versucht, einerseits das Antigen direkt im Virus zu suchen, andererseits in Sekretionsprodukten des Virus in Toxinen. Wie auch das Krankheitsbild, der geringe anatomische Befund sehr zugunsten der Auffassung spricht, daß es sich um eine Toxikose handeln dürfte, und wie auch die Bildung solcher Toxine zuzugeben sein dürfte, ist es a priori unwahrscheinlich, daß man diese Gifte frei im Gehirn wird nachweisen können.

Die Versuche, welche darauf hinausgehen, Toxine im Gehirn wutkranker Organismen nachzuweisen, selbst wenn solche giftige Substanzen nachweisbar wären, sind nicht verwertbar, solange nicht die entsprechenden spezifischen giftneutralisierenden Antikörper erzeugt werden können. Anrep, Aurel, Babes haben aus Gehirnen Substanzen gewonnen, die giftig auf Kaninchen, Hunde und Meerschweinchen wirken. Ebenso gelang es durch Filtration von Gehirnemulsionen (Babes, de Blasi und Russo Travali), durch Fällung mit Essigsäure 1 $^0/_0$, bei vorheriger Behandlung mit Kalilauge 1 $^0/_0$, nach den Angaben von Lustig und Galeotti für Pestproteine (Heller und Bertarelli) giftige Substanzen zu gewinnen, welche die Autoren als Toxine des Lyssavirus ansehen möchten. Ein Antitoxin gegen diese Körper ist bis heute nicht nachgewiesen. Diese giftigen Körper können daher nicht als Toxine angesprochen werden.

Vorderhand ist sichergestellt, daß man sowohl mit lebendem als auch abgetötetem Virus (Babes) aktiv immunisieren und Antikörper erzeugen kann*). Die Immunkörper, die mittels dieser Immunisierung erzeugt worden, sind, wie im folgenden gezeigt wird, rabizid, das heißt sie vermögen Virus zu zerstören. Ob die Filtrate oder die suponierten Toxine eine antitoxische Immunität erzeugen, ist bisher nicht sicher nachgewiesen.

Den **Zeitpunkt für den Aderlaß** nach der letzten Injektion hat Babes auf 20 Tage festgesetzt. Tizzoni und Centanni haben 10 und 25 Tage nach der letzten Injektion die Wertigkeit des Serums bestimmt und konnten mit dem am 25. Tage gewonnenen Serum noch ein Verhältnis 1:25000 präinfektionellen Schutz hervorrufen, hingegen erwies sich das früher gewonnene Serum nur im Verhältnis 1:264 wirksam.

Auch unsere Versuche (Kraus und Kreissl) an Kaninchen und Menschen ausgeführt, lehren, daß die Antikörper langsamer entstehen als die bakteriellen.

Daß die quantitativen und zeitlichen Verhältnisse bei verschiedenen Organismen (Kaninchen, Mensch, Vögel) variieren und auch in derselben Art individuellen Schwankungen unterliegen, geht aus folgendem hervor. (In diesen Versuchen wurde Serum in vitro auf Virus fixe 1 ccm einer 100fach verdünnten filtrierten Emulsion geprüft. Die Einwirkung dauerte 24 Stunden.)

Serum von nach Pasteur immunisierten Kaninchen	0,1 ccm		0,05 ccm
	Sofort nach der Immunis.	10 Tage nach der Immunis.	10 Tage nach der Immunisierung
226	unwirksam	wirksam	wirksam
241	„	unwirksam	unwirksam
170	„	wirksam	wirksam
231	„	„	„

Serum von nach Pasteur immunisierten Menschen	1 ccm		0,5 ccm		0,1 ccm	
	Vor der Immunis.	22 Tage n. d. Immsrg.	Vor der Immunis.	22 Tage n. d. Immsrg.	Vor der Immunis.	22 Tage n. d. Immsrg.
H	unwirks.	unwirks.	unwirks.	unwirks.	unwirks.	unwirks.
St	„	wirksam	„	wirksam	„	wirksam
W	„	„	„	„	„	unwirks.
Kr	wirksam	„	„	„	„	wirksam
Ks	„	„	„	„	„	unwirks.

Das Serum von Tauben und Hühnern, die nach Pasteur und Högyes vorbehandelt wurden und mit konzentrierten Emulsionen lange Zeit hindurch immunisiert waren, haben 20 Tage und später ein Serum geliefert, welches sich in seinen rabiziden Eigenschaften von dem vor der Immunisierung nicht unterschied (Kraus und Maresch).

---

*) Fermi hat in Bestätigung früherer Versuche von Babes in jüngster Zeit mitgeteilt, daß es gelinge mit normaler Nervensubstanz Tiere aktiv gegen Lyssavirus zu immunisieren und rabizides Serum darzustellen.

Babes erwähnt, daß der Mensch das beste Serum liefert. Schafe geben ein weniger wirksames Serum, Hunde verhalten sich verschieden insofern als manche Rassen weniger hierzu geeignet sind.

Wichtig für die Beurteilung der Wirksamkeit eines rabiziden Serums ist die **Art der Prüfung**. Daß es auf die Dosierung, die quantitativen Verhältnisse hier viel ankommt, haben bereits Babes, Tizzoni und Centanni erkannt. Sowohl Babes als auch Tizzoni und Centanni prüfen ihr Serum in vitro als auch prä- und postinfektionell an Kaninchen, die mit Virus fixe oder Straßenvirus infiziert sind (subdural, intranervös oder durch Biß).

Was die Prüfung in vitro betrifft, hat Babes zu gleichen Mengen Virus fixe verschiedenen Serummengen gemischt oder zu verschiedenen Verdünnungen Virus fixe-Emulsionen $^1/_{250}$, $^1/_{350}$, $^1/_{450}$, $^1/_{550}$, $^1/_{600}$, $^1/_{700}$ gleiche Serummengen hinzugefügt.

Tizzoni und Centanni haben zu einer abgewogenen Menge Virus fixe (Medulla) verschiedene Serummengen zugesetzt und davon nach 24 Stunden subdural Kaninchen infiziert.

Tizzoni und Centanni haben sich mit der Frage der Dosierung des Serums eingehend beschäftigt und haben dabei die Wichtigkeit der der genauen Dosierung des Virus bereits berücksichtigt. Bei unseren Versuchen (Kraus, Keller und Clairmont) konnten wir die von Tizzoni und Centanni gemachten Angaben über die Berücksichtigung quantitativer Verhältnisse des Virus bestätigen, haben aber eine Fehlerquelle entdeckt, welche unberücksichtigt eine genaue Wertbestimmung des Serums nicht zuläßt.

Als Testdosis wählen wir 1 ccm einer 100fachen Verdünnung des durch Papier **filtrierten Virus fixe** (Medulla). Das Straßenvirus eignet sich als Testobjekt zunächst deswegen nicht, weil die Virulenz des Virus schwankt und weil man für fortlaufende Versuche und vergleichende Untersuchungen die Konstanz des Virus nicht erhalten kann. Deswegen ist das Virus fixe für die Prüfung am geeignetsten.

Wie die Wertbestimmung von der Menge des Virus abhängt, zeigt ein Versuch, in welchem Serum von immunisierten Kaninchen für 2 ccm Virus fixe einer konzentrierten Emulsion nicht wirksam war, wohl aber für das aufs 50fache verdünnte Virus. (Auch bei der Beurteilung des Immunitätszustandes spielt die Konzentration der infektiösen Dosis, wie eigene Versuche lehren, eine Rolle, indem Tiere mit konzentrierter Emulsion infiziert, Lyssa bekamen, die mit 50facher Verdünnung des Virus fixe*) dagegen am Leben blieben.) Aus diesem Grunde wählten wir als Einheit 1 ccm einer Emulsion von Virus fixe 1:100.

Wie wichtig die Filtration des Testmaterials ist haben wir auch schon bei der Bestimmung des Immunitätszustandes immunisierter Kaninchen gesehen. Erst nachdem wir filtrierte Emulsionen des Virus zur Infektion verwendet haben, bekamen wir gleichmäßige Resultate. Deshalb benützen wir hier und auch in den später zu besprechenden Versuchen das Virus fixe meist in 100facher Verdünnung durch Papierfilter filtriert. Bei der Filtration durch Papier (Filtrierpapier) verliert das Virus nicht an Virulenz, wohl werden aber gröbere Partikelchen, die viel unmeßbares Virus enthalten, eliminiert.

*) Das Virus erzeugt noch in 500facher Verdünnung Lyssa.

Die Prüfung des Serums gestaltet sich dann so, daß abfallende Mengen des zu prüfenden Serums mit 1 ccm einer 100-fachen Verdünnung des Virus fixe bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen gelassen werden und davon wird ca. 0:1 bis 0:2 subdural Kaninchen injiziert. Mittels dieser Prüfung ließ sich das Serum normaler sowohl für Lyssa empfindlicher als für Lyssa unempfindlicher Tiere prüfen.

Die folgende Tabelle bringt eine Übersicht über Werte des Serums längere Zeit mit großen Mengen Virus fixe behandelter Schafe, Hunde, Pferde:

	Menge des Serums	Menge des Virus	Dauer der Einwirkung	Resultat
Hammel	0,1 ccm	1 : 100 (1 ccm)	sofort subdural	Keine Lyssa
	0,05 ccm	do.	„	„
	0,1 ccm	1 : 10 (0,1 ccm) (nicht filtriert)	„	Lyssa
Hund I	0,05 ccm	1 : 100 (1 ccm)	nach 24 St. subd.	Keine Lyssa
	0,1 erh. auf 58°	do.	„	„
Hund II	0,05 ccm	do.	„	„
	0,05 erh. auf 69° durch $^1/_2$ Stunde	do.	„	„
Pferd	0,01 ccm	1 : 100 (1 ccm)	nach 24 St. subd.	Keine Lyssa
	0,01 ccm	do.	sofort subdural	„

Die Sera der lange Zeit immunisierter Tiere vermögen nicht nur Virus nach 24stündiger Einwirkung, sondern auch nach ganz kurzem Zusammenmischen zu zerstören. In einzelnen Versuchen wurde auch unfiltriertes konzentriertes Virus zerstört.

Anzuführen wäre noch, daß die größten Serumverdünnungen in einzelnen Versuchen das Virus nicht zerstören, wohl aber abgeschwächt haben dürften, da der Tod der Tiere an Lyssa verspätet nach 20 Tagen und noch später eintrat. Auch wäre noch eine Beobachtung anzuführen, der wir öfters begegnet sind und die auch Marie anführt, daß nämlich mittlere Serumdosen das Virus nicht zerstört haben, was kleinere und größere vermochten. Ein Phänomen, welches an das bekannte Ablenkungsphänomen von Neisser und Wechsberg erinnert.

Ob das Lyssaserum komplettierbar ist, sowie viele bakteriziden Sera, ließ sich bisher nicht einwandfrei feststellen (Friedberger und v. Eisler). Erwärmung auf 58 und 64° vermag das Serum nicht unwirksam zu machen. Der Mechanismus der Serumeinwirkung auf das Virus ist nicht klargestellt. Es ist nicht entschieden, ob wir es mit einem Serum zu tun, welches analog den bakteriolytischen Seren Virus zerstört oder ob das Serum opsonierende Eigenschaften besitzt und das Virus zu sensibilisieren vermag.

Babes und Tizzoni haben auch experimentell die **postinfektionelle** Wirkung des Serum erweisen wollen und sind, wie bereits angeführt wurde, für die Anwendung des Serums bei gebissenen Menschen eingetreten. Babes hat auch Serum bei Menschen angewendet.

Da diese Frage über die Heilwirkung des Serums für die Praxis von Bedeutung war, ging ich daran, die Wirksamkeit des Serums immunisierter Tiere auch in vivo zu studieren und dessen prä- und postinfektionellen Wert zu ermitteln. Die Versuche wurden bisher nicht veröffentlicht und seien deshalb hier wiedergegeben.

Es wurden Hammel, Hunde, Kaninchen, Pferde durch lange Zeit (1—3 Jahre) hindurch anfangs mit verdünntem Virus fixe, später mit großen Mengen konzentrierten Virus in bestimmten Intervallen subkutan behandelt und deren Serum 20 Tage nach der letzten Injektion und auch später zum Versuch verwendet. Es wurde der vitro Wert zunächst ermittelt und das Serum praeventiv auf subkutane, intravenöse, intraperitonale, intraspinale Weise einverleibt. Zur Infektion wurde entweder konzentriertes Virus fixe oder verdünntes filtriertes und auch Straßenvirus benutzt. Mit Virus fixe wurde meist subdural, mit Straßenvirus auch intraokulär infiziert. Die zahlreichen Versuche, die ich mit dem Serum verschiedener Aderlässe über ein Jahr immunisierter Tiere angestellt hatte, hier wiederzugeben wäre überflüssig. Es seien nur einzelne Versuche (s. Prot.) angeführt, die ebenso wie die nicht wiedergegebenen bloß die Wirksamkeit des Serums in vitro erweisen. Es gelingt mit dem Serum Virus fixe in 100facher Verdünnung nicht nur nach 24stündiger Einwirkung, sondern auch nach ganz kurzer Einwirkung zu zerstören. In einigen Versuchen hat das Serum sogar unfiltrierte konzentrierte Virus fixe zu zerstören vermocht. **Im Gegensatz aber zu dieser ganz evidenten Wirkung in vitro gelang es nicht, im Organismus irgendwelche Wirkungen nachzuweisen. Weder bei präventiver Injektion großer Serummengen noch bei gleichzeitiger Injektion nach subkutaner, peritonealer, intravenöser, intraspinaler Einverleibung gelang es, Tiere (Kaninchen, Meerschweinchen, Hunde), die mit dem Virus fixe des Institutes oder Straßenvirus in den Nerv. ischiadic, intraokulär, cerebral infiziert waren, vor Ausbruch der Krankheit zu schützen.** Wenn man von einzelnen Tieren absieht, die der Infektion widerstanden, was bei größeren Versuchsreihen immer vorkommt, so sind die Versuche alle gleichlautend negativ ausgefallen. Ob Verzögerungen des Inkubationsstadiums, die ab und zu beobachtet wurden, mit der Serumwirkung zusammenhängen, ist schwer zu entscheiden. Versuche, in welchen bereits gelähmten Tieren Serum intraspinal injiziert wurde, hatten auch keinen Erfolg gehabt.

(Siehe Tabellen pag. 619—621.)

Den Schlußfolgerungen von Babes über therapeutische Effekte des Serums, die eigentlich nach genauer Durchsicht der Protokolle sich mit seinen Resultaten nicht decken, können wir demnach nach dem Ausfall unserer Versuche nicht zustimmen. Ob die günstigen Heilerfolge, welche Tizzoni und Centanni beschreiben, durch die Art der Immunisierung (mit verdautem Virus) oder durch ein besonderes Virus zu erklären sein dürften, ist derzeit nicht zu entscheiden. Die jüngst veröffentlichten Arbeiten von Fermi würden dafür sprechen, daß es gelingt, mit Lyssavirus infizierte Tiere mittels Serum zu heilen. Allerdings benützt Fermi einen Infektionsmodus, der verschieden ist von dem bisher von den Autoren in Serumversuchen angewendeten. Fermis Versuche sind mit einem Virus durchgeführt, welches von der **Subkutis** Lyssa zu erzeugen vermag. Ob die guten Heilresultate mit dem Serum, welche in Fermis Arbeit angeführt sind, damit in Zusammenhang gebracht werden können, daß das Virus nicht subdural oder intranervös, sondern nur subkutan zur Anwendung gelangt, müssen erst darauf gerichtete Versuche, welche im Gange sind, entscheiden*).

---

*) Nach den gemeinschaftlich mit Fukuhara durchgeführten Versuchen ist es uns bisher nicht gelungen, mit einem in vitro wirksamen rabiziden Serum Kaninchen, die subkutan mit Virus Fermi infiziert wurden, nachträglich zu heilen.

Versuche mit Serum von immunisierten Hammeln an Kaninchen:

	Versuchs-tiere	Titer in vitro	Menge des injizierten Serums ccm	Art der Einverleibung	Injektion vor oder gleichzeitig mit Versuch	Injektion des Virus	Art der Infektion	Resultat
Hammel	Kaninchen	0,1 + 0,2 Vir. fixe		Intraspinal	*) gleichzeitig	Virus fixe filtriert 1:50	intravenös Vir. fixe 1:10	Lyssa
		0,05 + 1:100 Virus fixe		,,		Virus fixe 1:10 unfiltriert		Lyssa
			5	intraperiton.	,,	Virus fixe 1:100	subdural	Lyssa
			10	,,	,,	,,		,,
			6	subkutan	,,	,,		,,
			6	intravenös	,,	,,		,,
			5	peritoneal	24 Stunden vor der Infektion	Straßenvirus	subdural	Lyssa
			10	,,	,,	Virus fixe 1:100	subdural	,,
			3	intravenös				
		0,01 + 1:100 Virus fixe		Intraspinal	gleichzeitig	Straßenvirus 1:100	intraokul.	Lyssa
				,,		1:50		,,
Hammel II		0,1 + 1:100 Virus fixe	2	intraperiton.	gleichzeitig	Virus fixe 1:100	subdural	Lyssa
			5	,,	,,	,,	,,	,,
			10	,,	,,	,,	,,	,,
			3	intravenös	,,	,,	subdural	Lyssa
			3	,,	24 Stunden vor der Infektion	Virus fixe 1:100	subdural	Lyssa

*) Bei den intraspinalen Injektionen ist es notwendig, das mit Gehirn gewonnene Serum längere Zeit stehen zu lassen, da frisches Serum auf Kaninchen toxisch wirkt, die Tiere bekommen Dyspnoe, Paresen und werden komatös, manche erholen sich vollständig, andere gehen nach zwei Tagen zugrunde. Die intraspinale Injektion bei Kaninchen wird derart ausgeführt, daß das Tier chloroformiert wird, die Haut über der Lumbalwirbelsäule durchschnitten, die Muskulatur längs des Processus spinosi durchtrennt und bei ventralwärts abgebogener Wirbelsäule mit einer feinen Kanüle zwischen dem ersten und zweiten Lumbalwirbel eingestochen. Als Zeichen, daß die Injektion richtig in den Wirbelkanal erfolgt ist, diente uns eine plötzlich auftretende Trübung der Kornea, die langsam wieder zurückgeht.

Versuche mit Serum immunisierter Hunde an Kaninchen, Hunden.

	Versuchstiere	Titre in vitro	Menge des injizierten Serums ccm	Art der Einverleibung	Injektion vor oder gleichzeitig	Injektion des Virus	Art der Infektion	Resultat
Gebr. Hund 1. Aderlaß	Kaninchen	0,05 + Virus fixe 1 : 100	1	intraperiton.	gleichzeitig	Virus fixe 1 : 100	subdural	Lyssa
			3	”	”	”	”	”
			5	”	”	”	”	”
			1	”	”	Virus fixe 1 : 50	intravenös	”
			3	”	”	”	”	”
	Hund		10	”	”	Virus fixe 1 : 100	subdural	”
2. Aderlaß	Kaninchen	0,1 + Virus fixe 1 : 100	1	intravenös	gleichzeitig	Virus fixe 1 : 100	subdural	Lyssa
			4	intraperiton.	”	”	”	”
	Meerschweinchen		3	”	”	”	”	”
	Hunde		4	”	”	”	”	”
			8	”	”	”	”	”
			10	”	”	”	”	”
Dachshündin 1. Aderlaß	Kaninchen	0,05 + Virus fixe 1 : 100	5	intraperiton.	gleichzeitig	Virus fixe 1 : 100	subdural	Lyssa
			10	”	”	”	”	”
	Meerschweinchen		1	”	”	”	”	”
			3	”	”	”	”	”
	Kaninchen		3		präventiv 24 Std. vor der Infektion	Virus fixe 1 : 500		”
			5					”
			2	peritoneal	gleichzeitig	Virus fixe 1 : 100	intravenös	”
			3	”	”	”	”	”

Versuche mit Serum eines immunisierten Pferdes*).

	Versuchstiere	Titre in vitro	Menge des injizierten Serums ccm	Art der Einverleibung	Injektion vor oder gleichzeitig	Injektion des Virus	Art der Infektion	Resultat
	Kaninchen	0,01 + Virus fixe		intraspinal	gleichzeitig	Straßenvirus 1 : 50	intravenös	Lyssa
				"	"	do. 1 : 10		"
				"	"	Virus fixe 1 : 50	intranervös	"
						do. 1 : 10		"
				"	"	Virus fixe 1 : 100	subdural	"
				"	"	"	"	"
			5	intraperiton.	"	"		"
			10	"	"	"		"
			15	"	"	"		"
			10	"		Virus fixe 1 : 10	intranervös	"
			15	"		"	"	"
			20	"		"	"	"

*) Das Pferd wurde vom März 1903 an bis 1906 immunisiert.

Auch die Frage muß derzeit als nicht abgeschlossen betrachtet werden, ob mit normalen Nervensubstanz ein rabizides Serum ebenso gewonnen werden kann, wie mit Lyssavirus selbst. Fermis Arbeit will den Beweis erbringen, daß normale Gehirnsubstanz dieselben antigenen Eigenschaften besitzen soll, wie Lyssavirus. Bei der Wichtigkeit der von Fermi aufgeworfenen Frage, die, wenn sie eine Bestätigung erfahren würde, eine Umwälzung unserer Anschauungen über Immunität bei Lyssa und eine Änderung der Schutzimpfung herbeiführen müßte, ist es notwendig, die Angaben Fermis einer eingehenden Nachprüfung zu unterziehen. In Gemeinschaft mit Dr. Fukuhara habe ich bereits diese Versuche begonnen. Im Ergänzungsbande dieses Handbuches soll dann über die Versuche Fermis ein auf Grund eigener Erfahrung gewonnenes Urteil abgegeben werden.

Literatur.

Babes und Lepp, Ann. de l'Inst. Pasteur 1889.
Babes und Cerchez, Ann. de l'Inst. Pasteur 1891.
Fermi Centralbl. für Bakt. 1908.
Friedberger und v. Eisler, Centralbl. für Bakt. 1907.
Kraus und Kreissl, Centralbl. für Bakt. 1907.
Kraus und Maresch, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLI.
Kraus, Keller und Clairmont, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLI.
Marie, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1902, 1904, 1907.
Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, 1908, Bullet. de l'Inst. Pasteur 1908.
Remlinger, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1904, 1906.
Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1906.

Antikörper zu diagnostischen Zwecken (Serodiagnostik).

XXX.

Über Agglutination.

Technik und Methodik der Agglutination. Serodiagnostik der Bakterien mittels Agglutination.

Von

Dr. Richard Volk

in Wien.

Historischer Überblick.

Wenn im folgenden die Technik der Agglutination besprochen werden soll, so fühle ich mich gezwungen, ganz speziell auf den Zweck dieses Handbuches aufmerksam zu machen, da Paltauf im Kolle-Wassermannschen Handbuch das kolossale Material in ausführlicher und kritischer Weise gesichtet und zusammengefaßt hat. Ich kann daher auf die außerordentlich reichen Literaturangaben daselbst verweisen. Die Bearbeitung der Technik der Agglutination bringt es mit sich, daß hauptsächlich jene Arbeiten berücksichtigt werden müssen, welche in dieser Hinsicht einen Fortschritt oder eine Änderung gebracht haben, während andere nicht minder bedeutende nur in Kürze bezüglich des Gesamtergebnisses gestreift werden können. Eine detaillierte Würdigung derselben ist unmöglich und auch überflüssig, da es ja nur eine Wiederholung des von Paltauf Gesagten wäre.

Von allen Immunitätsreaktionen hat wohl keine jene Bedeutung für die Diagnostik gewonnen wie das Phänomen der spezifischen Agglutination. Mit dem zunehmenden praktischen Interesse wuchs auch das Bedürfnis nach Vertiefung in der Erkenntnis in theoretischer Hinsicht und so können wir wohl behaupten, daß durch eine stattliche Reihe von Arbeiten nach beiden Richtungen dieses Gebiet gründlich erforscht ist.

Es ist das Verdienst von Gruber und Durham, die Agglutination in ihrer Bedeutung als selbständige Immunitätsreaktion (1896) erkannt und damit das Studium dieses für die Klinik sowohl als auch für die Bakteriendiagnostik so fruchtbringende Gebiet der Immunitätslehre inauguriert zu haben. — Das Phänomen als solches war schon vor ihnen bekannt, ich erwähne nur die Namen Charrin und Roger, Metschnikoff und seine Schüler, Bordet, Pfeiffer und Kolle u. a., doch wurde ihm nicht die nötige Beachtung geschenkt oder dasselbe nicht richtig gedeutet.

Bald nachdem Gruber und Durham die Spezifität der durch Immunisierung von Tieren gewonnenen Agglutinine erkannt und auf die Verwertbarkeit dieser spezifischen Reaktion aufmerksam gemacht hatten, konnte Widal und fast gleichzeitig mit ihm Grünbaum zeigen, daß beim Menschen schon während der Krankheit beim Typhus spezifische Agglutinine auftreten, durch deren Feststellung die Typhusdiagnose gesichert werden kann. — Ähnliche Erfahrungen wurden bald auch bei anderen Mikroorganismen gemacht, von denen die wichtigsten Cholera und Pest sind.

Gruber und Durham berichten schon, daß die strenge Spezifität nicht besteht, indem hochwertige Immunsera auch nicht homologe Bakterien agglutinieren. — Diese Mitagglutination beschäftigte weitere Forschungen und über den Begriff der „Gruppenagglutination" kam man zur Erklärung dieser Erscheinung im Sinne der Ehrlichschen Seitenkettentheorie durch die Annahme von Partialagglutininen im Immunserum. — Erst durch die genaue Kenntnis der durch solche Mitagglutination entstehenden Schlüsse und die Möglichkeit, dieselben durch geeignete Versuchsanordnung auszuschließen, war der Agglutination wieder ihre hohe Bedeutung zurückgegeben.

An diese grundlegenden, vor allem praktisch wichtigen Tatsachen schließen sich eine große Zahl theoretischer Fragen. — Bordet und Joos suchten Licht in den Mechanismus und Chemismus der Agglutination zu bringen, Bail, Eisenberg und Volk, Wassermann u. a. setzten diese Bestrebungen fort, erweiterten sie, indem sie die Bindungsverhältnisse und die Konstitution der reagierenden Substanzen, den Abbau derselben studierten. — Für all diese Untersuchungen mußte die Technik ausgebildet und verfeinert werden, um womöglich jede Fehlerquelle auszuschließen.

Eine andere große Gruppe von Arbeiten beschäftigte sich mit dem Zusammenhang von Agglutination mit den übrigen Immunitätsreaktionen, speziell mit den von Kraus 1897 entdeckten Präzipitinen. — Das letztere hat auch ein besonderes theoretisches Interesse, da das Phänomen der Präzipitation von Paltauf zu einer, wie es scheint, den tatsächlichen Verhältnissen am meisten entsprechend Agglutinationstheorie verwendet wurde.

Hatte man bis in die letzte Zeit das Tatsachenmaterial mit Hilfe der Ehrlichschen Seitenkettentheorie zu erklären gesucht, so eröffnete sich uns ein neuer Ausblick, als zuerst Zangger, dann Landsteiner und Jagič, Neisser und Friedemann, Bechhold, Porges u. a. auf die großen Analogien zwischen dem Agglutinationsvorgang und den Prozessen in der Colloidchemie hinwiesen. — Die Reagenzglasversuche finden ihre Gegenstücke fast sämtlich bei den colloidalen Reaktionen. Unaufgeklärt ist bisher die Spezifizität. — Diese neue Phase in der Agglutinationsforschung ist einem eigenen Kapitel (siehe Porges) vorbehalten, in dem wohl Gelegenheit sein wird, öfters für unsere biologischen Erklärungsversuche die beim Studium der Kolloide gewonnenen analogen Erscheinungen anzuführen.

Begriffsbestimmung.

Unter Agglutination versteht man eine Ausflockungserscheinung, die eintritt, wenn zwei Substanzen, das Agglutinogen und Agglutinin unter Beisein von Salz zusammentreten. — Schon aus dieser Definition ersieht man, daß hierbei zwei Dinge von einander zu trennen sind: der Prozeß der Bindung und der der Ausflockung.

Naturgemäß werden wir uns im folgenden hauptsächlich mit der Bakterienagglutination beschäftigen, da ja mit Bakterien die meisten und wichtigsten Versuche gemacht worden sind. Ausgeschlossen sind jene colloidalen Ausflockungserscheinungen, welche durch chemische Substanzen, hauptsächlich Farbstoffe hervorgerufen werden und schon seit langem bekannt sind, aber erst in letzter Zeit recht gewürdigt wurden, ferner die Hämagglutination durch gewisse pflanzliche und tierische Gifte (Rizin, Abrin usw.). In Kürze erwähnen wollen wir jedoch die Agglutination von Protozoen.

Technik des Agglutinationsversuches.

Die Reaktion kann entweder unter dem Mikroskop mit Immersion oder starker Vergrößerung oder makroskopisch in der Eprouvette ausgeführt werden. — Jede dieser Methoden hat ihre Indikationen. Die erstere wird vor allem dort Anwendung finden, wo nur geringe Mengen Serum zur Verfügung stehen, also vor allem für die klinische Untersuchung. — Demgemäß wird dieselbe genauer im Abschnitt über die Serodiagnostik der Krankheiten abgehandelt werden.

Für den Laboratoriumsversuch, bei dem für gewöhnlich die Serummenge keine zu beschränkte ist, eignet sich die makroskopische Methode schon deshalb besser, weil die Beobachtung leichter möglich ist, was bei großen Agglutinationsreihen als ein nicht zu unterschätzender Vorteil angesehen werden muß. — Zudem haben vergleichende Untersuchungen ergeben, daß beide Methoden bei einiger Übung fast übereinstimmende Resultate ergeben. — In der Mitte zwischen beiden läge die Blockschälchenmethode und Beobachtung mit schwacher Vergrößerung.

Makroskopische Technik.

Wie hat man nun bei Aufstellung einer makroskopischen Agglutinationsprobe vorzugehen? Vor allem müssen sämtliche zur Verwendung kommenden Gefäße absolut rein sein, will man nicht schwere Beobachtungsfehler begehen; insbesondere achte man, daß keine Reste von Alkali, Säuren, Desinfektionsmitteln zurückgeblieben sind, denn alle diese Agentien können den Ablauf der Agglutination beeinträchtigen. — Als Eprouvetten benutzt man entweder die gewöhnlich im Laboratorium gebrauchten oder etwas kürzere, die dann eventuell auch noch einen vom Boden aus ausgezogenen schmalen Fortsatz haben, in dem sich die zusammengeballten Bakterien gut sedimentieren. Muß mit dem Serum gespart werden, so kann man sich auch der Tropfenmethode bedienen, wofür dann kleine, schmale Eprouvetten notwendig sind.

Die Verdünnungen werden mit physiologischer Kochsalzlösung oder auch Bouillon durch Verwendung von graduierten Pipetten gemacht, wobei die Sprünge von einer Verdünnung zur nächst niedrigen gewöhnlich so sind, daß sie in geometrischer Progression mit dem Exponenten 2 aufgestellt werden; nur ausnahmsweise werden zwischen diesen noch Verdünnungen interkaliert. — Weniger genau sind natürlich die Verdünnungen mittels der Tropfenmethode; den Fehler sucht man dadurch zu verringern, daß man die Kapillare stets möglichst gleich weit macht und die Tropfen unter gleichem Winkel abfließen läßt. Sofern es die Umstände erlauben, wird der ganze Versuch mit ein uud derselben Kapillare durchgeführt, die man eventuell mit steriler Flüssigkeit reinigen kann; bei Verwendung von graduierten Pipetten ist dies natürlich nicht notwendig.

Zur Herstellung der Verdünnungen wurden von verschiedenen Seiten eigene Instrumente angegeben; ich erwähne hier nur einen automatischen Mischer von M. Pfaundler in der Münchn. med. Wochenschr. 1905, p. 299 genau beschrieben. — Notwendig sind besondere Instrumente nicht

Sind die Verdünnungen nun fertiggestellt, so werden sie in entsprechender Menge in die schon vorbereiteten, genau bezeichneten Eprouvetten verfüllt. Dazu kommt die zu agglutinierende Substanz (Bakterienaufschwemmung, 5 %ige Blutkörperchenaufschwemmung usw.) und jede Probe wird auf das gleiche Maß mit der Aufschwemmungs- resp. Verdünnungsflüssigkeit aufgefüllt. Als Kontrolle darf bei keiner Auswertung ein Röhrchen mit Aufschwemmung + NaCl-Lösung fehlen. — Das Ganze wird nun je nach Bedürfnis entweder 2 Stunden bei 37°, weitere 20 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten (Eisenberg und Volk), oder man beobachtet bei höherer Temperatur (52—53°) (Weil).

Der Verlauf der Erscheinung richtet sich nach der Wertigkeit und nach der angewandten Konzentration. Bei Zugabe von starken Konzentrationen hochwertiger Immunsera zu Typhusbazillen, tritt die Agglutination fast momentan auf! Die gleichmäßig getrübte Aufschwemmung klärt sich unter Bildung von groben Flocken, die sich rasch zu Boden setzen. Ist die Konzentration geringer oder das Serum nicht sehr hochwertig, so entstehen nach einiger Zeit feinere oder gröbere Flocken und langsam durch Senkung derselben ein Sediment am Boden der Eprouvette. Kommt es zu vollkommener Agglutination, so werden sämtliche Bakterien niedergeschlagen, die darüber stehende Flüssigkeit wird klar. Unter Umständen — es kann dies von verschiedenen Faktoren abhängig sein, sowohl von den zur Agglutination verwendeten Bakterien als auch vom agglutinierenden Serum, das in starken Verdünnungen nicht mehr seine volle Wirksamkeit entfaltet — wird die Agglutination nur unvollkommen, d. h. es entstehen feine Flöckchen, die zu Boden sinken, die obere Flüssigkeit klärt sich dementsprechend ein wenig, aber nicht vollkommen. In einer solchen Probe finden wir also am Boden ein Sediment und die darüberstehende Flüssigkeit mehr oder weniger getrübt. Je nach dem Grad der Präzipitation der Bakterien unterscheidet man verschiedene Stufen der Agglutination, die natürlich willkürlich verschieden bezeichnet werden können, z. B. vollkommene Agglutination (v. A.), fast vollkommene Agglutination (f. v. A.), unvollkommene Agglutination (u. v. A.), Spur, Agglutination (Sp. A.) usw. Es hängt vom Untersucher ab, welchen Grad der Agglutination er als Endreaktion annehmen will, doch muß er dann innerhalb eines Versuches stets denselben als Index annehmen.

Schüttelt man das Sediment bei den stärkeren Graden der Agglutination auf, so bedarf es einer gewissen Gewalt, um das Konglomerat in seine Flocken aufzulösen, die sich dann rasch wieder zu Boden setzen. Bei den geringeren Graden gelingt das Aufschütteln leichter, die feineren bis feinsten Flocken bleiben länger in der trüben Flüssigkeit suspendiert, doch wird die Trübung nie eine so gleichmäßige wie nach Aufschütteln spontan sedimentierter Bakterien.

Man beobachtet den Verlauf der Agglutination am besten so, daß das schräg gehaltene Röhrchen von unten gegen eine Lichtquelle betrachtet wird. Es werden dadurch die durch die Klümpchen abgelenkten Strahlen aufgefangen und so die feinsten Flöckchen sichtbar. Jäger hat zur Erleichterung der Beobachtung einen kleinen Apparat, das Agglutinoskop, konstruiert, der auf dem Prinzipe beruht, daß durch einen schmalen Spalt in einem schräg gestellten Schirme, auf dem die

Agglutinationsprobe aufruht, ein Glühlämpchen seine Strahlen sendet. Die feinen Flocken erscheinen dann in einem ähnlich scharfen Bilde wie die Sonnenstäubchen in einem verdunkelten Zimmer.

Eine andere Methode ist die nach PFEIFFER und KOLLE. Es werden vom Serum in physiologischer Kochsalzlösung Verdünnungen gemacht und von diesen in Reagenzröhrchen je 1 ccm verfüllt, so daß man dadurch abfallende Serummengen in der gleichen Menge Flüssigkeit erhält. An der Wand jedes Röhrchens wird nun eine Normalöse = $^1/_{2000}$ g frischer Kultur, verrieben und dann in die Flüssigkeit hineingeschwemmt, statt daß eine Bakterienaufschwemmung zugesetzt wird.

Eine andere makroskopische Agglutinationsmethode ist die à l'état naissant. Bekanntlich wurde das Phänomen der Agglutination zuerst von CHARRIN und ROGER, beim Bacillus pyocyaneus, später von METSCHNIKOFF beim Vibrio METSCHNIKOFF in der Weise beobachtet, daß die Bakterien in ein agglutinierendes Serum eingetragen ein verändertes Wachstum zeigten, indem sie zu kleineren und größeren Konglomeraten zusammengeballt am Boden wuchsen, während die darüberstehende Flüssigkeit klar blieb. Gleichzeitig hatten bewegliche Bakterien ihre Bewegungen eingebüßt. Diese Beobachtung kann nun auch zu einer in der Praxis allerdings kaum benutzten Methode verwendet werden, indem man in Bouillonröhrchen fallende Mengen eines auf 60 ° erhitzten agglutinierenden Serums zugibt und Typhus oder Cholerabakterien einsät und bei 37 ° wachsen läßt. Bei höherer Konzentration des Immunserums wird die Bouillon nicht wie normalerweise getrübt, sondern das Bakterienwachstum erfolgt auf dem Boden des Röhrchens, beim Schütteln werden Flocken aufgewirbelt. Ist jedoch das Serum schwach oder verdünnt, so kann nach einiger Zeit auch Trübung in der Bouillon entstehen, indem nach Verbrauch des Agglutinins die Bakterien wie normal weiter wachsen. Man muß daher bei dieser Methode die Röhrchen öfters kontrollieren. Ein Resultat ist dabei erst nach 8—12 Stunden zu erwarten. Die Methode wurde von WIDAL zur Serodiagnostik angegeben.

Die Mitte zwischen makroskopischer und mikroskopischer Beobachtung hält die Methode von NEISSER-PROESCHER, welche außerordentlich exakte Resultate gibt. Sie wird in folgender Weise angestellt: Als Ausgangsverdünnung nimmt man eine solche von 1 : 10 physiologischer Kochsalzlösung, von der in geometrischer Reihe weitere Verdünnungen in folgender Weise erhalten werden. In die bereitgestellten Reagenzröhrchen wird mit Ausnahme des ersten je $^1/_2$ ccm physiologische Kochsalzlösung gefüllt. Hierauf kommt in die beiden ersten Röhrchen je $^1/_2$ ccm der Serumverdünnung 1 : 10, dann wird vom zweiten in das dritte, vom dritten in das vierte usf. übertragen. Gibt man nun in jedes Röhrchen $^1/_2$ ccm einer in Formalin abgetöteten Typhusbouillonkultur, so hat man bei gleicher Flüssigkeitsmenge abfallende Serummengen einer Reihe von 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 usf. Die einzelnen Röhrchen werden hierauf in Blockschälchen gegossen, diese bei 37 ° 1—2 Stunden gehalten und bei schwacher (ungefähr 50facher) Vergrößerung beobachtet.

Mikroskopische Agglutination und deren Indikation.

Die Besprechung der mikroskopischen Agglutination und deren Verlauf bleibt, wie schon erwähnt, dem Abschnitte über Serodiagnostik der Krankheiten vorbehalten. Da wird auch der Ort sein über gewisse Phänomene, die bei der Agglutination beobachtet werden, besonders über

die Fadenreaktion zu sprechen, ebenso wie auch das Fickersche Typhus- und Paratyphusdiagnostikum dort Erwähnung finden wird.

Hier möchte ich nur kurz auf die Herstellung des Diagnostikums zu sprechen kommen, welche in ihrer originalen Form von den Höchster Werken geheim gehalten wird. Im Wiener serotherapeutischen Institut wird so vorgegangen, daß von einer Agarfläche von etwa 160 ccm Inhalt die Kultur in 1 Liter destilliertem Wasser aufgeschwemmt und demselben dann 5 ccm konzentrierte Karbolsäure zugesetzt wird. Hierauf überläßt man dies durch einige Tage bei 37° der Mazeration und filtriert dann durch ein Papierfilter. Dadurch erhält man eine leicht trübe Flüssigkeit, die sich nach Untersuchungen zu diagnostischen Zwecken gut eignet. — Doch scheint sie im Werte, übrigens ebenso wie das Höchster Präparat, nach einigen Monaten zurückzugehen, weshalb von Zeit zu Zeit eine Kontrollprüfung von seiten der Institute angezeigt wäre; die minderwertig gewordenen Präparate müßten dann aus dem Verkehr gezogen werden, wie dies auch bei den antitoxischen Seris in unserem Institute geschieht.

Der Vorteil, den die makroskopische vor der mikroskopischen Agglutinationsmethode hat, besteht nicht allein in der großen Handlichkeit, sondern auch darin, daß man nicht so leicht Irrtümern ausgesetzt ist. Bei mikroskopischer Beobachtung, insbesondere mit Immersion sieht man nicht so selten kleine Häufchen, die aber mit wahrer Agglutination nichts zu tun haben, sondern als Pseudoagglutination aufzufassen sind. Diese zweifelhaften Resultate entfallen ebenso wie bei makroskopischer Beobachtung auch bei der Neisser-Pröscherschen Methode, da die kleinen Häufchen hierbei nicht so sehr in den Vordergrund treten. Für die Praxis z. B. zur Vornahme der Serodiagnostik von Bakterien dürfte sich neben den entsprechenden Seris auch das Typhus- und Cholerareagenzpapier eignen. Über die Herstellung eines solchen Papiers finden sich genaue Angaben bei E. Jacobsthal. Es wird so hergestellt, daß auf einem Stückchen Filtrierpapier ein Tropfen eines Immunserums unverdünnt oder verdünnt mit der zwei- bis fünffachen Menge Normalserum eintrocknen gelassen wird. Eine beigegebene Etikette gibt die Größe des Tropfens, den Titer des Serums und dessen eventuellen Verdünnungsgrad an. An dunkeln und kühlen Orten in gut verschlossenen Gefäßen aufbewahrt bleibt dieses Reagenzpapier durch Monate unverändert. Die Verdünnungen wären ungefähr in folgender Weise laut Gebrauchsanweisung zu machen. Beträgt die Tropfengröße $^1/_{67}$ und löst man einen solchen Tropfen in 10 ccm einer 0,85 $^0/_0$ igen NaCl-Lösung auf, so erhält man eine Verdünnung 1:670. Bei Auflösung der Hälfte oder eines Viertels des Reagenzkörpers in 10 ccm NaCl-Lösung, bekommt man die Verdünnungen 1:1340 resp. 1:2680. Ist das Serum von vornherein zwei- bis fünfmal verdünnt, so muß diese Zahl noch mit der Verdünnungsziffer multipliziert werden. In ähnlicher Weise müßten die Verdünnungen auch berechnet werden, wenn nur Teile eines Reagenzkörpers verwendet werden.

Um die Agglutinationsprobe auszuführen wird das Serum eines Reagenzkörpers aufgelöst, wozu unter Umschütteln eine $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde notwendig ist, hierauf werden in jedes Reagenzglas 3—4 Ösen einer höchstens 24 stündigen Agarkultur emulgiert. Als Kontrolle dient eine ähnliche Emulsion in einer NaCl-Lösung. Die Ösen sollen zirka stecknadelkopfgroß sein. Hierauf werden die Eprouvetten eine halbe Stunde bei 55° gehalten, bei Zimmertemperatur abkühlen gelassen und dann das Resultat abgelesen.

Zur Vornahme der Agglutination kann man frische Bouillonkulturen oder Kulturen auf schrägem Agar verwenden, die in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt sind. Nur dürfen die Kulturen speziell in Bouillon nicht zu alt sein, am besten eignen sie sich nach 16 bis 18stündigem Wachstum. Ebenso gute Resultate erhält man mit Kulturen, die durch chemische Mittel (Toluol, Chloroform, Formol usw.) oder durch vorsichtiges Erwärmen abgetötet sind. Bezüglich näherer Details in dieser Hinsicht verweisen wir auf das Kapitel über agglutinierbare Substanzen.

Art der Beobachtung.

Die Beobachtungsdauer wurde von verschiedenen Autoren verschieden angegeben. Die einen begnügen sich mit einer solchen von 1—2 Stunden bei 37 °, andere lassen danach noch die Proben 6—8—24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, um dann erst abzulesen. Andere wieder beobachten die Agglutination besonders gewisser Bakterien nur bei Zimmertemperatur. Es ist klar, daß man, wenn Resultate innerhalb eines Versuches verglichen werden sollen, stets dieselbe Beobachtungszeit einhalten muß. Es ist jedoch davor zu warnen dieselbe zu kurz zu wählen, da man sonst leicht zu Trugschlüssen kommt. Eisenberg hat in seiner letzten Arbeit Beobachtungszeiten bis zu 72 Stunden. In solchen Fällen ist es besser mit abgetöteten Kulturen zu arbeiten, da sonst durch das Bakterienwachstum die Resultate getrübt werden können.

Eine neue, sehr zu empfehlende Methode hat Weil ausgearbeitet und geprüft. Er konnte nämlich zeigen, daß die Agglutination viel rascher und vollkommener erfolgt, wenn sie bei 50—55 ° — dies hat sich als das Temperaturoptimum erwiesen — im Wasserbade ausgeführt wird. Dazu kommt noch der Vorteil, daß die Beobachtung auch auf längere Zeit ausgedehnt werden kann, da ja kein Bakterienwachstum stattfindet.

Um der Ursache dieser Erscheinung auf die Spur zu kommen, wurden die bei der Reaktion in Betracht kommenden Substanzen jede für sich auf die betreffende Temperatur erwärmt und hernach der Versuch in verschiedenen Kombinationen aufgestellt. Es zeigte sich, daß weder die bis 55 ° erwärmte Bouillon noch auch das Serum die Agglutination beeinflussen, während 55 °-Bakterien rascher präzipitiert werden. Da aber die Agglutination auch solcher Bakterien noch immer nicht so rasch erfolgt als wenn man die Mischung bei 55 ° hält, so muß man annehmen, daß das Zusammenwirken von Agglutinin und agglutinierbarer Substanz bei 55 ° rascher vor sich geht.

Dies die Resultate bei Typhusbazillen. Auch die Agglutination von Choleravibrionen, Staphylokokken und Tuberkelbazillen geht bei 55 ° rascher vor sich als bei gewöhnlicher Beobachtung, doch geschieht sie bei Staphylokokken sehr langsam. Die Erwärmung der Choleravibrionen allein bei 55 ° ergibt keinen beschleunigenden Einfluß.

Eine andere Methode hatte Asakawa angegeben. Er taucht die Bakterienserummischung in eine Kältemischung von Eis und Salz, bringt sie dadurch zum Gefrieren und läßt sie dann wieder auftauen. In diesem Moment soll man schon deutliche Agglutination sehen. Es würde demnach die ganze Reaktion innerhalb einer Viertelstunde ablaufen. Doch ist die Methode noch zu wenig geprüft, um ein abschließendes Urteil über sie zu fällen. Kirstein konnte bei Nachprüfung dieser Agglutnationstechnik keine Abkürzung des Verfahrens erzielen.

Gaethgens erzielte Beschleunigung der Agglutination durch 10 Minuten langes Zentrifugieren sowohl bei lebenden als auch bei toten Kulturen. Auch bei schweren agglutinablen Mikroorganismen, Pneumokokken, Meningokokken soll sich diese Methode gut bewähren.

Die agglutinierbare Substanz (Agglutinogen).

Die ersten Untersuchungen über Eigenschaften des Agglutinogens verdanken wir Bordet, der nachwies, daß Choleravibrionen, welche durch Chloroform abgetötet worden waren, ebenso agglutinabel sind wie lebende Vibrionen. Ähnliches konnten Widal und Siccard an Typhusbazillen zeigen, die durch vorsichtiges Erwärmen abgetötet waren. Systematische Untersuchungen, von van de Velde ausgeführt, bestätigten diese Erscheinungen und erweiterten sie dahin, daß Typhusbazillen durch Abtötung mit Thymol, Chloroform, Karbolsäure, Sublimat in antiseptischen Dosen keine Einbuße ihrer Agglutinabilität erleiden.

Einen wichtigen Fortschritt in der Erkenntnis der agglutinabeln (präzipitabeln) Substanz bedeutet die Entdeckung von Kraus, daß man in keimfreien Filtraten von Bakterien durch ein Immunserum spezifische Niederschläge erzeugen kann. Die Technik in bezug auf Präzipitation wird in einem eigenen Kapitel von M. v. Eisler dieses Handbuchs abgehandelt, während wir die Versuche, welche die Beziehungen zwischen Agglutininen und Präzipitinen betreffen, weiter unten besprechen wollen.

Nicolle, der sich mit der Frage beschäftigt, wie sich das Agglutinogen gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen verhalte, führte an, daß das Agglutinogen in Alkohol und Äther löslich sei. Dem widersprach jedoch Winterberg, der die agglutinable Substanz mit Alkohol ausfällen konnte. Weitere Fakten zur Klärung dieser divergierenden Ansichten brachten erst die Befunde Picks, der aus alten Bouillonfiltraten durch Alkokol ein Bakterienkoagulin A. ausfällen konnte, das infolge der mitextrahierten Stoffe des Nährbodens Eiweißreaktionen gab und erst durch weitere chemische Prozeduren vom Eiweiß befreit werden konnte (der Niederschlag Winterbergs); extrahiert man aber jüngere Typhusagarkulturen mit Kochsalz, so erhält man mit 95 %igem Alkohol keinen Niederschlag, auch gibt der Extrakt keine Eiweißreaktion; dieses Koagulin K muß mit dem Körper Nicolles identifiziert werden. Pick nimmt also 2 Bakterienkoaguline A und K an; beide geben mit Immunserum Niederschläge, sind sehr resistent gegen Kochen, chemische Einflüsse, Fäulnis etc. Die mit Kochsalz extrahierten Bakterien zeigen selbst nach mehrmaliger Extraktion und Waschung noch gute Agglutination, woraus man schließen könnte, daß Agglutination auch ohne die durch NaCl extrahierbare agglutinable Substanz eintreten kann, wenn nicht auch die Annahme gerechtfertigt wäre, daß ein Teil derselben sehr energisch durch die Bakterien festgehalten wird.

Die Befunde Picks blieben nicht unwidersprochen. Kraus und Joachim fanden, daß das Nährmedium für die chemische Beschaffenheit der gewonnenen Substanzen nicht ausschlaggebend ist, indem Alkohollöslichkeit resp. -fällbarkeit nicht an Agar- oder Bouillontyphuskulturen gebunden ist. Ebenso kann die präzipitinogene Substanz der Bouillonfiltrate thermostabil sein, während Filtrate von Agarkulturen bei 58° zugrunde gehen. — Ob sich diese Differenzen allein durch den größeren oder geringeren Eiweißgehalt des zur Untersuchung verwendeten Präparates vollständig erklären lassen, wie Paltauf meint, möchte ich nicht

entscheiden. — Jedenfalls scheint es mir angezeigt, daß der ganze Komplex von Fragen, welche durch die PICKsche Arbeit angeregt wurden, abermals einer genauen Bearbeitung unterzogen werden, zumal WOLF in gewissen, sehr wichtigen Punkten wenigstens in bezug auf Choleraimmunserum sich zu PICK in Gegensatz stellt und besonders darauf hinweist, daß die Ammonsulfatfällung einen Teil der Immunkörper zerstört.

Änderung der Agglutinabilität.

EISENBERG und VOLK konnten im Gegensatz zu MALVOZ, der angab, daß alte Kulturen inagglutinabel werden, und NICOLLE, der behauptete, daß ältere, mehrmals gewaschene Typhusbazillen schwer oder nicht agglutinabel werden, während dies für junge Typhuskulturen nicht gelte, zeigen, daß dies wenigstens für ihren Typhusstamm nicht der Fall sei. Wenn man nämlich einige Monate alte Typhuskulturen durch ein Pukallfilter filtriert, mehrmals mit Kochsalzlösung wäscht und dann wieder aufschwemmt, so tritt auch bei starken Verdünnungen des Serums prompt Agglutination ein. Während in Übereinstimmung mit WIDAL, SICCARD und VAN DE VELDE halbstündige Erwärmung von Typhusbakterien auf 58° Agglutinabilität und Bindung in keiner Weise beeinträchtigen, nimmt die Möglichkeit der Ausflockung der Bakterien, wie die Autoren, im Gegensatz zu NICOLLE, der bei 65° noch keine Einbuße der Agglutinabilität konstatieren konnte, zeigen, bei zunehmender Temperatur immer mehr ab und erlischt bei 144° und 3 Athmosphären Dampfdruck vollständig. Dagegen wird die Bindungsfähigkeit solcher inagglutinabler Bakterien, wenn auch beeinträchtigt, so doch zu einem großen Teil erhalten.

Aus diesem Versuche deduzierten die Autoren bezüglich der Konstitution des Agglutinogens zwei Gruppen an der agglutinierbaren Substanz, eine fällbare, die bei 65° zugrunde geht, während die bindende höhere Temperaturen verträgt. An der letzteren müßten jedoch wieder zwei Anteile zu unterscheiden sein, deren einer, der thermolabile, bei ungefähr 60° zugrunde geht, — daher die Beeinträchtigung der Bindungsfähigkeit — während der andere Teil thermostabil ist.

Abweichend von diesen Resultaten sind ähnliche Versuche mit Choleravibrionen verlaufen, indem diese halbstündige Erwärmung bis auf 170° ohne Beeinträchtigung der Agglutinabilität vertragen. Daraus und auch aus geringen Abweichungen der Bindungsfähigkeit wurde auf Differenzen der agglutinabeln Substanzen von Typhusbazillen und Choleravibrionen geschlossen.

Werden Typhusbazillen in $^1/_4$ % Normal HCl und in 10 % HCl aufgeschwemmt, eine Stunde bei 37° gehalten, hierauf vorsichtig neutralisiert, damit jede Wirkung der Säure oder des Alkali auf das später zuzusetzende Agglutinin ausgeschlossen ist, so ergibt sich, daß die Bakterien zwar nicht mehr ausgeflockt werden können, jedoch fast vollständig ihr Bindungsvermögen bewahrt haben. Choleravibrionen zeigten bei ähnlicher Versuchsanordnung zwar eine bedeutende Verminderung ihrer Agglutinabilität, doch wurden sie durch hohe Serumkonzentrationen noch ausgefällt. Das Bindungsvermögen blieb intakt. Also auch da ein deutlicher Unterschied in der Resistenz der Agglutinogene von Typhus und Cholera.

Weitere Versuche, um Änderungen der Agglutinabilität zu erzeugen, verdanken wir KIRSTEIN. Der Bac. prodigiosus, der bei 37°

als eine farblose Varietät wächst, wird dadurch inagglutinabel für ein Serum, das durch die rote Varietät erzeugt worden ist. Absorptionsversuche mit der farblosen Varietät ergaben, daß diese Agglutinin aus dem Serum bindet.

Nach Analogien, die in der Lehre von den Hämolysinen zu suchen sind, mußte man annehmen, daß zur Erzeugung eines Immunserums nur das Vorhandensein der bindenden Gruppe notwendig ist. In der Tat konnte Wassermann mit Typhusbazillen, die er durch Säurezusatz der fällbaren Gruppe vollständig beraubt hatte, agglutinierende Sera bei Kaninchen erzeugen, ebenso erhielt Kirstein durch Injektion des bei 37° farblos wachsenden inagglutinabeln Prodigiosusvarietät ein agglutinierendes Serum, aber auch nur für den agglutinabeln, nicht aber für den farblos wachsenden, nicht agglutinabeln Prodigiosusstamm.

Nicolle und Trénel suchten durch geänderte Wachstumsbedingungen die Ausflockungsfähigkeit der Bakterien zu beeinflussen. Sie konnten dies dadurch erreichen, daß sie einen vorher gut agglutinabeln Typhusstamm bei 42° züchteten. Bei dieser Temperatur, die genauestens eingehalten werden muß, weil der Stamm sonst abstirbt, erfolgt das Wachstum nur in Bouillon und zwar sehr spärlich. Nach einigen Passagen bei 42° erwies sich tatsächlich der Stamm viel weniger agglutinabel und nach weiteren Passagen wurde er nur durch die höchsten Serumkonzentratlonen ausgeflockt. Gleichzeitig habe die Beweglichkeit gelitten oder vollkommen aufgehört. Sie bringen daher die Agglutinabilität und Beweglichkeit eines Mikroorganismus in engsten Zusammenhang und meinen, daß vor allem bewegliche Bakterien für die Agglutination geeignet sind und zur Erzeugung von Agglutininen bei Immunisierung taugen. Würde ein solcher bei 42° gezüchteter Typhusstamm unter normale Lebensbedingungen gestellt, so erlangte er bald sowohl Agglutinabilität als auch Beweglichkeit wieder.

Eisenberg konnte bei Nachprüfung der Angaben von Nicolle und Trénel die Befunde dieser Autoren bestätigen. Er macht aufmerksam, daß die Agglutination selbst bei hohen Serumverdünuungen oft langsam erfolgt, weshalb eine lange Beobachtungsdauer notwendig ist. Andererseits neigen solche bei 42° gezüchtete Typhusbazillen zur spontanen Sedimentierung, was die Untersuchung erschwert. Nach einiger Zeit ändert sich aber dieses Verhalten, die Kulturen fangen an bei 42° gut zu wachsen, es gelingt sogar eine Kultur auf Agar, die Beweglichkeit nimmt zu, gleichzeitig auch die Agglutinabilität, doch erreicht sie nicht die von normalen Typhusbazillen. Vergleichende Bindungsversuche solcher 42° Bazillen mit gewöhnlichen ergaben keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden. Während Nicolle und Trénel durch Injektion solcher inagglutinabel gemachter Kulturen angeblich minderwertige Sera erhielten, konnte Eisenberg bei Kaninchen recht hochwertige Sera erzeugen, die allerdings Eigenschaften hatten, wie wir sie nach Injektion von erhitzten Kulturen zu sehen pflegen. Aus diesen Momenten glaubt Eisenberg schließen zu können, daß weder eine Verminderung der Moleküle der agglutinabeln Substanz noch eine Änderung im Moleküle bezüglich der bindenden Gruppe zu konstatieren ist.

Die Bedeutung der Geißeln und Schleimhüllen, die wir hier kurz besprechen möchten, wurde durch vielfache Experimente zu erweisen gesucht. Im Anfang dieser Untersuchungsreihe stehen die Arbeiten von Malvoz und Dineur, denen die von Nicolle und Trénel, Lesieur folgen. Defalle glaubte durch seine Versuche die Wichtigkeit der Geißeln

und ausgebildeten Schleimhüllen für die Agglutinabilität und die agglutinogene Kraft eines Bazillus dargetan zu haben. Bezüglich der Kritik seiner Versuche mit begeißelten Bazillen verweise ich auf Paltauf, der auch für die Resultate von Smith und Reagh eine plausible Erklärung gibt.

Neuerdings hat Gino de Rossi wieder Versuche mit Geißelbakterien angestellt, und zwar verwendete er dazu ein reich begeißeltes, aus Mehl kultiviertes Bakterium, welches der Gruppe des Bazillus subtilis Ehrenberg nahesteht und die Eigenschaft hat, daß seine Geißeln leicht vom Bakterienkörper zu trennen sind. Er verfährt folgendermaßen: von einer 12—18stündigen Agarkultur wird eine Agarplatte geimpft, nach 6 bis 8 Stunden in 15 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt und tüchtig durchgeschüttelt. Durch sehr intensives Zentrifugieren durch $^1/_2$—$^3/_4$ Stunde erhält man in der oberen Flüssigkeit färberisch nachweisbar eine Unmenge Geißeln und nur sehr wenige Bakterien. Wiederholt man mit dem Bodensatz den Vorgang, so kann man 4 Flüssigkeiten erhalten: 1. komplette Flüssigkeit, enthält gegeißelte Bakterien, 2. Geißeln, 3. Bakterien ohne Geißeln nach dem zweiten Zentrifugieren, 4. Abspülungsflüssigkeit, die obere Flüssigkeit nach dem zweiten Zentrifugieren, enthaltend vereinzelte Bakterien und die restlichen Geißeln.

Immunisiert man mit jeder dieser Flüssigkeiten, so erhält man der Reihe nach Titer von 1:1600, 1:750, 1:650, 1:50. Daraus geht hervor, daß, wenn auch der Geißelapparat bei der Agglutininproduktion eine große Rolle spielt, er diese doch mit dem Bakterienkörper teilt.

Durch Bindungsversuche der verschiedenen Sera mit den verschiedenen Aufschwemmungen ließ sich erkennen, daß komplette Bakterienaufschwemmungen und Geißelaufschwemmungen viel mehr Agglutinin absorbieren als die Bakterienaufschwemmung allein, woraus folgt, daß die Geißel für die Agglutininfixierung eine besondere Wichtigkeit hat. Darin sucht Rossi auch den Grund für die höhere Agglutinabilität der beweglichen gegenüber den unbeweglichen Mikroorganismen. Den Einwand, daß mit den Geißeln auch Bestandteile der Bakteriensubstanz extrahiert werden, sucht Rossi zu widerlegen.

Nachprüfungen der Experimente von Nicolle und Treénel mit einem coliähnlichen Mikroorganismus, der, bei 15° gezüchtet, reich gegeißelte und sehr bewegliche Formen bildet, bei 37° fast bewegungslose, spärlich oder gar nicht gegeißelte Individuen bildet, ergaben im Gegensatz zu den genannten Autoren, daß beide Arten agglutinogene Fähigkeiten haben, wenn auch die bei 37° gezüchtete vielleicht etwas geringere, doch zeigt sich dies nur bei Prüfung auf die bewegliche Kultur, während die unbewegliche nur in ganz hohen Konzentrationen agglutiniert. Es hänge dies mit der größeren und kleineren Agglutininbindung zusammen.

Daß es übrigens an der Beweglichkeit, wie Nicolle und Trénel meinen, resp. an der Begeißelung nicht liegen kann, ob Agglutination und Agglutininbildung für einen bestimmten Mikroorganismus zustande kommt, geht schon daraus hervor, daß es gelingt, für von Haus aus unbewegliche oder zufällig unbeweglich gewordene Bakterien selbst hochagglutinierende Sera zu erzeugen. So z. B. das Staphylokokkenserum (Kolle und Otto), Pestserum (R. Pfeiffer), Choleraserum mittels eines unbeweglichen Cholerastammes (Friedberger) und vor allem die Hämagglutination.

Nach den Versuchen von Malvoz, Defalle hat monatelange Autolyse unter Chloroform, Einwirkung von Chlorkali, die Erhitzung von hüllentragenden Bakterien und Sporen großen Einfluß auf deren

Agglutinabilität und agglutininbildende Fähigkeit. Erhitzt man Hefezellen und Sporen, deren Agglutinabilität auch durch normales Serum von Halban gezeigt wurde, auf 115° und injiziert sie Kaninchen, so erzielt man viel höhere Agglutininwerte, als wenn man sie unverändert zur Injektion verwendet. Daraus könnte man deduzieren, daß durch Veränderung der Hülle die Resorptionsmöglichkeit durch den Organismus sowohl als auch die Einwirkungsmöglichkeit von Agglutinin auf so präpariertes Material eine leichtere ist. Den Schluß Defalles dagegen, daß die agglutinogene Substanz in den Hüllen liege, weist Paltauf zurück.

Die Art der Züchtung (Grasberger und Schattenfroh, Shibayama-Pest) kann auf die Morphologie, Biologie und damit auch auf die Agglutinabilität von Einfluß sein.

Kirsteins Züchtungsversuche bei verschiedenen Temperaturen ergaben keine dauernden Änderungen für die Agglutinabilität. Ebensowenig ergab Züchtung auf verschiedenen Nährböden, z. B. Harnagar oder Zusatz zum Agar von Cali causticum in steigender Konzentration einen vollständig inagglutinabeln Stamm. Eisenberg berichtet über verminderte Agglutinabilität von Typhus- und Ruhrbazillen, die in Aszitesbouillon gezüchtet wurden (Aszites $^1/_2$). Passini konnte zeigen, daß der Bacillus putrificus, wenn er auf eiweißhaltigem, zuckerfreien Nährboden gezüchtet wird, im Tierkörper Agglutinine zu bilden vermag, die sowohl auf diesen Stamm als auf den der Gasphlegmone, sofern er auch auf zuckerfreiem Nährboden gewachsen ist, agglutinierend einwirken. Glässner studierte den Einfluß des Nährsubstrats auf die Bildung von Agglutinogen, indem er zu leicht alkalischen Nährböden Zucker und Stickstoff in verschiedener Form und zwar als Aminosäure, Wittepepton und Eiweißlösung zusetzte. Die in solchen verschiedenen Kulturmedien gut gedeihenden Bacterium coli und typhi wurden in ungefähr gleicher Menge in Kochsalz aufgeschwemmt und die Agglutinabilität dieser Aufschwemmung geprüft. Es ergab sich dabei, daß der Zuckerzusatz kaum einen Einfluß auf die Agglutinogenbildung hat, wohl aber die Form, in welcher das Eiweiß zugesetzt wurde, wobei der Zusatz von reinem Eiweiß am günstigsten, Aminosäure am ungünstigsten wirkte. Das Bindungsvermögen dieser verschiedenen Varietäten ergab keine bedeutenden Unterschiede. Bezüglich der agglutininbildenden Fähigkeit zeigte es sich nach Injektionen von Kaninchen, daß Kulturen, die auf zuckerhaltigen Nährböden gewachsen waren, bedeutend weniger Agglutinin zu bilden vermögen als solche aus zuckerfreiem Nährboden, ein Unterschied, der besonders bei flüssigen, weniger bei festen Nährböden zutage tritt. Diese Befunde scheinen die Anschauung Paltaufs zu befestigen, daß gerade für den Immunisationsvorgang Zustandsänderungen im Bakterienplasma von hoher Bedeutung sind.

Hypagglutinabilität.

Alle diese Untersuchungen wurden angeregt durch die auffallende Tatsache, daß frisch aus der Leiche oder aus dem Blut Typhöser gezüchtete Bazillen selbst gegen hochwertige Immunsera eine bedeutende Agglutinationsresistenz zeigen (Widal und Siccard, Achard und Bensaude, Nicolle und Trénel, Förster, van de Velde, Courmont, Sacquepée, Müller u. a. m.). Weeney konstatierte ein ähnliches Verhalten bei einem aus der Gallenblase gezüchteten Typhusstamm. Bancel, Cambier und Emery haben ein solches bei Typhusbazillen aus dem

Wasser gezüchtet, Eisenberg bei einem Bacillus pyocyaneus-Stamm, Lipschütz bei Typhusstämmen aus dem Harn Typhöser. Solche Stämme erlangten meist nach mehrmaligen Überimpfungen auf gewöhnlichen Nährböden normale Agglutinationsverhältnisse, ihre Zugehörigkeit zu den Typhusbazillen zeigte sich auch darin, daß sie starke agglutinogene Fähigkeiten im Tierkörper entwickeln. Rufus J. Cole konnte durch Immunisierung mit einem solchen schwer agglutinabeln Typhusstamm nicht ein Serum erhalten, welches ihn besser als einen leicht agglutinabeln ausflockt. Er meint daher, daß die schwere Ausflockbarkeit eine Eigentümlichkeit des Bakteriums sei. Er hält sie durch eine geringere Zahl von Rezeptoren für begründet, da er durch Absorptionsversuche eine verminderte Bindungsfähigkeit des hypagglutinabeln Stammes nachweisen zu können glaubt. Shibayama konnte dies für verschieden agglutinable Pestkulturen nicht bestätigen.

Friedberger untersuchte ebenfalls die Bindungsfähigkeit eines solchen hypagglutinabeln Typhusstammes, wobei sich zeigte, daß sich Unterschiede zwischen diesem (Stamm N) und einem gewöhnlichen Laboratoriumsstamm (Stamm L) ergaben. Nach Einwirkung einer Serumverdünnung auf jeden der beiden Stämme konnte durch den Stamm L das gesamte Agglutinin für beide Stämme absorbiert werden. Durch den Stamm N dagegen wird kein Agglutinin für den Stamm L absorbiert und nur ein Drittel des Agglutinins für den Stamm N. Prinzipiell die gleichen Resultate erhielt er auch bei Prüfung mit Immunseris verschiedener Tierspezies.

In weiterer Verfolgung dieses Resultates kommt Friedberger zu dem Schluß, daß im Pferdeimmunserum zwei Agglutinine vorhanden sein müßten für den L- und für den N-Stamm. Es ist wahrscheinlich, daß der N-Stamm auch die gleichen Receptoren wie Stamm L enthält, da er ziemlich hochwertige Immunsera für beide zu erzeugen vermag, nur würden die Receptoren in einer Modifikation vorhanden sein, so daß sie ihre Affinität zum Agglutinin eingebüßt haben, nicht aber ihre agglutinogene Wirksamkeit.

Den Weg für einen Erklärungsversuch der Hypagglutinabilität frisch gezüchteter Typhusstämme schien das Verhalten von Bails Exsudatbakterien zu weisen. Er konnte zeigen, daß Typhusbazillen nach mehrstündigem Verweilen in der Bauchhöhle vom Meerschweinchen stark hypagglutinabel geworden sind, ihre Agglutinabilität schon nach einmaliger Züchtung auf künstlichem Nährboden jedoch wieder erreichen. Da die Bindungsfähigkeit der Bakterien verloren geht, führt Bail die Hypagglutinabilität auf Besetzung der Bakterien mit Agglutinophoren (= Agglutinoiden) zurück, weshalb die Bindung des Agglutinins ausbleibt. Ähnliches erreichte Sacquepée durch Züchtung von Typhusbazillen in Kollodiumsäckchen innerhalb des Peritoneums von Ratten, die gegen Typhus immunisiert waren. Versuche Kirsteins, solche Exsudatbakterien durch Züchtung auf stärker alkalihaltigem Nährboden durch mehrere Generationen hypagglutinabel zu erhalten, erwiesen sich bei einzelnen Stämmen bis zur 3.—5. Generation erfolgreich, andere waren bereits nach der ersten Überimpfung normal agglutinabel. Neuere Untersuchungen von Porges und Prantschoff zeigen übrigens, daß bei Bails Exsudatbakterien nur eine Verzögerung der Agglutination, nicht eine Aufhebung derselben vorhanden ist, da bei einer Beobachtungszeit von 24 Stunden (nicht wie Bail nur 6 Stunden) der Agglutinationstiter normaler Bakterien nicht nur erreicht, sondern sogar übertroffen wird.

Ein weiterer Schritt auf diesem Wege war das Studium des Verhaltens von Bakterien in agglutininhaltigen Nährböden. Durch Zusatz von steigenden Konzentrationen Agglutinins konnte Bail agglutininunterempfindliche Rassen erzielen, ein Befund, den vor ihm schon Ransom und Kitashima für Cholerabazillen, später Walker und Müller für Typhusbazillen erhoben haben. Müller konnte zeigen, daß Züchtungen in verdüntem Immunserum auf die Agglutinierbarbeit gar keinen Einfluß hat. Nur bei Zusatz höherer Serumkonzentrationen (1:50) war Hypagglutinabilität zugestande gekommen. Wie lange diese Erscheinung bei Fortzüchtung auf normalen Nährböden bestehen bleibt, gibt Müller nicht an. Jedenfalls konnte er konstatieren, daß hypagglutinable Bakterien eine herabgesetzte Bindungsfähigkeit aufweisen. Kirstein kommt zu ganz ähnlichen Resultaten. Nur Tarchetti berichtet von einer Zunahme der Agglutination bei Züchtung auf agglutininhaltigen Nährböden und Pfeiffer und Friedberger fanden hierbei eine Zunahme der Agglutininbindung.

Auf eine besondere Art hypagglutinabler Typhusbazillen machten Eisenberg, Porges und Prantschoff (Dysenterie, Typhus) aufmerksam. Man setzt zu einer dichten Typhusaufschwemmung eine Verdünnung $^1/_{20000}$ eines Pferdeimmunserums (AgW = 80000 AE), wonach unvollkommene Agglutination eintrat. Die obere Flüssigkeit wurde nun abgehoben und die ursprüngliche Aufschwemmung auf denselben Verdünnungsgrad wie diese gebracht. Bei der nun ausgeführten Agglutinationsprüfung mit dem Immunserum erwiesen sich die Bakterien der oberen Flüssigkeit ungefähr 64mal weniger agglutinabel als die Originalemulsion und bei Wiederholung dieses Vorganges sogar 250mal unempfindlicher. Es sind das exzessive Werte, nicht immer werden diese Differenzen erreicht. Man muß sich darnach jede Bakterienemulsion zusammengesetzt denken aus einer Summe verschieden agglutinabler Varietäten; ob man diese Eigenschaften nach Züchtung weiter erhalten kann, müssen erst Versuche lehren.

Spontanagglutination.

Auch das eigentümliche Phänomen der Spontanagglutination, das zuerst von Nicolle beschrieben wurde, gab Anlaß zu Experimenten zum Zweck künstlicher Hervorrufung dieser Erscheinung. Sie verläuft ganz ähnlich wie die Serumagglutination, indem es bei Gegenwart von Salz in einer Bakterienaufschwemmung spontan zur Bildung feinster Plättchen kommt, die sich langsam zu Boden setzen. Hamburger gelangte durch Züchtung eines Cholerastammes in hoch konzentrierten Immunseris zu einem spontan agglutinierenden Stamm, der diese Eigenschaft mindestens bis zur 26. Passage auf gewöhnlichen Nährböden beibehielt; Porges und Prantschoff konnten ähnliches mit Typhusstämmen erreichen. Erhitzung durch 1 Stunde auf 80° störte den Eintritt der Erscheinung nicht, Hamburgers Bakterien nahmen keine nennenswerten Agglutininmengen aus einem zugesetzten Immunserum an, gaben auch keines ab. Porges und Prantschoff fanden jedoch, daß ein spontan agglutinierender Typhusstamm, wenn auch weniger als ein normaler, so doch Agglutinin aufnahm. Kirstein züchtete neun Typhusstämme auf eiweißfreiem Asparaginagar und erhielt dadurch einmal nach mehreren Überimpfungen einen bei Anwesenheit von NaCl spontan agglutinierenden Stamm; nach 8—10 Überimpfungen auf neutralem Agar hörte die Spontanagglutination wieder auf. — Zu ähnlichen Resultaten kam auch Valagussa.

Sehr interessant sind die Erhitzungsversuche von PORGES und PRANTSCHOFF bei spontan agglutinierenden Bakterien. Selbst kurzes Erhitzen über 65°, am besten auf 80° bringt die Spontanagglutination zum Schwinden, die jedoch nach einstündigem Erhitzen auf 100° wieder erscheint; die Autoren bringen diese Tatsachen mit Verteilung und Zustandsänderungen der Bakterienproteine in Zusammenhang. Von praktischer Wichtigkeit ist es, daß eine auf 80° erhitzte spontan agglutinierende Cholerakultur nun normal agglutinabel wird, was bei Typhuskulturen nicht der Fall ist, entsprechend der verschiedenen Empfindlichkeit der agglutinablen Substanz gegen Temperaturerhöhung. Es kann daher diese einfachere Methode zur Identifizierung spontan agglutinierender Cholerakulturen, bei welchen die gewöhnliche Agglutinationsprobe nicht ausführbar ist, mit dem für solche Fälle von FRIEDBERGER und LÜRSSEN empfohlenen PFEIFFERschen Versuch in Konkurrenz treten. —

Spontan agglutinierende Kulturen werden durch einen Überschuß von normalem oder besser noch erhitztem Immunagglutinin von der Ausfällung bewahrt, eine Erscheinung, welche ihre Parallele in der Hemmung der Ausflockung durch Zusatz von eiweißartigen Kolloiden findet. — Diese Hemmung ist für die Bakterien spezifisch, indem weder normales Pferdeserum mit spontan agglutinierendem Typhus, noch auch Typhusimmunserum mit anderen Bakterienarten dieselbe zustande kommen ließen.

Wiederauftreten der Agglutination nach andauernder Erhitzung.

In ein neues Licht wurden all diese Verhältnisse gerückt, als man durch die Arbeiten von LANDSTEINER und JAGIČ, ZANGGER, BILTZ, NEISSER und FRIEDEMANN, BECHHOLD u. a. auf Analogien der Immunitätsreaktionen, speziell der Agglutination mit den Zustandsänderungen bei Kolloiden aufmerksam wurde. —

DREYER und JEX-BLAKE, PORGES fanden, daß durch 1 Stunde auf 100° erhitzte Typhus- und Cholerabazillen ihre vorher verlorene Agglutinabilität wieder gewinnen; die Agglutination geht bei solchen Bakterien langsamer vor sich als bei normalen, weshalb die Beobachtung nicht nur bei höherer Temperatur (50°) gemacht, sondern auch auf längere Zeit ausgedehnt werden soll; auch scheint die Dichte der Bakterienaufschwemmung eine Rolle zu spielen, indem sie bei dichteren Aufschwemmungen früher oder überhaupt nur bei solchen auftritt. — 1—2,5% Formalinzusatz verzögert den Eintritt der Inagglutinabilität bei Erwärmung (PORGES, BUXTON und VAUGHAN), was vielleicht mit der verringerten Koagulabilität des Bakterienproteins in Zusammenhang steht; EISENBERG meint aber, daß bei Erhitzung auf 100° der Formolzusatz sogar ein die Hemmung förderndes Mittel ist.

Auch längere Einwirkung von verdünnter Säure läßt die vorher verlorene Agglutinabilität wieder zum Vorschein kommen, so daß die durch kurze Hitze- resp. Säurewirkung entstandene Inagglutinabilität nur eine vorübergehende Zustandsänderung ist. PORGES fand unter 25 Typhusstämmen nur einen, der erst nach mehrstündigem Erhitzen auf 100° seine Ausflockungsfähigkeit unvollkommen wiedergewann; gewisse Differenzen in den Resultaten der Autoren fänden darin eventuell ihre Erklärung. Die Agglutination solcher Bakterien ist eine spezifische Serumreaktion, da Normalserum, Eiklar sie nicht hervorruft, auch beweist der Bindungsversuch, daß es nur ein einheitliches Agglutinin ist (EISENBERG und VOLK, SCHELLER, PORGES).

Wenn auch noch keine vollständige Erklärung für alle Erscheinungen vorliegt, so ergaben doch die Befunde von Porges wenigstens teilweise befriedigende Aufschlüsse. — Angeregt durch die Untersuchungen von Neisser und Friedemann und Bechhold über die Einwirkung von Salzen auf die Ausflockungsfähigkeit der Bakterien, trachtete er den Beweis für die Existenz einer agglutinationshemmenden Substanz zu erbringen. Werden nicht agglutinable 80°-Bakterien mit NaCl-Lösung extrahiert oder in einer Reichelschen Tonkerze gewaschen, so erlangen sie ihre Agglutinabilität zum Teil wenigstens wieder, ein Beweis, daß die hemmende Substanz ihnen entzogen worden ist.

Es fragt sich nun, welches die Natur dieser hemmenden Substanz sei. Die verminderte Färbbarkeit der 100° Bakterien, die Erhöhung der Alkaleszenz einer solchen Aufschmemmung ließen auf eine Veränderung der Bakterienproteine schließen. In der Tat ließ sich durch Einwirkung von Alkalien auf Typhusbazillen eine schleimige Substanz isolieren, die durch die Fällungs- und andere Reaktionen sich als den Nukleinen und Nucleoproteinen nahestehend erwies.

Bei Erwärmung auf 100° verlor diese Lösung ihren schleimigen Charakter. Daß das Nuklein eine ausschlaggebende Rolle für die Agglutinabilität hat, beweist auch folgender Versuch. Versetzt man eine dichte Typhusbazillenaufschwemmung mit $^1/_4\,\%$ Normalnatronlauge und neutralisiert sofort, so entsteht eine schleimige Aufschwemmung, ähnlich wie bei Erhitzung auf 80°. Diese wird nun so weit verdünnt, daß die Viskosität normal erscheint. Zusatz selbst unverdünnten Serums ergibt nun keine Agglutination. Wird dagegen die schleimige unverdünnte Aufschwemmung durch eine Stunde auf 100° erhitzt, wodurch sie wieder dünnflüssig wird, so kann sie noch mit einer Serumverdünnung 1:100 agglutiniert werden. Man müßte sich also den Vorgang so vorstellen, daß, da das Nuklein durch die oben geschilderten Eingriffe verändert wird, die Hemmung infolge Eingriffen auf die Bakterien in der Weise vor sich geht, daß das Nuklëin aus einer höhermolekularen Substanz abgespalten wird; bei längerer Erwärmung auf 100° wird das Nuklein weiter abgebaut und die Ausflockungsmöglichkeit dadurch wieder hergestellt. In saurer Lösung verläuft der Prozeß des Erscheinens und Verschwindens der Hemmung zeitlich rascher und auch schon bei niedrigerer Temperatur. Durch längeres Erhitzen einer sauren Lösung kommt es in ihr zur Spontanagglutination, offenbar infolge der vollständigen Zerstörung des hemmenden Körpers.

Weitere Versuche klärten darüber auf, daß der Hemmungskörper nicht in der freien Flüssigkeit, sondern an der Oberfläche der Bakterien wirke.

Auch für Cholerabazillen konnte ähnliches gefunden werden, nur scheint bei ihnen der Hemmungskörper in geringerer Menge vorhanden zu sein, wodurch auch das leichte Zustandekommen der Spontanagglutination der Cholerakulturen erklärlich wäre.

Paltauf hat den Gedanken ausgesprochen, daß die Unmöglichkeit ein Immunserum für Kapselbakterien zu erzeugen, nicht so sehr auf ein refraktäres Verhalten der Tiere zu beziehen sein dürfte, als vielmehr auf eine Eigentümlichkeit der agglutinogenen Substanz. Dafür schienen auch gewisse Erscheinungen bei anderen Kulturen zu sprechen. So konnte Shibayama konstatieren, daß die schwere Agglutinierbarkeit von Pestbakterien, die bei 37° kultiviert wurden, im Vergleich zu solchen die bei Eisschranktemperatur wuchsen, mit der schleimigen, fadenziehenden

Beschaffenheit der ersteren in Zusammenhang stehen dürften. Es lag nahe, den Einfluß erhöhter Temperaturen auf die Agglutinierbarkeit der Kapselbakterien zu prüfen. Diese Versuche waren jedoch erst dann von Erfolg gekrönt, als man die in 10 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmte Agarkultur zuerst mit $^1/_4$ % Normalsäure ansäuerte, hierauf durch 15 bis 30 Minuten einer Temperatur von 80° aussetzte und dann mit $^1/_4$ % Normalnatronlauge wieder neutralisierte. Die Neutralisierung muß sehr exakt gemacht werden, da durch eine auch nur vorübergehende Überneutralisierung die Bakterien aufgelöst werden. Es hängt dies offenbar mit der erleichterten Hydrolyse des Bakterienproteins in saurer Lösung zusammen.

Dieselben Versuche, bei den auf irgend eine Art inagglutinabeln Bakterienstämmen angewendet, ergaben ähnliche Resultate. Wurden frisch aus dem Tierkörper gezüchtete in- oder hypagglutinable Typhusbazillen 1 Stunde auf 100° erhitzt, so erzielte man konstante Agglutinationstiter, die ebenso hoch waren wie bei 100° Bakterien einer normalen Kultur, die ja stets bedeutend niedriger sind als der Serumtiter mit unbeeinflußten Typhusstämmen geprüft. Da die Agglutination mit 100° Bakterien stets eine streng spezifische ist, so ist dieses Verfahren bei der Bakterienbestimmung mit Vorteil schon deshalb anzuwenden, weil Irrtümer durch inagglutinable Bakterien (siehe Fall SCHMIDT) ausgeschlossen erscheinen. Als Serum wäre ein solches zu verwenden, das durch Injektion mit erhitzten Bakterien gewonnen wurde, da dieses mit 100° Bakterien höhere Agglutinationswerte gibt. — In der Tat konnte diese Methode bei verschiedenen Bakterien erfolgreich angewendet werden (Staphylo-, Streptokokken).

Auch ein inagglutinabler Prodigiosusstamm, der nach KIRSTEIN durch Züchtung bei 37° inagglutinabel wächst, konnte durch Ansäuerung und Erhitzung auf 80° zur Ausflockung gebracht werden.

Aus diesen Befunden scheint hervorzugehen, daß die Stabilität der Bakteriensuspension mit der Menge des Bakterienproteins zusammenhängt. Wird diese durch partielle Hydrolyse verringert, so wird die Suspension auch leichter ausflockbar; nebenbei könnten ja auch noch andere, uns derzeit nicht bekannte Faktoren mitwirkend sein.

Ist nun die Annahme richtig, daß der Suspensionszustand einer Bakterienaufschwemmung durch ihr Eiweiß bedingt ist, so müssen ähnliche Gesetze gelten wie bei der Ausflockung der Eiweiskörper. — In der Tat konnten NEISSER und FRIEDEMANN, BECHHOLD konstatieren, daß normale Bakterien durch keine Konzentration von NaCl, Na_2SO_4, $NaNo_3$, also Leichtmetalle, fällbar sind, soweit keine Eiweißfällung zustande kommt. — Sucht man nun die Ausflockungsgrenze nach HOFMEISTERS Methode mittels Ammonsulfat für verschieden dichte Emulsion zu ermitteln, so findet man, daß die untere Ausflockungsgrenze mit zunehmender Verdünnung der Bakterienaufschwemmung steigt, während die obere Ausflockungsgrenze konstant bleibt, ein Verhalten, wie es den Eiweißkörpern bei der Salzfällung zukommt, wozu auch noch die Reversibilität des Prozesses kommt.

Dementsprechend sind die Salzfällungsgrenzen um so höhere, je schwerer die Bakterien agglutinabel sind. Vergleicht man normale, 80° und 100° Bakterien unter einander, so findet man, daß die ersten am leichtesten, die 80° Bakterien am schwersten aussalzbar sind; sie verhalten sich also ähnlich wie gegenüber einem Immunserum. Die Schwermetalle wirken in ähnlicher Weise auf die Bakterienemulsion wie auf ihre Eiweißkörper.

Das Agglutinin.

Darstellung.

Das Agglutinin entsteht nur im tierischen Organismus nach Injektionen von agglutinogener Substanz. Die Ansicht von Emmerich und Löw, später von Nicolle, daß Agglutinin auch in älteren Bakterienkulturen ohne Vermittlung des tierischen Organismus entstehen können, muß mindestens insofern zurückgewiesen werden, als es sich höchstens um chemische Agglutinine handelt, die nicht mit den Serumagglutininen zu identifizieren sind.

Zur Injektion können sowohl abgetötete als auch lebende Bakterien verwendet werden. Kolle, Gottschlich u. a. empfehlen abgetötete Kulturen zu nehmen, wenn man rasch Agglutininwerte erhalten will. Es entstehen auch Agglutinine, wenn man hierzu die keimfreien Filtrate von Kraus verwendet, die in der Weise gewonnen werden, daß Bakterien längere Zeit in Bouillon gezüchtet und dann durch ein Pukallfilter filtriert werden (Leyv). Ebenso konnten Neisser und Shiga mit ihren freien Rezeptoren von Typhus- und Dysenteriebazillen agglutinierende Immunsera bekommen. Die Versuchsanordnung zur Gewinnung solcher freier Rezeptoren ist folgende: Eintägige Agarkulturen werden in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, hierauf 1 Stunde bei 60° erhitzt und dann 2 Tage bei 37° gehalten. Intravenöse Injektion nach Filtration einer solchen Aufschwemmung gibt außerordentlich hochwertige Immunsera, wobei hervorzuheben ist, daß die Filtrate für die Tiere ungiftig sind. Die Extraktionstemperatur von 60—75° ist insofern von Einfluß, als solche Filtrate die höchstwertigen Immunsera geben. Gino de Rossi nimmt an, daß die freien Rezeptoren identisch sind mit seiner filtrierten Geißelflüssigkeit. Auch Buchnersche Preßsäfte von Bakterien eignen sich zur Injektion, ebenso konnte mit den durch chemische Einwirkung erhaltenen Bakterienextrakten agglutinierendes Serum gewonnen werden (Brieger und Mayer, Schütze, Pick usw.).

Das Agglutinogen ist imstande, durch semipermeable Substanzen zu diffundieren; es ist daher möglich, durch Einverleibung von Bakterien, die in Kollodiumsäckchhen eingeschlossen sind, Immunsera zu gewinnen. Bei gemischter Infektion mit zwei verschiedenen Bakterienarten nimmt das Serum für jede der beiden gewöhnlich denselben Titer an, wie wenn man das Bakterium allein injiziert; nur wird in einzelnen Fällen der Beginn des Agglutinationsvermögens verzögert, wenn das zweite Bakterium einige Zeit nach dem ersten injiziert wird (Castellani).

Die Art der Einverleibung des Agglutinogens ist von bedeutendem Einfluß auf die Agglutininproduktion, insbesondere auf die Schnelligkeit der Entstehung derselben und auf die Höhe des Titers des Immunserums. Am günstigsten scheint in dieser Hinsicht die intravenöse Injektion abgetöteter Kulturen, doch kann man auch alle möglichen anderen Arten der Einverleibung mit positivem Resultat anwenden, so die subkutane, intraabdominelle, intrapleurale, intrapulmonale, stomachale. Auch durch Einreiben von lebenden oder toten Bakterien in die rasierte, unverletzte Haut von Kaninchen gelang es Hoffmann und Karsten den Kaninchenorganismus zur Erzeugung von Agglutinin anzuregen. Selbstverständlich gibt nicht jede Methode gleich gute Resultate.

Schon durch geringste Bakterienmengen produzieren gewisse Tiere bei geeigneten Bakterienarten mitunter bedeutende Agglutininmengen, ebenso wie dies OBERMAYER und PICK für Eiweißlösungen nachgewiesen haben. Für länger dauernde Immunisierungen zur Erzeugung hochwertiger Sera geht man gewöhnlich so vor, daß man mit geringeren Bakterienmengen anfängt und allmählich nach Ablauf der Reaktion zu höheren aufsteigt. Bei entsprechender Wahl des zur Immunisierung verwendeten Tieres kann man mit gewissen Bakterienarten hunderttausende von Agglutinineinheiten im Kubikzentimeter Serum gewinnen.

Eigenschaften des Agglutinins.

Bereits WIDAL und SICARD erkannten, daß die Agglutinine etwas mit den Globulinen zu tun haben, und bis heute ist es nicht gelungen, die Agglutinine eiweißfrei darzustellen. PICK fand, daß im Immunserum das Agglutinin nicht immer an derselben Globulinfraktion haftet, denn es hängt das Typhusagglutinin im Pferdeimmunserum an der Pseudoglobulinfraktion, bei der Ziege z. B. an der Euglobulinfraktion (s. PRIBRAM, Bd. II, pag. 81). Ähnliche Unterschiede ergaben sich auch je nach der Bakterienart. PALTAUF macht darauf aufmerksam, daß solche Unterschiede extreme Verschiedenheiten sind, während wir sonst feine Unterschiede, die zwischen den Agglutininen verschiedener Tiere bestehen nur biologisch, nicht aber chemisch nachweisen können (WASSERMANN, LIPSCHÜTZ).

Das Agglutinin erweist sich gegen kurze Einwirkung von Verdauungsfermenten resistent, während es der längeren Einwirkung von Trypsin nicht widersteht. Gegen Erhitzung sind die Agglutinine verschieden empfindlich, so wird das Pest- und Tuberkuloseagglutinin schon bei 56° vernichtet, während andere Agglutinine höhere Temperaturen entweder ohne Einbuße oder mit geringer Abschwächung vertragen. Auch die Tierart, von der das Agglutinin gewonnen wird, ist nicht ohne Einfluß, so ist das Typhusimmunserum vom Pferd weniger resistent als das vom Kaninchen. Verhindert man durch Zusätze, z. B. von Harnstoff die Koagulation des Eiweißes, so werden noch höhere Temperaturen gut vertragen (PICK, EISENBERG und VOLK). PICK konnte durch wiederholte Salzfällung das Typhusagglutinin im Pseudoglobulin eiweißarm darstellen, wobei es dann Temperaturen von 80—90° ohne Schädigung vertrug. Das Agglutinin ist nicht dialysierbar. Die Ansicht ASAKAWAS, daß das Agglutinin nur ein modifiziertes Globulin (Agglutinoglobulin) sei, wird durch die Argumente PALTAUFS entkräftet.

Wenn gewisse Agglutinine bereits bei solchen Temperaturen eine Abschwächung erfahren, bei denen das Eiweiß nicht sichtbar verändert wird, so spricht das nicht gegen den Zusammenhang beider Substanzen, da ja die sichtbaren Veränderungen des Eiweißmoleküls schon tiefgehende Umsetzungen bedeuten, deren erste bei niedriger Temperatur eintretende Phasen uns eben nicht sinnfällig werden. Austrocknung verträgt das Agglutinin gut, es beruht ja auf der Eintrocknung von Agglutinin auf Filtrierpapier im Vakuum bei 20—30° die Herstellung von Testpapieren. Solches eingetrocknetes Agglutinin verträgt Erhitzung bis 100°, um erst bei 135°, bei welcher Temperatur die Eiweißkörper in trockenem Zustand denaturiert werden, zugrunde zu gehen. Einwirkung verschiedener schädigender Agentien summiert deren Wirkung auf die Agglutinine.

Wie wir später sehen werden, sind EISENBERG und VOLK auf Grund ihrer Versuche zum Schlusse gelangt, daß man am Agglutinin eine bindende und eine fällende Gruppe unterscheiden müsse. JOOS ist auf

andere Weise dazu gekommen, das Typhusagglutinin als nicht einheitliche Substanz aufzufassen. Er trennte am Agglutinogen zwei Anteile, das α-Agglutinogen, welches bei 60—62° zerstört wird, und das β-Agglutinogen, das thermostabil ist. Das α-Agglutinogen erzeugt im Tierkörper ein thermostabiles α-Agglutinin, während das β-Agglutinogen ein thermolabiles β-Agglutinin, das bei 60—65° zerstört wird, produziert. Gewinnt man ein Typhuspferdeimmunserum durch Injektion von lebenden Bazillen, so verliert dieses Serum bei Erhitzung auf 60—62° durch eine Stunde nichts an Agglutinationskraft gegen lebende Kulturen. Werden nun die Bakterien durch eine Stunde auf 60—62° erhitzt, so wirkt das unveränderte Serum nur in bedeutend höheren Konzentrationen, während das erhitzte Serum gar nicht wirkt. Ließ man erwärmte Bakterien durch unverändertes Serum agglutinieren und prüfte hernach die obere Flüssigkeit auf ihren Agglutinationstiter, so wurden erwärmte Bakterien gar nicht agglutiniert, während gegenüber normalen Bakterien sich keine Abnahme im Werte zeigte, wodurch die Trennung der beiden Agglutinine möglich war. — Ganz ähnliche Resultate wurden mit niedriger wertigen Meerschweinchensera erzielt.

Injiziert man Kaninchen β-Agglutinogen allein (nach Zerstörung des α-Agglutinogens durch Erwärmung) so erhält man ein Immunserum, das nur β-Agglutinin enthält. Dieses kann sich je nach Umständen mit dem α- und β-Agglutinogen verbinden, es werden durch dasselbe normale und erhitzte Bakterien gleich hoch agglutiniert, auch ist der Überschuß in beiden Fällen gleich groß. Während also das β-Agglutinin sich mit beiden Agglutinogenen verbindet, hat das α-Agglutinin bloß eine Affinität zum α-Agglutinogen. — Das β-Agglutinin verliert jedoch durch Erwärmung auf 63° nicht vollständig seine Wirksamkeit, sondern nur die Fähigkeit, Bakterien zu fällen, wird aber noch von ihnen gebunden und schützt sie vor der Einwirkung aktiven Agglutinins; das α-Agglutinogen verliert auch nur seine Fällbarkeit durch Erwärmung, bindet aber noch Agglutinin (Kraus und Pirquet).

Diese Verhältnisse, die Joos direkt als Schema für das Agglutinogen und das Agglutinin aufgestellt hat, erwiesen sich bald durch die Untersuchungen von Scheller in dieser Form als nicht richtig. Scheller konnte nachweisen, daß sowohl durch normale Bakterien als auch durch solche, welche auf 60°, ja sogar auf 100° erhitzt waren, das Agglutinin in gleicher Weise absorbiert werden konnte. Auch konnte er, wenn er mit einem virulenteren Stamm als Joos arbeitete, keinen Unterschied in der Wirkung des erhitzten Agglutinins auf normale und 62°-Bakterien konstatieren. Er, sowie Kraus und Joachim zeigten, daß Injektion von 60°-Bakterien die größte Ausbeute an Agglutinin gibt. Er konnte die Behauptung von Joos bestätigen, daß es Modifikationen in der Agglutininstruktur gebe, je nachdem man mit normalen Typhusbazillen oder mit auf 60° erhitzten Typhusbazillen die Immunisierung vornimmt. Man muß sich also beide Substanzen nicht als einheitliche, sondern als sehr kompliziert zusammengesetzte denken. Dagegen ist die Joossche Annahme als nicht berechtigt anzusehen, daß man für verschiedene Bakterienleibermodifikationen auch streng spezifische Agglutininmodifikationen unterscheiden könne.

Zu ganz ähnlichen Anschauungen führten die gleichzeitig publizierten Versuche von Kraus und Joachim. Auch diese Autoren kommen zu dem Resultate, daß zwar die beiden Typen, die Joos aufgestellt hat, bestehen, aber daß überhaupt keine Gesetzmäßigkeit vorhanden ist. Ihre

Bildung und die Mengenverhältnisse hängen ab von der jeweiligen Zustandsphase der agglutinogenen Substanz und dem Rezeptorenapparat des Organismus. Schon daraus geht hervor, wie wechselnd und mannigfaltig das Verhältnis sein kann, in welchem sich die beiden Substanzen im Immunserum vorfinden. Sie erweiterten die Joosschen Versuche noch durch die Übertragung derselben auf Filtrate und Auszüge von Bakterien.

Die Unterschiede in der Wirkungsweise des Immunserums, je nachdem ob es mit normalen oder mit erwärmten Bakterien gewonnen wurde, legten Paltauf den Gedanken nahe, ob es sich hierbei nicht um ähnliche Verhältnisse handle, wie sie Obermayer und Pick für präzipitierende Immunsera gefunden haben, je nachdem sie die Tiere mit geniunem oder durch Erhitzung und chemische Agentien verändertem Eiweiß injizierten. Porges, der diesbezügliche, von Kraus und Joachim bereits begonnene Versuche machte, kam zu dem Resultat, daß Sera, die mit lebenden Bakterien vom Pferde gewonnen wurden, auf 100° durch eine Stunde erhitzte Bakterien nur ganz wenig agglutinieren, während solche mit 80°-Bakterien gewonnene 100°-Bakterien nur wenig schwächer als normale Bakterien agglutinieren. Auch bei Kaninchen ließen sich zwei streng geschiedene Typen unterscheiden, indem die mit lebenden Kulturen gewonnenen Sera für 100°-Bakterien im Verhältnis zu normalen viel geringere Werte zeigten als mit erwärmten Bakterien gewonnene.

Er benutzte 100°-Bakterien deshalb, weil Bakterien, die über 60° erhitzt sind infolge Abspaltung eines Nukleins aus dem Nukleoprotein nicht ausflockbar werden. Diese Inagglutinabilität verschwindet jedoch, sobald die Bakterien durch eine Stunde gekocht werden. Prinzipiell war also die Zustandsspezifität für Bakterinagglutinine nachgewiesen. Da das Eintreten der Inagglutinabilität nicht an einen Temperaturgrad gebunden ist, sondern von Bakterien zwischen 60—63° schwankt, ließen sich auch damit die Befunde von Joos erklären, der durch Injektion von auf 60° erhitzten Bakterien gleiche Agglutininwerte für 60°- und normale Bakterien erhielt, wogegen ein mit normalen Bakterien gewonnenes Agglutinin erhebliche Unterschiede zeigte, je nachdem zur Prüfung normale oder erhitzte Bakterien verwendet wurden. Um daher vergleichbare Resultate zu bekommen, mußte der ganze Versuch mit derselben Aufschwemmung erwärmter Bakterien gemacht sein. Die zustandsspezifischen Agglutinine lassen sich durch selektive Absorption von einander nicht trennen, wie Porges in Absorptionsversuchen nachweisen konnte. Versetzte er je eine Verdünnung 1:20 eines mit 80°-Bakterien gewonnenen Pferdeserums mit der gleichen Menge normaler und 100°-Bakterien, ließ sie 6 Stunden im Brutschrank stehen, so wurde von beiden annähernd gleich viel Agglutinin für normale und 100°-Bakterien absorbiert. Porges kommt daher zum Schluß, daß „die Spezifität für den Zustand der zur Injektion verwendeten Bakterien nicht auf zustandsspezifische Absorption, sondern in anderen Verhältnissen ihre Ursache hat“.

Bleibt man auf dem Boden der Ehrlichschen Seitenkettentheorie, so hat es sich darum gehandelt, ob man die Agglutinine als Rezeptoren III. Ordnung (Bail) oder II. Ordnung (Ehrlich, Eisenberg und Volk, Wassermann, Kirstein u. a.) ansehen soll. Bail ist zu seiner Annahme, die Agglutinine seien Rezeptoren III. Ordnung und in ihrer Konstitution den Hämolysinen gleichzustellen, aus dem Grunde gekommen,

weil es ihm mehrmals gelungen ist, mit inaktivierten Agglutininen beladene (Typhus-)Bakterien durch Hinzufügung nicht agglutinierenden normalen Serums zur Ausfällung zu bringen. Der Versuch wird so gemacht, daß man durch 1 Stunde auf 75° erhitztes Immunserum — Verdünnung $^1/_{10}$, weil in konzentriertem Zustand erhitzt die Eiweißkörper ausfallen — auf Bakterienaufschwemmung durch 2—3 Stunden bei 38 bis 42° einwirken läßt, hierauf das komplettierende Serum zugibt. Selbstverständlich darf in der Kontrolle weder das inaktivierte Immunserum, noch auch das normale Meerschweinchenserum an sich agglutinieren. Statt des letzteren verwendet man mit Vorteil Peritonealexsudat von Meerschweinchen, denen intraperitoneal sterile Bouillon oder Stärkelösung eingespritzt worden war.

Eisenberg sowie Shibayama konnten die Befunde Bails bestätigen, ersterer verwendete zur Komplettierung Peritonealexsudate von Meerschweinchen und Kaninchen, letzterer normales Kaninchenserum, doch komplettierte dieses nur inaktiviertes Pferdeimmunserum. Shibayama konnte die Agglutininkomplemente durch Erhitzung auf 56° innerhalb 10 Minuten zerstören, auch gelang es ihm die normalen Agglutinine eines Kaninchenserums durch Bakterien zu absorbieren, ohne daß es die komplettierende Wirkung verlor. Inaktiviertes Kaninchenserum war durch Zusatz von normalem Kaninchenserum nicht reaktivierbar. Eisenberg mußte bei seinen Versuchen große Mengen Exsudat zugeben. Im Gegegensatz zu den Komplementen im Normalserum (Zerstörung bei 56°) halten sie im Exsudat 1 Stunde lange Erhitzung auf 75—80° ohne Schädigung aus, nehmen erst von 85° an progressiv ab, um bei 100° ganz zerstört zu werden. Doch darf dieses Verhalten nicht ohne weiteres als eine prinzipielle Verschiedenheit angesehen werden, sondern man muß vor allem an die große Differenz im Eiweißgehalt zwischen Serum und Exsudat als Ursache denken.

Wenn nun auch in einer Anzahl von Fällen die Reaktivierung von Immun- und Normalseris (Eisenberg) gelingt, so ist dies doch nichts absolut konstantes. Dies ist auch der Grund, weshalb über die Konstitution des Agglutinins derzeit noch kein definitives Urteil gefällt werden kann, zumal die Trennung der beiden Körper im Immunserum bisher nicht möglich war, wie dies bei den Hämolysinen Ehrlich und Morgenroth durch den Kälteversuch gelang.

Ja, die neueren Erfahrungen über die Natur des Agglutinins, welche dasselbe als ein Kolloid auffassen und seine Wirkungsweise mit der eines fällenden Kolloids in eine Parallele setzen, würden die Annahme einer komplexen Natur desselben überflüssig machen. Es bleibt einem andern Kapitel (s. Porges) vorbehalten, die diesbezüglichen Versuche, sowie die Erklärungen mancher oben angeführten Tatsachen von diesem Gesichtspunkte aus zu beleuchten.

Über Avidität der Agglutinine.

Auf Grund von Bindungsversuchen ist P. Th. Müller jüngst zu der Ansicht gelangt, daß im Immunserum Agglutinine verschiedener Avidität vorhanden seien. Die Technik dieser Versuche ist folgende: Vorausgesetzt, daß im Serum verschieden avide Partialagglutinine vorhanden sind, so werden zunächst die avidesten gebunden werden, da sich ja die Avidität durch die Reaktionsgeschwindigkeit und Vollständigkeit der Absorption kundgibt. Im übrigbleibenden Teil des Serums werden

demnach die weniger aviden Agglutinine prävalieren. — Im Versuch wird sich dies dadurch kenntlich machen, daß der Absorptionskoeffizient i. e. das Verhältnis von absorbiertem zu zugegebenen Agglutinin kleiner bei der II. als bei der I. Absorption sein wird. Da aber nach den Versuchen von Eisenberg und Volk die Absorption eine um so vollkommenere ist, je geringer die verwendete Ambozeptorenmenge, so wird die Abnahme derselben durch die erste Absorption der Verminderung des Absorptionskoeffizienten unter Umständen entgegenwirken. Dem Einwurf kann man begegnen, wenn zum Versuche einerseits die obere Flüssigkeit eines Serums verwendet, das mit dem Antigen bereits beisammen war, und andererseits eine gleich starke, durch NaCl-Lösung hergestellte Verdünnung; im letzteren Falle müßte also der Absorptionskoeffizient größer sein.

Es wurde demnach von einer Standardaufschwemmung von karbolisierten Bakterien eine bestimmte Menge mit dem Serum in Verbindung gebracht, nach einiger Zeit abzentrifugiert, der Titer der oberen Flüssigkeit bestimmt und dann wieder Bakterien zugegeben; so konnte man den Absorptionsversuch mehrmals wiederholen. Gleichzeitig wurde der Absorptionskoeffizient der entsprechenden Serumverdünnung bei einmaliger Absorption bestimmt. Selbstverständlich hat Müller alle etwaigen Versuchsfehler, die in der Verdünnung mit Kochsalzlösung, im Karbolzusatz usw. gelegen sein könnten, durch Kontrollversuche ausgeschaltet.

Aus den Versuchen ergab sich, daß „die Absorption eine weniger vollständige war, wenn die Verminderung der dargebotenen Antikörpermengen durch wiederholte Absorption bewirkt wurde, als wenn dieselbe durch passende Verdünnung des Ausgangsserums erzielt worden war“. Diese Tatsache läßt sich leicht erklären, wenn man annimmt, daß zuerst die stärkst aviden Fraktionen gebunden werden, so daß für die späteren Absorptionen weniger avide zurückbleiben. Ähnliche Verhältnisse ließen sich auch mit ganz frischen Immunseris nachweisen, so daß der Schluß berechtigt ist, daß Aviditätsunterschiede bereits im frischem Serum vorgebildet sind.

Verfolgt man die Absorptionsverhältnisse im Laufe der Immunisierung, so kann man eine allmähliche Aviditätssteigerung konstatieren, was sich in der Zunahme des Absorptionskoeffizienten kundgibt. Daraus erklärt sich, daß im Immunserum gleichzeitig verschieden avide Substanzen vorhanden sind, indem die aus der ersten Zeit der Immunisierung geringere Avidität zeigen als die aus der letzten Zeit nach mehreren Injektionen.

Ähnliche Aviditätsunterschiede — allerdings zwischen Normal- und Immunantitoxin — hat zuerst Kraus beim Vibrio Nasik gefunden, indem er zeigen konnte, daß das Normal- und Immunserum von Ziegen und Pferden gegenüber dem Toxin dieses Vibrio sich oft nur durch die Schnelligkeit der Bindung nicht aber quantitativ unterscheidet. Andererseits ergeben die Versuche von Kraus und Doerr mit dem Dysenterieantitoxin nicht nur eine quantitative Zunahme, sondern auch eine Erhöhung der Avidität, welche sich durch Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit geltend macht. Während nämlich anfangs nur in vitro eine Paralisierung des Giftes möglich war, gelang diese bei weiterer Immunisierung der Ziegen auch bei gleichzeitiger getrennter intravenöser Injektion und schließlich auch kurativ. —

Auch auf anderem Wege konnte Müller Aviditätsunterschiede im Immunserum nachweisen. — Ließ man aus einem Immunserum nacheinander durch Bakterien das Agglutinin absorbieren und versuchte dann, nach gründlicher Waschung der Bakterien, das absorbierte Agglutinin

durch $^1/_4$stündige Erhitzung auf 60° wieder frei zu bekommen, so mußten sich Unterschiede zwischen der 1. und den späteren Absorptionen ergeben. — In der Tat zeigte es sich, daß das bei der 2. Absorption gebundene Agglutinin in viel größerer Menge frei wurde als das bei der ersten, weil eben die weniger aviden Agglutinine leichter abgegeben wurden. —

Nachuntersuchungen von M. v. Eisler haben keine vollständige Bestätigung der Befunde von Müller ergeben. Er konnte zeigen, daß kein direkter Zusammenhang zwischen Avidität und Wertigkeit agglutinierender Sera besteht; die Avidität muß als eine Eigenschaft des Serums für sich aufgefaßt werden. Es können allerdings hochwertige Sera eine höhere Avidität als minderwertige besitzen, ebenso können aber auch minderwertigere Sera gleiche oder sogar höhere Avidität zeigen als manche hochwertige.

Entstehung der Agglutinine.

Was den Ort der Entstehung der Agglutinine anbelangt, haben die Untersuchungen noch nicht zu einem einheitlichen Resultat geführt. Gruber nahm eine Beteiligung der Leukocyten in der Weise an, daß diese die Bakterienbestandteile aufnehmen, diese hierauf durch Makrophagen in die agglutininbildenden Organe gebracht werden. Viele andere Untersucher wiesen jedoch die Beteiligung der Leukocyten deshalb zurück, weil im leukocytenhaltigen Infiltrat an der Injektionsstelle und im Peritonealexsudat keine Agglutinine nachgewiesen werden konnten. Nachdem Pfeiffer und Marx, A. Wassermann ihre Versuche über die Antitoxinbildung im Organismus publiziert hatten, suchte man auf ähnliche Weise auch für die Agglutinine zu einem Resultat zu kommen. Die Versuchsanordnung ist die, daß in den ersten Tagen nach der Injektion das Tier durch Entbluten getötet wird, eventuell die Organe mit Kochsalzlösung durchgespült werden, um das restliche Serum aus ihnen zu entfernen. Hierauf werden bestimmte Gewichtsmengen von Organen mit einer Menge Kochsalzlösung verrieben und damit vergleichende Versuche bezüglich der Agglutininmenge in Serum und Organ angestellt. Van Emden und Jatta fanden hierbei, daß die Organaufschwemmung von Milz, eventuell auch von Lymphdrüsen und Knochenmark in den ersten Tagen mehr Agglutinine enthielt als das Serum. Deutsch, der immer zuerst Agglutinine im Serum fand, will nicht entscheiden, ob die Agglutinine im Blut entstehen oder aber von der Bildungsstätte sehr rasch ins Blut abgegeben werden. Auch andere Autoren fanden den Agglutiningehalt des Serums höher als den der Milz (Courmont, Castellani, Rath usw.) Kraus und Schiffmann meinen, daß die Gefäße es sind, welche für die Bildung von Agglutinin hauptsächlich in Betracht kommen. Vielleicht spielt auch bei der Agglutininproduktion der Umstand eine Rolle, mit welchem Organ das Agglutinogen zuerst in Berührung kam, wie dies Wassermann und Citron für die Typhusimmunkörper nachgewiesen haben.

Die Untersuchungen über das Auftreten des Agglutinins im Serum der Warmblüter haben übereinstimmend ergeben, daß dies nicht sofort nach der Injektion der Fall ist, sondern nach einer 2—4 tägigen Inkubationszeit. Sie erscheinen dann meist plötzlich, erreichen rasch seltener allmählich ansteigend, ein Maximum zwischen dem 7. 13. Tage (zweite Phase Jörgensen und Madsen). In der dritten Phase sinkt der Agglutiningehalt rasch ab, worauf die vierte Phase des langsamen Absinkens folgt. Die Technik dieser Versuche ist einfach die,

daß in Zwischenräumen das Serum auf seinen Agglutiningehalt geprüft wird, wobei die Anordnung je nach dem Zweck so erfolgte, daß nur eine Injektion gemacht wurde oder mehrere in größeren oder kleineren Zwischenräumen. JÖRGENSEN und MADSEN verfolgten auch die Schwankungen im Agglutiningehalt nach täglichen Injektionen mit sehr kleinen Kulturmengen, wobei sich zeigte, daß ähnliche Verhältnisse wie auch unter anderen Versuchsbedingungen vorhanden sind, nur mit Verlängerung der ersten und zweiten Phase. Die dritte Phase tritt plötzlich auf und hält trotz weiterer Injektionen an. Die Autoren bedienten sich zur Austitrierung des Serums der Methode, daß sie mit einem Standardserum eine Endreaktion fixierten und durch Vergleich von Verdünnungen des zu prüfenden Serums mit dieser den Agglutinationswert bestimmten. Je nach Provenienz der agglutinabeln Substanz muß man stets eine Auswertung mit dem Standardserum vornehmen.

Bei einem bereits einmal immunisierten Tier oder nach einer überstandenen gleichen Krankheit beim Menschen (SHIGA, VERNEY) scheint die Produktion von Agglutinin eher und besser zu erfolgen, als bei einem nicht benutzten Tier. Zur Lösung dieser Frage injizierte RUFUS J. COLE einem Tier intravenös Typhusbazillen und ließ hierauf die Reaktion ablaufen. In einer zweiten Versuchsreihe wurde diejenige geringste Menge Agglutinogen ermittelt, welche nach Injektion bei einem ungebrauchten Tier keine Reaktion auslöst. Injiziert man nun diese Menge einem bereits vorher injizierten Tier, so erhält man eine prompte und starke Reaktion als Beweis dafür, daß ein bereits in Reaktion gewesener Organismus leichtere und erhöhte Reaktionsfähigkeit besitzt. (Vgl. auch die Untersuchungen von OBERMAYER und PICK).

Alkoholzufuhr hatte entweder keinen, öfter einen deutlich schädigenden, nur ganz ausnahmsweise fördernden Einfluß auf die Agglutininbildung. (MÜLLER, GERMUNDT, VIRGIN). GRAZIANI zeigte, daß Tiere bei 3° gehalten mehr Agglutinin produzierten als die bei 18° und 32° gehaltenen. Ebenso förderten kalte Bäder während der Immunisierung die Agglutininbildung. LEVADITI hat stärkere Agglutininbildung durch gleichzeitige Injektion von phosphorsaurem Natrium gesehen, WASSERMANN durch Injektion von Diphtheriebazillen in 0,1 Äthylendiamin.

ROTHBERGER studierte an Kaninchen den Einfluß von Blutverlusten auf die Agglutininproduktion. FRÄNKL und OTTO konstatierten bei einem Hunde, den sie mit Typhusbazillen fütterten, nach einer Blutung trotz weiterer Verfütterung eine starke Abnahme des Agglutinins, während LENZ bei einem Typhuskranken nach einer Darmblutung rasches Ansteigen des Serumtiters erhielt. Der Blutwechsel wurde von ROTHBERGER in folgender Weise vorgenommen. Immunisiertes Tier und Blutspender waren nebeneinander aufgebunden, von ersterem wurde die Ven. jugularis und die Art. carotis, von letzterem nur die Art. carotis frei präpariert. Diese wurde nun mit der Ven. jugularis durch ein U-förmiges mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gefülltes Rohr verbunden, wobei das Gefäß des Blutspenders abgeklemmt blieb. Nachdem nun aus der Art. carotis des immunisierten Tieres mittels Kanüle eine gewisse Blutmenge abgenommen war bis Erstickungskrämpfe auftraten (etwa 50—60 ccm für ein 1200 g schweres Tier) wurde die blutende Art. carotis abgeklemmt und nun durch Zufluß von Seiten des Blutspenders der Blutverlust gewöhnlich überkompensiert Unmittelbar nach dem Blutwechsel ist natürlich der Agglutinationstiter infolge der Verdünnung geringer. Im weiteren Verlauf konnte man einen Anstieg erwarten, wenn der Zwischenraum

zwischen letzter Injektion und Blutwechsel kürzer als 14 Tage war, doch ist dieser Anstieg nicht etwa auf eine fördernde Wirkung des Blutwechels oder Aderlasses zu beziehen, da auch bei den Kontrolltieren Rothbergers der Höhepunkt des Agglutinationswertes erst am 13.—14. Tage erreicht wurde.

Normal- und Immunagglutinine.

Die Normalagglutinine kommen sowohl beim Menschen als auch beim Tiere vor, doch agglutinieren verschiedene Tierspezies verschiedene Bakterien und diese auch in verschiedener Höhe. Auch Individuen derselben Spezies weisen Differenzen sowohl bezüglich der Art der durch sie agglutinabeln Bakterien als auch des Agglutinationstiters auf. Daß die Normalagglutinine erst im extrauterinen Leben erworben werden, geht daraus hervor, daß der normale Fötus keine besitzt.

Versuche von Bordet zeigten, daß, wenn auch in einem Serum Normalagglutinine für verschiedene Bakterien vorhanden sind, die Agglutination einer Spezifität in gewissem Sinne nicht entbehrt. Bringt man nämlich in ein Normalpferdeserum, das Cholera- und Typhusbazillen agglutiniert, Cholerabazillen ein und prüft dann die darüberstehende Flüssigkeit, so hat hat diese nur mehr Agglutinationskraft für Typhusbazillen. Ähnliches wies Malkoff für normale Hämagglutinine nach. Eisenberg und Volk, A. Rodet konnten durch Typhusbazillen das normale Typhusagglutinin absorbieren.

Über die Identität der Normal- und Immunagglutinine sind die Ansichten noch geteilt. Es würden nach der Vorstellung z. B. von Wassermann die Immunagglutinine im Sinne der Ehrlichschen Theorie nur vermehrt abgestoßene Rezeptoren sein. Scheller suchte durch folgende Experimente die Identität nachzuweisen. Das normale Pferdeagglutininserum verliert bei 60—62 ° seine agglutinierende Fähigkeit. Es wandelt sich das Agglutinin in Agglutinoid um. Bringt man nun mit Normalagglutinoiden besetzte Typhusbazillen mit einem Immunserum zusammen, das an und für sich Agglutinoide enthält, so tritt eine Verstärkung der Hemmungszone ein, ein Beweis, daß die verankernden Hauptgruppen der agglutinabeln Substanz für Normal- und Immunagglutinine identisch sind, woraus Scheller wieder auf eine Identität dieser beiden schließt.

Eisenberg konnte feststellen, daß durch Zugabe von Agglutinoiden die Agglutination durch Normalsera gehemmt wird. Doch weist er mit Recht darauf hin, daß alle diese Versuche nicht beweisend sind für die Identität der Immun- und Normalagglutinine, sondern nur für identische haptophore Gruppen sprechen. —

In gleichem Sinne sind die Versuche Fords aufzufassen. Während es Kraus und Eisenberg, Wassermann nicht gelungen war Bakterienantiagglutinine durch Immunisierung von Tieren zu erhalten, da ja der passende Rezeptor in den Bakterien gelegen ist, mußte dies bei Hämagglutininen gelingen: Da normales Kaninchenserum Hühnerblut bis $^1/_2$ agglutiniert, so wurden diese beiden Blutarten zum Versuche verwendet. Wurden nun Hühner mit normalem agglutinierenden Kaninchenserum behandelt, so erhielt man ein „normales Antiagglutinin“, bei Injektion von einem Kaninchenimmunserum für Hühnererythrocyten ein „künstliches Antiagglutinin“. Das normale Agglutinin wurde nun durch beide Antiagglutinine neutralisiert, woraus Ford den Schluß zieht, daß es sich nicht um einen qualitativen, sondern nur quantitativ neugebildeten Körper

handle, doch scheint auch dafür die oben erwähnte Fassung richtiger. Nach Versuchen von Hamburger und Dehne, Kraus und Pribram handelt es sich hier wohl nicht um Antiagglutinine, sondern um ein Mitfällen der Agglutinine durch Präcipitine. — Auch von anderen Antikörpern wird vielfach eine Identität der auf normale Weise und durch Immunisierung entstandenen angenommen.

Gegen die vollkommene Identität sprechen jedoch wieder gewisse Befunde. Zunächst scheint das Normalagglutinin gegen Erwärmung etwas mehr empfindlich zu sein als Immunagglutinine (Landsteiner und Reich), obzwar das kein charakteristischer Unterschied ist, da man neben thermolabilen Normalseris auch ziemlich resistente finden kann. Ebenso scheinen sich normale frische Agglutininsera leicht und rasch abzubauen und chemischen Einflüssen weniger Widerstand entgegenzusetzen. Bei Absorptionsversuchen konnten ebenfalls Differenzen zwischen beiden konstatiert werden, indem die Normalagglutinine von einer bestimmten Konzentration an stets nur eine Agglutinineinheit absorbierten. Während das Typhusimmunagglutinin im Pferdeserum an der Pseudoglobulinfraktion hängt (Pick), wird es im Normalserum mit der Euglobulinfraktion ausgefällt (Eisenberg, Landsteiner und Calvo).

In Fortsetzung von Versuchen über die Absorption von Eiweißkörpern konnten Landsteiner und Stankowič nachweisen, daß bei Zusammenbringen von hämagglutinierenden Normalseris mit proteinartigen Substanzen, z. B. Kasein durch die letzteren das Serumeiweiß kaum merklich adsorbiert wird, während der Agglutininverlust ein bedeutender war.

Wusch man diese mit Normalagglutinin beladenen Substanzen mehrmals mit kalter Kochsalzlösung und erwärmte sie hierauf mit Kochsalzlösung auf 45°, so konnte ein Teil des Agglutinins wieder gewonnen werden. Immunhämagglutinine ließen sich jedoch nicht adsorbieren. Die Autoren kommen zu dem Schlusse, daß mit zunehmender Spezifizität der Agglutinine die Adsorptionsfähigkeit durch proteinartige Substanzen abnimmt.

Durch Erwärmen agglutinierter roter Blutkörperchen mit Kochsalzlösung wird ein Teil des gebundenen Hämagglutinins wieder frei. Landsteiner und Reich konnten nun zeigen, daß die Dissociation bei Normalagglutininen stets eine stärkere ist als bei Immunagglutininen. Der Versuch wurde in der Weise angestellt, daß ein Immunserum durch Verdünnung ebenso viel Agglutinineinheiten enthielt wie ein Normalserum. Es wurden nun die beiden Sera auf die entsprechende Blutkörperchenverdünnung einwirken gelassen, wodurch von beiden gleichviel absorbiert wurde. Digerierte man nun die verklumpten Blutkörperchen durch eine Viertelstunde bei 45° mit einer 1%igen Kochsalzlösung, so wurden bei den vom Normalserum agglutinierten bedeutend mehr A.-E. frei als bei den durch Immunserum. Um dem Einwand zu begegnen, daß diese Differenz auf die durch die Verdünnung hervorgerufene Ungleichheit der Lösungen zurückzuführen wäre, verschafften sich die Autoren durch Abspaltung aus agglutinierten Bakterien verdünnte Agglutininlösungen, doch ergab sich auch bei dieser Versuchsanordnung keine Änderung im Resultat.

Verglich man die Stärke der Verklumpung durch Immun- und Normalagglutinine bei gleichem Verdünnungsgrad, so erwies sich diese bei ersteren stets als viel fester. Auch gelang die Verteilung der Klumpen durch Erwärmung bei scheinbar von vornherein gleichem Verklumpungsgrad bei Immunagglutinin schwerer.

Prüft man Normal- und Immunagglutinine auf ihre Absorptionsfähigkeit durch Eiweißkörper, so erweisen sich die ersteren als viel stärker absorbierbar als letztere. Zu diesem Zwecke bringt man mit NaCl-Lösung verdünntes inaktiviertes Serum mit 0,5 Kasein durch $^1/_2$ Stunde bei Zimmertemperatur zusammen, wobei mehrmals durchgeschüttelt wird und wertet dann auf 1 % Blutaufschwemmungen aus.

Ob diese Unterschiede hinreichen, um prinzipielle Unterschiede zwischen Normal- und Immunagglutininen anzunehmen, möchte ich nicht entscheiden. Wir haben ja an anderer Stelle gesehen, daß im Immunserum auch verschieden avide Körper vorhanden sind, welche Tatsache zur Erklärung dieser Befunde herangezogen werden kann. — Es könnten also dieselben Zellen in beiden Fällen die Agglutinine liefern, nur würden sie durch die Immunisierung in ganz bestimmter Weise alteriert werden (Landsteiner und Reich).

Zusammenhang zwischen Agglutinin und Immunkörper.

Während Gruber und Durham, Baumgarten infolge einer falschen Identifizierung des thermostabilen bakteriolytischen Ambozeptors mit den thermostabilen Agglutininen eine Identität dieser beiden annahmen, konnten schon die nächsten Untersuchungen, insbesondere von Pfeiffer und Kolle, deren Verschiedenheit nachweisen, eine Ansicht, der sich die meisten weiteren Forscher anschlossen, so Bordet, Metschnikoff, Ehrlich und Morgenroth usw. und wofür wir nur einige Argumente anführen wollen. So kann man durch Absorption mittels Choleravibrionen die Agglutinine aus einem Serum zum Verschwinden bringen, während der Pfeiffersche Versuch im Tierkörper mit diesem Serum noch gelingt. Im übrigen gibt Taubenserum mit Choleravibrionen Bakteriolyse ohne Agglutination. Auch konnte nachgewiesen werden, daß das Agglutinin für Cholera und Typhus nach einiger Zeit schwindet, während Bakteriolysine noch vorhanden sind.

Es ergeben sich, wenn auch oft ein gewisser Parallelismus zwischen Agglutinin und Ambozeptorenproduktion vorhanden ist, doch häufig auch Differenzen, sei es nun in der Zeit des Auftretens der beiden, sei es in der Menge der Produktion, sei es in der Art und der Schnelligkeit des Verschwindens, so daß Korte und Steinberg aus ihren Versuchen an Typhuskranken schließen, daß Agglutination und Bakterizidie zwei von einander unabhängige Vorgänge sind. Unter gewissen Umständen kann man auch nach Immunisierung die Verschiedenheit der beiden Substanzen leicht nachweisen. Gengou konstatierte je nach Immunisierung mit abgeschwächtem oder virulentem Milzbrand im ersten Fall hohe Agglutininwerte und kein bakteriolytisches Vermögen des Serums, mit letzterem gerade umgekehrte Verhältnisse. Ähnliches berichtet Kasten über seine Versuche mit bei 65° abgetöteten und lebenden Typhusbazillen. Dubois erhielt durch Injektion von auf 115° durch eine Viertelstunde erhitzten Hühnerblutkörperchen — dieselben waren vorher durch Waschung von ihrem Serum befreit worden — ein Serum, das bei vollständigem Mangel von Hämolyse deutliche agglutinierende Eigenschaften angenommen hatte. Weiter erzeugte Castellani durch Immunisierung mit Ruhrbazillen bei Schafen im Serum zwar Agglutinine, aber keinen Schutzwert. In anderen Fällen geht Immunisierungs- und Agglutinationswert nicht zu gleicher Zeit zugrunde, sondern der Agglutinationswert erlischt früher, wie auch Mertens berichtet. Es kommt auch vor, daß ein Serum für zwei Bakterienarten Agglutinine, nicht aber

Immunsubstanzen enthält. Die Differenzen bei Verfütterungsversuchen (Fränkl und Otto) konnten von Schwarz und Friedberger nicht bestätigt werden. Schütze bekam mit den Briegerschen Extrakten wohl Agglutinine, nicht aber bakterizide Substanzen. Neisser und Shiga wiesen nach, daß bei der Gewinnung freier Rezeptoren die Temperatur, bei der die Extraktion vorgenommen wird, eine Rolle spielt, je nachdem ob sie 60° oder 75° beträgt; in beiden Fällen erhält man nach Injektion etwa gleich hohe Agglutininwerte, in letzterem Falle jedoch zehnmal schwächere Bakterizidie, wodurch die Differenz zwischen den thermostabilen Agglutininen von den thermolabilen Lysinen gekennzeichnet ist.

Wenn bei Immunisierung mit Hogcholera wohl agglutinierendes, nicht aber bakterizides Serum entsteht, so könnte dies auch — ein Einwand, den Wassermann macht — auf Mangel an Komplement zurückgeführt werden. Einen weiteren Beweis für die Verschiedenheit beider erbringt er dadurch, daß er nach Ausfällung der präzipitablen (= agglutinablen) Substanz eines Pyocyaneusfiltrats durch Immunserum die obere Flüssigkeit prüft. Diese ist noch giftig und vermag im Tierkörper gleiche Immunwerte zu erzeugen wie ein unverändertes Pyozyaneusfiltrat, während der Agglutininwert zehnmal schwächer ist als bei Verwendung des letzteren.

Rolle der Salze bei der Ausflockung.

Die Wichtigkeit des dritten Faktors, des Salzes, das, wie wir einleitend bemerkt haben, für die augenfällige Agglutination notwendig ist, hat zuerst Bordet erkannt; auf Grund der Erkenntnis, daß Bakterien das Agglutinin ohne NaCl zwar binden, aber erst bei Zugabe von Kochsalz ausfallen, unterschied er als erste Phase die des „impressionement", während von ihm und Nolf die zweite Phase als rein physikalischer Vorgang angesehen wurde.

Joos bestätigte zunächst die Befunde Bordets. Man stellt sich salzfreie Bakterienaufschwemmung dadurch her, daß man die Bakterien mehrmals mit destilliertem Wasser wäscht; das ist jedoch zeitraubend, geht mit Verlust an Material einher, wobei zu bemerken wäre, daß mit Toluol oder Chloroform abgetötete Bakterien sich immerhin noch besser zentrifugieren lassen. Einfacher ist es, daß Salz durch Dialyse gegen destilliertes Wasser zu entfernen, wodurch die Bakterien in ihrer Vitalität absolut nicht geschädigt werden, auch kein Material verloren geht. Auf ähnliche Weise kann man salzfreies Serum bekommen, da die Agglutinine nicht dialysierbar sind; hat man jedoch ein hochwertiges Immunserum zur Verfügung, so genügt es, die Verdünnungen mit destilliertem Wasser statt mit NaCl-Lösung zu machen. Um nun das Experiment recht sinnfällig zu gestalten, wird die einfache agglutinierende Dosis salzfreien Serums — es geht natürlich auch mit einem Multiplum — mit den salzfreien Bakterien zusammengebracht. Als einfache agglutinierende Dosis bezeichnet Joos jene Serumverdünnung, welche hinreicht, in einer Bakterienemulsion (1 Agarkultur in 10 ccm Flüssigkeit aufgeschwemmt) grobe charakteristische Flocken in 20—30 Minuten zu erzeugen. In dieser Mischung nun tritt keine Agglutination auf, die aber sofort zutage tritt, wenn auch nur eine Spur Salz hinzukommt.

Trotz Ausbleiben der Ausflockung haben die Bazillen das Agglutinin gebunden, wofür auf folgende Art der Beweis geführt werden kann: Zentrifugiert man die Mischung oder noch besser filtriert man durch eine Chamberlainkerze, so wird durch Zugabe von frischen Bakterien und Salz zur oberen Flüssigkeit, resp. Filtrat keine Agglutination auftreten; schwemmt man dagegen die mit Agglutinin beladenen Bakterien in physiologischer Kochsalzlösung auf, so werden sie sofort ausgeflockt; auch unter dem Mikroskop kann man sehen, daß solche Bakterien sofort immobilisiert werden, sobald Salz zukommt.

In einem anderen Versuche konnte er zeigen, daß die Menge und auch die Schnelligkeit der Bildung des Niederschlags in einer gewissen Abhängigkeit von der Salzmenge steht. Gibt man zu einer salzfreien Agglutininbakterienverbindung steigende Dosen von NaCl, so sieht man ein Steigen der Niederschlagsmenge, bis bei einer gewissen Menge von Salz das Maximum des überhaupt möglichen Niederschlags erreicht ist. Hebt man von einer Probe mit unvollkommener Ausflockung die obere Flüssigkeit ab und gibt neues NaCl zu, so kann man neuerdings Niederschlagsbildung sehen. Diese kommt in den Röhrchen mit geringerer Kochsalzkonzentration langsamer zustande als in denen mit höherer.

Das Salz braucht absolut nicht in Lösung zugegeben zu werden, sondern es kann auch an den Bakterien hängen. Macht man sich eine dichte Bakterienaufschwemmung in einer wenig kochsalzhaltigen Flüssigkeit, zentrifugiert ab, tupft die überschüssige Flüssigkeit von den Wänden der Eprouvette mit Filtrierpapier ab, damit ja kein NaCl zurückbleibe, und gibt nun eine salzfreie Serumverdünnung zu, so tritt prompt Agglutination ein. — Die Serumverdünnung muß so gewählt sein, daß die Agglutination rasch eintritt, damit das an die Bakterien gebundene Salz nicht Zeit hat, in die Lösung überzugehen.

Joos nimmt im Gegensatz zu Bordet an, daß die Rolle des Salzes eine aktive ist, und daß das Salz eine chemische Verbindung eingeht. Er schließt das Letztere unter anderem daraus, daß die Salzmenge eine so geringe ist, daß man an eine chemische Reaktion denken müsse. Auch will er gefunden haben, daß das Salz in sehr geringer Menge zugegeben, nach Zentrifugieren der Bakterien in der oberen Flüssigkeit mittels $AgNO_3$ nicht nachzuweisen ist, wohl aber an den Bakterien.

Friedberger bestätigt die Angaben von Joos bezüglich der Notwendigkeit des Salzzusatzes zur Hervorrufung der Ausflockung und erweitert die Befunde dahin, daß für das Kochsalz auch andere anorganische Salze und auch organische Substanzen, z. B. Traubenzucker eintreten können, deren Wirkung jedoch nicht gleich stark ist, was Eisenberg und Volk auch gefunden haben. Der Annahme von Joos, daß das Salz in eine chemische Verbindung bei der Agglutination eintrete, kann sich Friedberger nicht anschließen, auch bestätigt er nicht die Befunde vom Verschwinden des Kochsalzes in der oberen Flüssigkeit nach Eintritt der Agglutination.

In weiteren Arbeiten will Joos beweisen, daß es sich doch um eine chemische Verbindung handle. Er zeigt zunächst, daß zur Agglutination einer bestimmten Menge der agglutinierbaren Substanz stets bestimmte Mengen von Agglutinin und Salz gehören, ob man diese nun auf einmal oder in Verdünnungen hintereinander zugibt, was dem Gesetze der konstanten Proportionen entspricht. Untersuchungen von Porges ergaben, daß zur Ausflockung um so weniger Salz erforderlich ist, je höher

die zugegebene Serumkonzentration ist. Die Zusammensetzung des Niederschlags ist aber verschieden, je nach dem Verhältnis zwischen agglutinierender und agglutinierbarer Substanz. Die Minimalverbindung, d. h. diejenige, welche im Molekül das Minimum agglutinierender Substanz enthält, ist in Wasser rasch zersetzlich. Die Maximalverbindung, d. h. diejenige, bei der die agglutinierbare Substanz das Maximum von agglutinierender Substanz gebunden hat, ist sehr stabil. Gibt man zu verschiedenen Mengen Bakterienaufschwemmung verschiedene große Mengen Agglutinin, läßt die Bakterien ausfallen, zentrifugiert, dekantiert hierauf die obere Flüssigkeit und wäscht zweimal nacheinander die Bakterien in destiliertem Wasser, schwemmt sie dann in diesem auf und läßt sie bei 37° stehen, so wird in den Gläsern mit großen Serumüberschüssen Reagglutination eintreten, welche in den mit geringeren Serumkonzentrationen ausbleibt. Das hierzu nötige Salz findet sich im Niederschlag, ist also an diesen gebunden gewesen. Daraus, daß sich die Reaktion rascher in höheren Konzentrationen vollzieht, daß die Wärme einen deutlich beschleunigenden Einfluß hat, Faktoren, die in derselben Weise auch in der reinen Chemie wirken, zieht Joos weitere Beweisgründe für die chemische Natur des Vorganges.

Viele Salze der Alkali- und Erdalkalimetalle, sofern sie nicht schon allein Niederschlagsbildung hervorrufen, können die Rolle des Kochsalzes übernehmen. Die chemisch aktiven Salze, Hydrooxyde (NaOH, KOH) und Karbonate verhindern die Ausfällung, doch sollen die Substanzen nicht zerstört werden, da nach Neutralisierung durch eine Säure Agglutination auftritt. Unter den Haloidsalzen ist insofern ein Unterschied zu konstatieren, als die Chloride rascher als die Bromide und Jodide wirken. Die Wirkung der Salze scheint auf ihrem Säureradikal zu beruhen. Unter den gleichen Salzen verschiedener Metalle läßt sich in der Wirkung kaum ein Unterschied konstatieren. Dagegen merkt man sofort Differenzen in der Schnelligkeit des Auftretens und im Aussehen des Niederschlags bei Zusatz von Salzen derselben Base mit verschiedenem Säureradikal.

Eisenberg und Volk befaßten sich mit der Frage nach dem Einfluß hoher Konzentrationen von Neutralsalzen auf die Agglutination, da Hemmung durch solche für die Alexin- und Fermentwirkung schon bekannt war. Friedberger berichtet über eine Verlangsamung der Agglutination bei hohen Kochsalzkonzentrationen. Um unter einander vergleichbare Resultate zu bekommen, wurden von den verschiedenen Salzen äquimolekulare Lösungen hergestellt. Von vornherein sind von diesen Untersuchungen solche Salze ausgeschlossen, welche die Serumglobuline und damit die Agglutinine aus der Serumverdünnung ausfällen oder aber in der Bakterienaufschwemmung einen Niederschlag erzeugen; es sind daher solche Versuche und Kontrollen stets notwendig.

Es ergab sich, daß verschiedene Salze ($CaCl_2$, $BaCl_2$, $MgCl_2$, K_2SO_4, NH_4NO_3 u. a.) in verschiedenem Maße den Agglutinationstiter des Serums herabsetzen, wobei die für jedes Salz differenten Kurven der Hemmungswirkung oft Ähnlichkeit mit den Kurven Paulis haben, welche dieser für die Erhöhung des Gerinnungspunktes der Globuline durch das betreffende Salz gewonnen hat.

Der Erklärungsversuch, daß die Verbindung Agglutinin + agglutinierbarer Substanz durch die Gegenwart hoher Salzkonzentrationen eine lösliche bleibe, während durch Erniedrigung des Salzgehalts sie unlöslich werde, erwies sich durch folgenden Versuch als nicht stichhaltig. Gibt man zu einer dichten Bakterienaufschwemmung eine hohe Serum-

konzentration und $MgCl_2$ bis zur Sättigung, läßt die Substanzen 24 Stunden auf einander einwirken, so tritt keine Agglutination ein. Verdünnt man nun das Ganze so weit, daß die $MgCl_2$-Gehalt unterhalb der Hemmungszone sich befindet, so tritt trotzdem keine Agglutination ein, was der Fall sein müßte, wenn die Anwesenheit des hohen Salzgehalts die Lösungsverhältnisse geändert hätte. Man kann den Versuch auch noch so modifizieren, daß man nach 24stündiger Einwirkung der drei Substanzen zentrifugiert, die obere Flüssigkeit abpipettiert und nun die Bakterien in destilliertem Wasser aufschwemmt. Auch so ist das Resultat ein negatives.

Man mußte demnach daran denken, daß die Salze eine Veränderung im Agglutinin oder in der agglutinierbaren Substanz hervorrufen, da die durch sie hervorgerufene Zustandsänderung irreversibel ist. Es zeigte sich in der Tat, daß durch Einwirkung von Salzen auf Agglutinin ein Teil des letzteren in Agglutinoide umgewandelt wird, ganz ähnlich wie durch Erwärmung, Erhitzung, Säure, Harnstoff usw. Dementsprechend ändern sich natürlich auch die Absorptionsverhältnisse, indem der Absorptionskoeffizient bei solchen Seris geringer ist, andererseits kann man bei Anwendung hoher Serumkonzentrationen eine Hemmungszone erscheinen sehen.

Andererseits wird auch das Agglutinogen durch höhere Konzentrationen gewisser Salze beeinflußt. Schwemmt man ein Agarröhrchen in 1 ccm $CaCl_2$-Lösung auf, läßt dies 2 Stunden bei 37° stehen und verdünnt nun mit destilliertem Wasser auf 15 ccm, so erhält man dadurch die Aufschwemmung, mit der Eisenberg und Volk gewöhnlich arbeiteten. Denn kommen nun zu 2 Teilen dieser Aufschwemmung 2 Teile der entsprechenden Serumverdünnung, so entsteht daraus die einfache Aufschwemmung und die Konzentration des $CaCl_2$ sinkt auf 0,92 %, also eine Konzentration, die sonst nicht hemmend wirkt. Solche Bakterien erweisen sich trotzdem inagglutinabel, vermögen jedoch Agglutinin im selben Maße zu absorbieren wie normale Bakterien. Eisenberg und Volk schließen daraus, daß gewisse Salze in hohen Konzentrationen die agglutinierbare Substanz so zu verändern imstande sind, daß die fällbare Gruppe verloren geht, während die bindende erhalten bleibt. Ähnliche Resultate ergaben auch noch andere Salze, während $(NH_4)_2SO_4$, 2 N $MgCl_2$ usw. auf die Bakterien ohne Einfluß blieben.

Kochsalzlösung veränderte selbst in 18 %iger Lösung weder das Agglutinin noch die agglutinierbare Substanz, die dadurch hervorgerufene Hemmung war daher auch reversibel. Die Wirkung hoher Salzkonzentrationen kann also eine verschiedene sein: entweder sie verändert das Agglutinin oder die agglutinierbare Substanz oder sie wirken als solche ohne Veränderung dieser Faktoren hemmend auf die Ausflockung oder schließlich kann auch eine Kombination dieser Wirkungen vorhanden sein.

Auch viele organische Stoffe haben eine agglutinationshemmende Wirkung, deren Ursache je nach dem Stoffe verschieden ist. — Läßt man Konzentrationen zweier anorganischen Salze, die jede für sich keine Hemmung geben, einwirken, so kann man durch Summierung eine solche erzielen.

Porges befaßte sich mit der Frage, ob Aussalzung von Eiweißkörpern und die Fällung von agglutininbeladenen Bakterien in eine Parallele zu setzen sind und mußte sie dahin entscheiden, daß man es mit zwei im Wesen verschiedenen Prozessen zu tun habe. Zu diesem

Resultat kommt er dadurch, daß er äquimolekulare Lösungen von Salzen bezüglich ihres Ausflockungsvermögens für agglutininbeladene Bakterien prüfte. Für diesen Vorgang ist, wie NEISSER und FRIEDEMANN, BECHHOLD nachgewiesen haben, die Wertigkeit des Kations von Bedeutung. Das Mg hat nun ein bis 10 mal stärkeres Ausflockungsvermögen für Agglutininbakterien als K, Na, NH_4 bei gleichem Anion, während die Aussalzung normaler Bakterien mit Magnesiumchlorid z. B. trotz großer Löslichkeit nicht gelingt.

Im Gegensatz hierzu verhalten sich spontan agglutinierende Bakterien wie Kolloide und Suspensionen von geringer Stabilität; sie werden von Magnesiumsalzen noch in 25 mal stärkerer Verdünnung gefällt als von anderen Salzen mit gleichem Anion. Es fehlt ihnen eben der Eiweißkörper, welcher normale Bakterien in Suspension erhält.

Das Präzipitat.

Man versteht darunter den Niederschlag, der sich bei der Agglutination bildet und aus Bakterien + Agglutinin + Salz zusammengesetzt ist. — Daß diese drei Substanzen darin vorhanden sind, geht ja aus dem vorher gesagten hervor. —

Der Niederschlag löst sich bei Zugabe auch nur minimaler Mengen von Säure auf und die desagglutinierten Bakterien fallen weder von selbst noch auch auf Zusatz von frischem agglutinierenden Serum aus, so daß man an eine Zerstörung der agglutinablen Substanz denken muß. Ebenso gelingt es durch Laugen, konzentrierte Salzlösungen, Formol, gesättigte Harnstofflösung Desagglutination herbeizuführen. — Erwärmt man agglutinierte Bakterien durch $^1/_2$ Stunde auf 70—75 °, so löst sich der Niederschlag auf, doch fallen die Bakterien nach 24 Stunden wieder aus; wird die Erhitzung auf 80—100 ° getrieben, so können solche desagglutinierte Bakterien selbst bei Zusatz von frischem Agglutinin nicht mehr zur Ausflockung gebracht werden (EISENBERG und VOLK).

JOOS hält das durch Agglutination entstandene Präzipitat für einen neuen, durch chemische Bindung der in Aktion tretenden Substanzen entstandenen Körper. — Für seine Meinung führt er folgenden Versuch an: Frische, agglutinierte Bakterien werden zentrifugiert, die obere Flüssigkeit abgegossen, Reste derselben mit Filtrierpapier aufgesaugt, der Bodensatz hierauf in 10 ccm destilliertem Wasser aufgeschwemmt. Erwärmt man diese Bakterien nun auf 60 °, so tritt keine Reagglutination ein, auch wenn man NaCl zugibt. Da nun das Agglutinin durch diese Temperatur gar nicht, das Agglutinogen nur sehr wenig, das Präzipitat aber in eingreifendster Weise verändert wird, so meint er einen neuen Körper mit besonderen Eigenschaften gegenüber physikalischen Einflüssen annehmen zu müssen. — In der Flüssigkeit konnte kein freies Agglutinin nachgewiesen werden, die auf 60 ° erhitzten Bakterien aus einem Präzipitat werden nicht reagglutiniert, auch wenn sie einen Überschuß von agglutinierender Substanz enthalten. —

Diese Versuche stehen in einem gewissen Widerspruche zu den unmittelbar vorher mitgeteilten bezüglich der Höhe der Temperatur, welche zur Desagglutination notwendig ist. Vielleicht hatte JOOS einen empfindlicheren Typhusstamm. WEIL gibt als beste Temperatur für Desagglutinationsversuche mit Typhusbazillen 80 ° an und bezieht dieses Phänomen auf eine Schädigung der agglutinablen Substanz, wodurch für das Agglutinin der Angriffspunkt verloren geht. Versuche nach getrennter

Erwärmung der beiden Substanzen überzeugten ihn davon. Bei Choleravibrionen verhält sich die Sache anders, indem hierbei das Serum bei 80° zerstört wird, während die agglutinierbare Substanz sehr resistent ist. Staphylokokken können auch durch Temperaturen von 100° nicht desagglutiniert werden, obwohl nur die agglutinierbare Substanz hitzebeständig ist. —

Mit der Reversibilität des Prozesses beschäftigten sich zuerst Hahn und Trommsdorff. Sie gaben zu agglutinierten Bakterien nachdem sie dieselben vom überschüssigen Serum sorgfältig befreit hatten Normalnatronlauge oder Normalsäure in der Verdünnung 1:100, ließen diese Flüssigkeiten eine Stunde bei 37° einwirken. Hierauf wurde zentrifugiert und die oberen Flüssigkeiten zeigten ein geringgradiges Agglutinationsvermögen zum Zeichen, daß Agglutinin freigeworden war. Diese Agglutination erwies sich als spezifisch. Durch Digerieren agglutinierter Bakterien mit physiologischer Kochsalzlösung wurde kein freies Agglutinin erhalten.

Landsteiner führte seine Versuche zunächst mit stark agglutinierten Blutkörperchen aus. Ließ er diese durch einige Zeit bei Zimmertemperatur stehen, so konnte schon dabei in der oberen Flüssigkeit Agglutinin in geringer Menge nachgewiesen werden. Wurde die Temperatur hierbei erhöht, so ging mehr Agglutinin in die Kochsalzlösung über. Er faßt daher den Vorgang, bei dem die Agglutininverbindung zerlegt wird als eine Reaktion mit negativer Wärmetönung auf. Auf diese Weise konnte er „gereinigte Agglutinine" erhalten.

Ballner und Sagasser konnten die Resultate von Landsteiner und Jagič, die angaben, daß es ihnen gelungen sei auch aus agglutinierten Bakterien einen Teil des Agglutinins frei zu bekommen, nicht bestätigen, ebensowenig wie die Angaben von Hahn und Trommsdorff. Wenn man nämlich nach mehrmaliger Waschung der Bakterien die Waschwässer auf ihren Agglutiningehalt genau untersucht, so findet man, daß diese mit zunehmender Anzahl immer weniger Agglutinin enthalten, welches nur mechanisch an den Bakterienleibern haftet. Digeriert man erst dann mit Kochsalz- oder Normalnatron- oder Säurelösung bei höherer Temperatur, bis das letzte Waschwasser keinen Agglutiningehalt mehr aufweist, so läßt sich in der oberen Flüssigkeit kein Agglutinin mehr nachweisen.

Im Gegensatz hierzu konnten Landsteiner und Reich in Versuchen, die unter allen Kautelen ausgeführt waren und deren Technik im Prinzip der oben angeführten entspricht, erweisen, daß die Verbindung Hämagglutinin—rothe Blutkörperchen, wenn auch nicht vollständig, so doch zu einem großen Teil reversibel ist, wobei die Temperatur insofern eine Rolle spielt, als die Spaltung der Verbindung durch höhere Temperaturen begünstigt wird. Auch die Verbindung des Agglutinins mit Bakterien gibt bei erhöhter Temperatur Agglutinin ab, jedoch in sehr geringer Menge. Dieselbe ist weniger reversibel als die der roten Blutkörperchen mit Agglutinin. Wenn demnach die Umkehrung des Prozesses durch diese Versuche erwiesen erscheint, so ist dieselbe doch vielfach eine recht unvollkommene.

Die Versuche von Rehns und Nicolle und Trénel, welche dahin zielten zu erweisen, ob die Injektion eines Gemisches von Agglutininagglutinierbarer Substanz im Tierkörper noch Agglutinin erzeugen könnte, sind deshalb nicht einwandfrei, weil die Autoren vorher nicht untersucht hatten, ob die Bakterien mit Agglutinin auch wirklich vollständig abge-

sättigt waren. Daher konnte das bei diesen Versuchen im Tierkörper entstandene Agglutinin ebensogut durch nicht abgesättigte agglutinogene Substanz erzeugt sein, wie auch durch Spaltung der Verbindung im Tierkörper. Dasselbe gilt von den Befunden von NEISSER und LUBOWSKI, SACHS. Versuche, die mit Berücksichtigung dieser Fehlerquelle ausgeführt wurden, ergaben, daß das Gemisch im Tierkörper nicht mehr agglutinogen wirke (v. DUNGERN). Ein Unterschied zwischen Antikörper bindenden und bildenden Körper bei Typhusstämmen ist wohl entgegen von FRIEDBERGER und MORESCHI nicht notwendigerweise anzunehmen.

EISENBERG hat den Einfluß der Zeit auf die Reversibilität des Prozesses studiert, indem er verschieden lange Zeit nach Einwirkung von Agglutinin auf agglutinierbare Substanz die Sprengung der Verbindung versuchte, wobei er finden konnte, daß die Verbindung umso-weniger reversibel ist, je länger die beiden Körper aufeinander gewirkt haben. Es erfährt demnach die Verbindung mit der Zeit eine immer größere Festigung, stets bleibt jedoch die Reversibilität eine unvollkommene. Die Beobachtung, daß normales Pferdeserum, welches durch Säure abgeschwächt war, nach Neutralisierung reaktiviert wurde, gab zu weiteren Untersuchungen in dieser Richtung Anlaß. Auch die Typhusimmunagglutinine sind nach Ansäuerung zum Teil reversibel, doch scheint dies schon nach Einwirkung der Säure durch 10 Minuten trotz exaktester Neutralisierung nicht mehr möglich zu sein. Auch nach Einwirkung von schwachen Konzentrationen von Lauge sind ähnliche Verhältnisse bezüglich der Reversibilität zu erzielen, doch ist die Zunahme des Wirkungswertes des Serums schon bei Neutralisation nach 15 Minuten nur eine schwache, während sie bei späterer Neutralisierung vollständig ausbleibt. Die Auffassung von DREYER und JEX-BLAKE als ob das Wiederauftreten des Agglutinins nach Ansäuerung auf Wirkung von freier Säure zu beziehen wäre, ist aus dem Grunde nicht stichhaltig, als sie nach Neutralisierung ja auch besteht.

Die Bindung von Agglutinin und agglutinierbarer Substanz.

Schon Gruber machte in seiner ersten Publikation auf den Verbrauch des Agglutinins durch die Bakterien aufmerksam. In späteren Arbeiten konnte BORDET für die normalen Bakterienagglutinine, NOLF für die Hämagglutinine durch spezifische Bindung und Absorption den Beweis für die Spezifizität der Agglutinine im normalen Serum erbringen. JOOS hat auf Grund der spezifischen Bindung seine sehr interessanten Versuche über den Mechanismus der Agglutination und die Rolle der Salze bei derselben durchgeführt, BAIL glaubte mit Hilfe des Bindungsversuches zeigen zu können, daß die Inagglutinabilität seiner „Exsudatbakterien" infolge mangelnder Bindung des Agglutinins durch dieselben zustande komme. Systematische Untersuchungen über die quantitativen Bindungsverhältnisse der Immun- und Normalagglutination brachten in Anlehnung an die Methodik EHRLICHS erst die Arbeiten von EISENBEG, VOLK und WASSERMANN.

Der Bindungsversuch wird nach EISENBERG und VOLK folgendermaßen angestellt. Als „einfache Aufschwemmung" wird eine solche bezeichnet, bei der ein Agarröhrchen Typhuskultur in 30 ccm Flüssigkeit aufgenommen wird. Da jedoch zu der Aufschwemmung die gleiche

Menge Serumverdünnung zugegeben wird, so mußte sie doppelt so dicht gemacht werden, d. h. es wurde ein Agarröhrchen Typhuskultur in 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Damit der Fehler möglichst klein werde, wurden annähernd gleich große Agarflächen genommen und mehrere Röhrchen in der entsprechenden Flüssigkeitsmenge aufgeschwemmt, so daß auch dadurch eine gewisse Ausgleichung des Fehlers möglich wurde. Als Agglutinineinheit wurde jene geringste Menge aktiver Serumsubstanz bezeichnet, welche gerade hinreichte, um 1 ccm der einfachen Aufschwemmung innerhalb 24 Stunden zur unvollkommenen Agglutination, d. h. Bildung eines deutlichen Bodensatzes mit leichtgetrübter darüberstehender Flüssigkeit zu bringen.

Um nun die Absorptionsverhältnisse bei gleichen Mengen Agglutinogens (= agglutinierbarer Substanz) und wechselnden Mengen Agglutinins zu erforschen, wurden in einer Versuchsreihe steigende Dosen Agglutinin zu einer konstanten Menge Agglutininogen zugesetzt, 2 Stunden bei 37° und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Klärung, eventuell unter Zuhilfenahme der Zentrifuge wurde die obere Flüssigkeit abpipettiert und auf ihren Agglutiningehalt geprüft. Aus der Differenz der zugegebenen und der restlichen Agglutininmenge ergab sich die absolute Menge des absorbierten Agglutinins, während die Autoren unter Absorptionskoeffizienten den relativen Grad der Absorption verstehen, d. h. das Verhältnis der absorbierten zur zugegebenen Agglutininmenge.

Die nachstehende Tabelle zeigt das Resultat eines solchen Absorptionsversuches.

Tabelle 3 (aus der Arbeit von Eisenberg und Volk).

Absorptionsverhältnisse des „Zoroaster"-Serums III. Aggl.-W. = 45.000 Aggl.-Einh.

Serum-Verdünnung	Agglutinin-Einheiten	Absol. Absorption	Absorpt.-Koeffizient
1 : 20.000	2	2	20/20
1 : 2.000	22	22	20/20
1 : 1.000	45	45	20/20
1 : 600	75	75	20/20
1 : 500	90	89	ca. 20/20
1 : 200	225	210	19/20
1 : 100	450	400	18/20
1 : 20	2.250	1.650	15/20
1 : 4	11.250	6.750	12/20
1 : 2	22.500	12.500	11/20
1 : 1	45.000	22.500	10/20

Bei Prüfung anderer Sera, z. B. eines Typhusziegen-, eines Typhuskaninchenserums, eines Cholerapferdeserums ergaben sich etwas abweichende Absorptionsverhältnisse, doch konnte aus all den Versuchen das allgemeine Gesetz deduziert werden, daß mit zunehmender Konzentration die absolute Absorption durch Bakterien steigt, während der Absorptionskoeffizient sinkt. Daß Bakterien mehr Agglutinin absorbieren als zu ihrer Agglutination notwendig ist, hat auch Joos erkannt, und er suchte diese Erscheinung als Ausdruck chemischer Verbindung in proportionalen Verhältnissen zu deuten.

Die Absorptionsverhältnisse von Seris, die normalerweise Agglutinin enthalten, zeigten verschiedene Typen, so folgten zwei, Choleravibrionen agglutinierende normale Sera ähnlichen Gesetzen wie Immun-

sera, während in einer Reihe von normalen Typhusseris stets nur eine Agglutinineinheit trotz erhöhter Serumkonzentration absorbiert wurde.

Eine andere Versuchsreihe sollte darüber Aufklärung geben, welchen Einfluß die Bakterienmenge für die Absorption hatte. Gruber, Winterberg, Förster u. a. hatten die Tatsache konstatiert, daß ein Serum einen um so höheren Titer zeigt, je dünner die zur Reaktion verwendete Bakterienaufschwemmung ist, d. h. weniger Bakterien brauchen zu ihrer Agglutination weniger Agglutinin. Es wurden also mit dichteren und dünneren Bakterienaufschwemmungen Absorptionsversuche angestellt. Es zeigte sich dabei, daß die doppelt so dichte Aufschwemmung nicht doppelt so viel Agglutinin absorbiert als die einfache, sondern die Absorption nimmt nur um soviel zu, als der relativen Verdünnung des Agglutinins entspricht.

Wenn man z. B. eine viermal so dichte Aufschwemmung nimmt, so entspricht die Absorption einer Verdünnung dieses Serums auf 1:4 bei einfacher Aufschwemmung. Entsprechend verhält es sich bei Zugabe dünnerer Aufschwemmungen.

Aus diesen Versuchen erhellt, daß der Einfluß der Bakterienmenge auf die Höhe der Absorption ein verhältnismäßig geringer ist. Wollte man bei einem halbwegs stärkeren Immunserum eine vollständige Erschöpfung desselben erzielen, so müßte man der Berechnung zufolge Bakterienmengen zugeben, welche die Durchführung des Experiments unmöglich machen. Dagegen schien ein anderer Weg eher zum Ziele zu führen, nämlich der der sukzessiven Absorption durch immer neu zugegebene Typhusbazillen. Der Versuch wurde so gemacht, daß man in einer hohen Serumkonzentration Bakterien aufschwemmte, nach 24stündiger Einwirkung die obere Flüssigkeit abhob, in diese wieder frische Bakterien einbrachte und abermals nach 24 Stunden, eventuell durch Zentrifugieren die Bakterien von der Flüssigkeit trennte. Nach mehrmaliger Wiederholung dieser Manipulation gelang es tatsächlich, ein hochwertiges Typhusimmunserum vollständig seines Agglutinins zu berauben.

Ganz ähnliche Resultate erhielt Wassermann bei im wesentlichen ähnlicher Versuchstechnik mit Pyocyaneusimmunserum.

Versuche, die Karwacki und Benni mit Tuberkelbazillen ausführten, ergaben, daß die Bindungsverhältnisse hierbei denselben Gesetzen wie die der anderen geprüften Bazillen folgen, nur ist das Bindungsbestreben bei Tuberkelbazillen bedeutend geringer als bei Typhus und Cholera.

Der Einfluß der Temperatur und der Zeit, bei der die Bindung erfolgt, ist nach Eisenberg und Volk, sowie nach den Befunden anderer Forscher, so Buxton und Vaughan, Wassermann, R. Pfeiffer, nicht von ausschlaggebender Bedeutung. Nach neueren Arbeiten von Meinicke, Jaffé und Flemming ist wenigstens für Cholera die Dauer der Bindung von Einfluß, allerdings scheint nach einer Stunde bei 37° das Maximum bereits erreicht zu sein.

Das Hemmungsphänomen.

Wir haben bei Besprechung des Bindungsversuches gesehen, daß die Bakterien imstande sind, bedeutend mehr Agglutinin aufzunehmen, als zu ihrer Agglutination notwendig ist. Unter gewissen Umständen können die Absorptionsverhältnisse eines Serums durch Bakterien ganz andere werden als sie beim normalen Serum waren, und dies führt uns zur Besprechung der Modifikationen von Immunseris.

Eisenberg und Volk konnten zuerst beobachten, daß mit und ohne verschiedene konservierende Zusätze aufbewahrtes Typhusserum an Agglutinationskraft verliert. Gleichzeitig tritt eine Hemmungszone in hohen Konzentrationen auf, d. h. der Agglutinationswert eines Serums von 50000 Einheiten sinkt nach längerem Stehen z. B. auf 35000 Einheiten, gleichzeitig sieht man, daß die Konzentration 1:10, 1:50 dieses modifizierten Serums keine Agglutination gibt, 1:100 u.v. A. und erst bei 1:500 v. A. auftritt. Dies nur ein Beispiel. In ähnlicher Weise kann ein Serum bei Entwicklung von Fäulnisbakterien, Schimmelpilzen usw. in demselben verändert werden, ohne daß man den Effekt dieser Einwirkungen genau vorhersagen kann.

Die nächste Erklärung für dieses eigentümliche Phänomen mußte in einer hemmenden Substanz im Serum gesucht werden, die an der agglutinierbaren Substanz ihren Angriffspunkt findet. Im Anschluß an die Toxoidlehre Ehrlichs war die Annahme erlaubt, daß es sich hierbei um ein stärker avides Agglutinin als das unveränderte handle, das der fällenden Gruppe verlustig gegangen ist, bei dem aber die bindende erhalten geblieben war, also um ein Agglutinoid. War diese Annahme richtig, so mußte die Hemmung nicht allein von der Menge modifizierten Agglutinins, sondern auch von der Menge der agglutinierbaren Substanz abhängig sein. Folgender Versuch spricht dafür: Ser.-Verd. 1:100 eines modifizierten Serums gibt bei einfacher Aufschwemmung keine Agglutination nach 24 Stunden, also Hemmung, bei vierfacher Aufschwemmung tritt unvollkommene Agglutination bereits nach 2 Stunden ein. 1:400 desselben Serums gibt bei einfacher Aufschwemmung keine Hemmung mehr, also vollkommene Agglutination nach 24 Stunden. Nimmt man $^1/_6$ fache Aufschwemmung, so tritt auch nach 24 Stunden keine Agglutination ein.

Die hemmende Substanz reicht demnach nur für eine bestimmte Bakterienmenge aus. Die Breite der Hemmungszone eines Serums hängt daher nicht bloß von der Menge des in ihm enthaltenen Agglutinoids ab, sondern auch von der Dichte der Bakterienaufschwemmung. Je dichter die letztere desto geringer die Breite der Hemmungszone und umgekehrt, Tatsachen, die durch einen einfachen Versuch zu bestätigen sind. In den Serumverdünnungen, bei denen die Reaktion dann vollkommen erfolgt, ist die Menge von hemmender Substanz so gering, daß sich ihr Einfluß nicht mehr geltend machen kann.

Solche modifizierte Sera entstehen aber nicht allein durch spontanen Abbau, sondern auch bei vorsichtigem Zusatz verschiedener Salze, Säuren, Alkali, Formol u. a. ebenso durch Erhitzung auf 60°, 65° und 70° eine Stunde lang, wobei die Hemmung mit zunehmender Temperatur stärker wird. Gleichzeitig nehmen alle diese Sera in ihrem Agglutinationswert ab, was von Eisenberg und Volk wieder als Beweis für die Umwandlung des Agglutinins in das Agglutinoid angesehen wurde (s. v. Eisler, Über Bakterienpräzipitine).

Der Bindungsversuch mit einem durch eine Stunde auf 65° erhitzten Typhuspferdeimmunserum zeigte, daß vollständige Absorption bis zu denselben Verdünnungen eintrat wie beim unveränderten Serum, d. h. das Agglutinoid hat infolge seiner höheren Affinität einen Teil der agglutinierbaren Substanz besetzt, das aktive Agglutinin daher vom Verbrauch ausgeschlossen, so daß es dann in der oberen Flüssigkeit nachgewiesen werden konnte. Läßt man inaktiviertes Agglutininserum auf Bakterien einwirken und gibt hierauf unverändertes Agglutinin zu, so werden die

Bakterien zwar nicht agglutiniert, wohl aber sind sie noch imstande, wenn auch in beschränktem Maße Agglutinin zu absorbieren. Warum die Agglutination in diesem Falle ausbleibt obwohl aktives Agglutinin aufgenommen wurde, konnte nicht erklärt werden. Mischung von inaktiviertem und aktivem Serum gab niemals vollkommene Hemmung sondern nur unvollkommene Reaktion in den höheren Konzentrationen.

Aus all diesen Tatsachen ziehen, wie schon früher erwähnt, Eisenberg und Volk den Schluß, daß man am Agglutinin zwei Gruppen unterscheiden müsse, die fällende labilere (agglutinophore) und die bindende stabilere (haptophore) Gruppe. Ob das Agglutinin als ein Rezeptor zweiter Ordnung (Ehrlich) oder dritter Ordnung (Bail) aufzufassen ist, lassen die Autoren unentschieden. Nimmt man mit Eisenberg einen etappenweisen Abbau des Serums an, so fällt auch der Einwand von Dreyer und Jex-Blake gegen die Proagglutinoidtheorie, daß Abnahme des Serumwertes und Größe der Hemmungszone einander nicht entsprechen; denn während neue Proagglutinoide entstehen, können andere schon zugrunde gehen und dadurch die Hemmung nicht zunehmen. —

Diese Befunde wurden bald darauf auch von Wassermann erhoben. Er nennt entsprechend der Ehrlichschen Nomenklatur ein Agglutinoid, das höhere Affinität hat als das Agglutinin Proagglutinoid, während ein solches mit gleicher Affinität als Synagglutinoid zu bezeichnen wäre. Dieses wird niemals vollständige Hemmung geben, wohl aber unvollkommene Reaktionen, ja die Agglutinationskurve eines so beschaffenen Choleraserums zeigte bei verschiedenen Auswertungen verschiedenes Aussehen, was Wassermann so erklärt, daß bald mehr bald weniger Synagglutinoid gebunden wurde und dementsprechend eine geringere oder größere Menge Agglutinin zur Absorption kam. Ein solches Serum kann selbstverständlich nicht zur Bakteriendiagnostik verwendet werden.

Als prinzipiell wichtigstes Ergebnis dieser Untersuchungen muß die Erkenntnis angesehen werden, daß das wesentlichste beim Agglutinationsvorgang die Bindung ist, während die Fällung als physikalischer Vorgang für minder wichtig gehalten werden muß. Wassermann betont daher, daß man bei einer Spezifizitätsprüfung in zweifelhaften Fällen den Absorptions- und nicht den Fällungsversuch machen müsse.

Ähnliche Hemmungszonen konnten auch bei anderen Immunseris konstatiert werden und zwar verändern sich verschiedene Sera verschieden leicht, so von Shiga für das Dysenterieserum, von Schwoner für das Diphtherieagglutininserum u. a. m.; auch bei der Mitagglutination wurden sie zuweilen beobachtet (Eisenberg). Ob auch in frischen Immunseris Hemmungszonen, die Volk und de Waele, Lipstein, de Blasi u. a. fanden auf Agglutinoidwirkung zurückzuführen sind, ist noch nicht ganz sicher. Falta und Noeggerath meinen, daß es sich vielleicht um Abbauprodukte von thermolabilen Agglutininen im Körper handle, nachdem sie andere Erklärungsversuche, besonders auch den von Volk und de Waele, daß diese Hemmung vielleicht etwas mit der Bakteriolyse zu tun habe, zurückgewiesen haben. Diese Hemmung verschwindet nach halbstündiger Erwärmung auf 58—60°; es müßte sich demnach um äußerst thermolabile Agglutininanteile handeln, welche bei dieser Temperatur schon zugrunde gehen. Gegen Paltaufs Ansicht, daß es sich um Vorstufen des Agglutinins handle, wäre einzuwenden, daß man solche Hemmungen häufig nicht zu Anfang der Agglutininbildung, sondern zu Ende derselben sieht. Scheller, sowie Eisenberg fanden auch bei frischem agglutinierenden Normalserum für Typhus, Heubazillen u. a.

eine Hemmungszone. Interessant doch unaufgeklärt ist ein Befund Schellers, der auch von Glaessner und Eisenberg bestätigt wird, daß mitunter Immunsera nach mehrtägigem Stehen einen höheren Agglutinationstiter aufweisen. Von Bedeutung ist jedenfalls die Hemmungszone frischer Sera bei Anstellung der Gruber-Widalschen Probe, da ja bei hohen Konzentrationen diese noch in den Bereich der Hemmungszone fallen könnten, eine Möglichkeit, auf die schon Volk und de Waele hingewiesen haben, deren Eintreffen von Falta-Noeggerath bei ihrer Arbeit tatsächlich beobachtet nnd näher studiert wurde.

Versuche von Eisenberg und Volk, durch Zusammenwirken von hemmenden und unveränderten Immunseris Hemmungszonen zu bekommen, ergaben, wie erwähnt, nur insofern ein positives Resultat, als die Reaktionen in hohen Konzentrationen unvollkommen blieben, dagegen konnten sie nie ein vollkommenes Ausbleiben derselben bei Typhusseris erzielen. Dies gelang Shiga mit Dysenterieserum. Eisenberg konnte dies dadurch erklären, daß eben das Dysenterieserum viel leichter abgebaut wird und damit mehr Agglutinoide entstehen, während Typhusserum durch niedrigere Temperaturen gar nicht verändert, durch höhere vollständig zerstört wird; bei mittleren Temperaturen ist die Ausbeute an Agglutinoiden eine verhältnismäßig geringe. Dies ändert sich sofort, wenn man ein Pferdeimmunserum, das durch längere Zeit unter Chloroform- oder $^1/_2\,^0/_0$ Karbolzusatz aufbewahrt war, nur auf 62—63^0 erhitzt, ebenso wenn man das resistentere Typhus-Kaninchenimmunserum auf 75^0 erwärmt; es treten dann deutliche Hemmungszonen auf, wenn man inaktiviertes und aktives Serum nacheinander auf die Bazillen einwirken läßt.

Von ausschlaggebender Bedeutung für die Größe der Hemmung bei Mischung von inaktiviertem und aktivem Serum sind die quantitativen Verhältnisse der beteiligten Körper, die Art und Dauer der Einwirkung. Es ist klar, daß die Hemmung zustande kommen kann, wenn inaktiviertes Serum vor oder zugleich mit aktivem Serum einwirkt, sie erscheint aber auch noch, wenn man zuerst aktives Serum zugibt und bei Beginn der Ausflockungserscheinung erst inaktiviertes, nur sind dann viel höhere Konzentrationen von letzterem notwendig. Dies läßt sich nur durch die Reversibilität des Agglutinationsprozesses erklären, wofür auch noch andere Beweise vorliegen. Vom Einflusse der Zeit kann man sich in der Weise überzeugen, daß man zu einer Reihe von Reagenzröhrchen gleiche Mengen inaktiviertes Serum zugibt und nach verschieden langer Einwirkung desselben Serumverdünnungen eines aktiven Serums. Man sieht dann, daß die Hemmungszone um so größer ist, je größer der Zeitraum zwischen Zugabe von inaktivem und aktivem Serum.

Untersucht man die Hemmungszone eines und desselben Serums mit verschiedenen Stämmen, so kann man große Differenzen bekommen, selbst wenn die Stämme aus einem Kranken zur selben Zeit, jedoch aus verschiedenen Substraten gezüchtet sind. Die Annahme von Differenzen im Rezeptorenapparat zur Erklärung dieser Tatsache (Scheller, Lipschütz, Falta und Noeggerath) scheint mir plausibler als die Eisenbergs, der eine Erklärung hierfür in der Bindung durch verschieden große Mengen freier Rezeptoren finden will; das Letztere müßte sich übrigens direkt nachweisen lassen.

Bindungsgesetz und Spezifizität der Agglutination.

Wir haben weiter oben jene Versuche mitgeteilt, welche zur Aufstellung des Bindungsgesetzes zwischen Agglutinin und agglutinierbarer Substanz durch EISENBERG und VOLK und WASSERMANN geführt haben. In seiner Allgemeinheit heißt es, daß, wie auch JOOS gefunden hat, die Bakterien mit zunehmender Agglutininmenge absolut immer mehr Agglutinin binden, relativ jedoch die gebundene Agglutininmenge immer geringer wird. Andererseits spielt auch die Bakterienmenge eine Rolle, indem eine dünnere Aufschwemmung weniger bindet, jedoch nur soviel weniger, als der relativen Verdünnung des Agglutinins entspricht. Die Bakterien können sich demnach mit Agglutinin überladen, d. h. sie können mehr Agglutinin absorbieren, als zu ihrer Agglutination notwendig ist.

Wir haben ferner gesehen, daß von gewissen Seris nur eine A. E. absorbiert wird, wir haben auch die scheinbaren Abweichungen von diesem Agglutinationsgesetze bei Anwendung modifizierter Sera besprochen, Ergebnisse, die zur Annahme von Agglutinoiden führten.

Weitere Schlüsse hat aus den Absorptionsreihen von EISENBERG und VOLK ARRHENIUS gezogen, indem er für die Menge des aufgenommenen und freien Agglutinins die Gleichung aufstellte

$$\frac{(\text{Menge des gebundenen Agglutinins})^2}{(\text{Menge des freien Agglutinins})^3} = \text{R. (Konstante)}$$

Die Klammern bedeuten die Konzentration der entsprechenden Stoffe. Es würde sich nach Ansicht von ARRHENIUS bei der Agglutininabsorption um einen Verteilungsvorgang handeln. Das Agglutinin würde sich sowohl in der Suspensionsflüssigkeit als auch in den Bakterien lösen, doch in verschiedener Menge, wobei es in den Bakterien auch zu einer chemischen Verbindung zwischen Bakterien und Agglutinin kommen könnte. — Der Agglutinationsvorgang würde als ein spezieller Fall des GULDBERG-WAAGEschen Gleichgewichtsgesetzes aufzufassen sein. — Ich gehe auf das Für und Wider der Ansicht von ARRHENIUS hier nicht weiter ein und verweise auf die diesbezüglichen Arbeiten von NERNST, LANDSTEINER, NEISSER, FRIEDEMANN, BILTZ u. a.

Auf eine Arbeit jedoch muß ich näher eingehen, nämlich auf die von M. NEISSER, da er die Versuchstechnik EISENBERG-VOLKS und die aus ihr durch ARRHENIUS gezogenen Schlüsse angreift. Die Einwürfe wurden zum Teil schon von EISENBERG beleuchtet. Wenn NEISSER meint, daß es nicht angehe, diese Versuche mit lebenden Bakterien zu machen, da diese bei 24stündiger Beobachtung sich vermehren und zwar verschieden je nach der Konzentration des zugegebenen Serums, so ist dies wohl berechtigt, aber man mußte zunächst, da wir ja die Stoffe nicht rein in Händen haben, die Versuchsbedingungen möglichst so wählen, daß an den Substanzen nichts geändert werde. Im übrigen findet er ausdrücklich erwähnt, daß auch mit abgetöteten Bakterien, sofern nur die agglutinable Substanz durch das Abtötungsmittel keine Veränderung erfährt, die Resultate dieselben sind. Ebenso hinfällig ist der Vorwurf, daß das Absorptionsgesetz aus einem Absorptionsversuch abgeleitet wurde, ein Vorwurf, der deshalb erhoben wurde, weil nur wenige Absorptionstabellen, natürlich als Paradigma gedacht, publiziert worden sind. Es wäre dem Leser wohl zu viel geworden, wenn die Autoren alle Protokolle einer monatelangen Arbeit wiedergegeben hätten.

Auch den Einwand Neissers, daß die Versuchstechnik von Eisenberg und Volk verlangt, man solle zwischen 1 und 1,1 Agglutinineinheit unterscheiden können, ist insofern nicht stichhaltig, als es sich nur darum handelt, einen bestimmten Grad von Agglutination (u. v. A.) von dem nächstniedrigen (Sp. A.) zu unterscheiden, was wohl bei einiger Übung möglich ist. Im übrigen sind alle Deduktionen, wie nochmals hervorgehoben werden soll, nicht aus einem, sondern aus einer ganzen Reihe von Versuchen nach vollständig unvoreingenommener Kritik der Zahlen gemacht.

Und noch eines Einwandes möchte ich gedenken. Neisser meint, daß es nicht angehe, die in der oberen Flüssigkeit zurückgebliebenen A. E. zu berechnen, da er gesehen hat, daß eine Serumverdünnung, z. B. 1 : 100, auch wenn er sie ohne Bakterienzusatz durch 2 Stunden einer Temperatur von 37 ° ausgesetzt hat, nicht den berechneten sondern einen niedrigeren A.-W. hatte. Eisenberg und Volk hatten sich durch Versuche überzeugt, daß unter diesen Bedingungen berechneter und austitrierter Agglutinationswert für ihre Sera recht gut übereinstimmten. Die Differenzen könnten vielleicht darauf zurückzuführen sein, daß Neisser mit einem außerordentlich labilen Agglutinin zu tun gehabt hat. Dies nur insoweit, als die Technik der Versuche von Eisenberg und Volk angegriffen worden ist, die ja übrigens in ähnlicher Weise und mit gleichen Resultaten auch von Wassermann und vielen anderen geübt wurde. Ob die Exaktheit der Versuche ausreichend ist für die Schlüsse, die Arrhenius gezogen hat, wollen wir dahingestellt sein lassen.

Sollte die Agglutination zu diagnostischen Zwecken, sei es für die Krankheits- oder aber Bakteriendiagnose, verwendet werden, so mußte als erstes und wichtigstes Erfordernis die Spezifizität der Reaktion postuliert werden. Nun haben schon Gruber und Durham darauf hingewiesen, daß ein Immunserum nicht allein den zur Immunisierung verwendeten Stamm beeinflusse, sondern auch einzelne ihm nahestehende Bakterienarten. Absolut sicher sei es, wenn der zur Prüfung verwendete Stamm durch das Serum nicht beeinflußt werde. Diese letzte Anschauung ist, wie wir schon gesehen haben, sicher unrichtig, da es ja z. B. inagglutinable Typhusstämme gibt.

Pfeiffer und Vagedes kamen auf Grund ihrer Untersuchungen bald darauf zum Schlusse, daß die Agglutinationsprobe auf Choleravibrionen mit einem hochwertigen Immunserum ausgeführt, absolut zuverlässige Resultate gebe, sofern nur die quantitativen Verhältnisse berücksichtigt werden. Bei Besprechung der Frage nach der Spezifizität muß man zwei Dinge von einander unterscheiden: die Spezifizität des durch Immunisierung von Tieren künstlich hergestellten Serums und des im Verlauf oder nach Überstehen einer Krankheit entstandenen Agglutinationswertes des Serums vom Menschen. In den Kreis unserer Betrachtungen soll hauptsächlich die erste Frage gezogen werden, nicht allein wegen des theoretischen Interesses, sondern auch deshalb, weil auf Grund der Beantwortung dieser Frage in einem folgenden Kapitel die Serodiagnostik der wichtigsten Bakterien besprochen werden soll.

Pfaundler faßte die Erscheinung, daß nahe verwandte Bakterien durch ein spezifisches Immunserum mitagglutiniert werden, als den Ausdruck einer Gruppenreaktion auf. Diese Ansicht, die sich hauptsächlich auf die Mitagglutination durch ein Typhusimmunserum stützte, mußte sofort eine Berichtigung erfahren, als sich gewisse Tatsachen mit ihr nicht in Einklang bringen ließen. Wenn es sich um eine wirkliche Gruppen-

reaktion handelte, so müßte man doch annehmen, daß stets die nächstverwandten Bakterien die Reaktion geben. Nun wissen wir, daß z. B. ein Koliserum oft gerade nur den zur Immunisierung verwandten Kolistamm agglutiniert, nicht aber andere Kolistämme. Ebenso steht es mit einem Choleraserum, welches oft ihm nahestehende Vibrionen kaum oder gar nicht zur Ausflockung bringt (Kolle und Gottschlich).

Aus diesen Gründen war es nur berechtigt, daß man nach anderen Erklärungen suchte und Durham hat in Analogie mit der von Ehrlich und Morgenroth gegebenen Theorie für die Bakteriohämolysine eine solche für die Agglutinine aufgestellt. Denken wir uns die agglutinogene Substanz des Bakteriums zusammengesetzt aus einer Menge von Einzelagglutinogenen, so werden im Typhusbazillus die Einzelagglutinogene a, b, c, d sein, im Bacterium coli die Einzelagglutinogene b, c, d, e. Wird nun ein Tier mit Typhusbazillen immunisiert, so wird entsprechend den Einzelaggglutinogenen eine Reihe von Einzelagglutininen entstehen, deren Summe dann den Agglutinationswert des Immunserums gibt. Also A+B+C+D. Wenn das Koliagglutinogen einen Teil seiner Partialagglutinogene mit dem Typhus gemeinsam hat (b, c, d), so wird der betreffende Kolibazillus durch die Partialagglutinine B+C+D mitagglutiniert werden.

Im Immunserum haben wir demnach nach Wassermann ein Hauptagglutinin zu unterscheiden, welches die spezifische Reaktion für das betreffende Bakterium gibt, da es noch in den höchsten Verdünnungen auf das zur Immunisierung verwendete Bakterium wirkt. Die Partialagglutinine werden auf jene Bakterien wirken, deren Partialagglutinogene auf sie passen. Daraus erhellt schon, daß die Mitagglutination für verschiedene Bakterien verschieden hoch sein kann. Die Höhe von Haupt- und Nebenagglutininen steht in keinem bestimmten Verhältnis zu einander (Lipschütz).

Von welcher Bedeutung die Zustandsänderung des Bakterienprotoplasmas für die Agglutinationsbreite eines Serums ist (Paltauf), geht aus den Versuchen Passinis hervor. Dieser konnte durch Injektion von Bacillus putrificus Bienstock bei Kaninchen ein ziemlich hochwertiges Immunserum erhalten, zu dessen Prüfung sich am besten ältere Kulturen auf koaguliertem Rinderblutserum erwiesen. Dieses Serum zeigte Mitagglutination auch für andere anaërob wachsende Kulturen, so auch für den Gasphlegmonebazillus, doch nur für dessen sporulierende bewegliche Form, die bekanntlich auf koaguliertem Blutserum gedeiht, während die asporogene unbewegliche Varietät auf stark zuckerhaltigem Nährboden wächst. Mit der Änderung im morphologischen Verhalten geht auch eine solche im Stoffwechsel dieses Bazillus vor sich. Die sporogene bewegliche Form des Gasphlegmonebazillus kommt dem Bacillus putrificus Bienstock nicht nur in diesen Eigenschaften näher, sondern wird durch ein spezifisches Putrifikusserum auch mitagglutiniert, während die asporogenene Form unbeeinflußt bleibt. Daß nicht die hierbei entstehende Säure die Agglutination hindert, beweist einerseits der Versuch, daß Serumverdünnungen, welche mit einer solchen pukallisierten sauren Bouillon hergestellt worden waren, zwar auf die Putrifikus- und sporulierenden Gasphlegmoneserumstämme wirkten, nicht aber auf den unbeweglichen Gasphlegmonestamm. Bei Mischung der beiden Varietäten von Gasphlegmonebazillen wurden durch ein solches Serum nur die sporulierenden agglutiniert. Dagegen erhält man durch Injektion von Gasphlegmonezuckerbouillonkulturen ein Serum, das zwar

beide Arten der Gasphlegmone spezifisch beeinflußt, nicht aber den Bacillus putrificus. Es erhellt daraus, von welch ausschlaggebender Wichtigkeit für die Höhe der Mitagglutination eines Bakteriums die Art der Züchtung und die mit dieser zusammenhängende Änderung der Eigenschaft ist. Denn es zeigte sich, daß der Wert des Mitagglutinins dem Titer für den Putrifikusstamm sehr nahe kam.

Für die Konstitution des Agglutinins kommt aber nicht allein die Zusammensetzung der zur Immunisierung verwendeten agglutinierbaren Substanz, sondern auch der zur Reaktion verwendete Tierkörper in Betracht. Wassermann, Pfeiffer, Lubowsky und Steinberg erbrachten für diese auf der Ehrlichschen Theorie fußenden Anschauung den Beweis. Immunisiert man nämlich verschiedene Tierarten mit ein und demselben Koli-, Cholera- oder Staphylokokkenstamm, so erhält man Agglutinine von ganz verschiedener Konstitution, indem z. B. das Serum eines Tieres, welches den zur Immunisierung verwendeten Kolistamm A bis zu einer bestimmten Höhe agglutiniert, für einen anderen Kolistamm B noch Mitagglutinine aufweist. Dagegen zeigt das Serum einer anderen Tierart mit gleichem Hauptagglutinintiter für A absolut kein Nebenagglutinin für B. Bei Verwendung von Choleravibrionen zur Immunisierung findet man die verschiedensten Agglutininwerte je nach der Tierart. Prüft man dieses Serum nun mit mehreren Stämmen, so ergeben sich Differenzen im Titer, so zwar, daß in einem Falle das Hühnerserum den höchsten Wert aufweist, während Hunde- und Kaninchenserum weit zurückbleiben, bei Verwendung eines anderen Stammes, z. B. das Hundeserum die höchsten Werte gibt. Ja selbst in der gleichen Tierart gibt es individuelle Schwankungen in der Agglutininbeschaffenheit. Prüft man nämlich verschiedene Pferdetyphusimmunsera auf ihre Nebenagglutinine, so kann man, wie Lipschütz gezeigt hat, unter Umständen sehr verschiedene Werte erhalten. Genauere Untersuchungen über das Verhalten der Nebenagglutinine stehen übrigens noch aus. Jedenfalls ist die Kenntnis derselben von ganz besonderer Bedeutung für die Krankheitsdiagnose, indem ja natürlich bei nicht typhösen Erkrankungen auch Mitagglutinine für Typhusbazillen auftreten können, wodurch ein positiver Ausfall der Gruber-Widalschen Reaktion vorgetäuscht werden kann. Im Verlaufe der weiteren Besprechungen wird auf diese Verhältnisse wohl noch Rücksicht genommen werden müssen.

Noch einer anderen Möglichkeit müssen wir gedenken. Es ist dies das Auftreten zweier oder mehrerer selbständiger Agglutinine in einem Serum. Experimentell hat sich mit dieser Frage, deren Bedeutung ja schon vorher am Krankenbette erkannt worden war, insbesondere Castellani befaßt, indem er Kaninchen an zwei verschiedenen Stellen des Körpers mit differenten Mikroorganismen immunisierte. Er konnte hierbei konstatieren, daß das Serum in der weitaus überwiegenden Anzahl von Fällen für jede der beiden Arten jenen Titer annimmt, als ob das Tier nur mit der betreffenden Art immunisiert wäre.

Um nun zu entscheiden, ob es sich um eine Mischinfektion handle, oder aber um Nebenagglutinine, wird ein Absorptionsversuch gemacht. (Castellanischer Versuch.) Handelt es sich um eine Mischinfektion, so wird aus dem Serum durch die Absorption mit dem homologen Stamm nur das eine Agglutinin entfernt, während das Agglutinin für die andere Bakterienart in seinem Werte vollständig erhalten bleibt. Anders verhält es sich, wenn Nebenagglutinine die Ursache der Wirkung auf eine andere Bakterienart sind, diese werden nämlich durch Absorption des

Hauptagglutinins entweder vollständig verschwinden, oder aber bedeutende Einbuße erleiden (Castellani, Jürgens, Korte, Totsuka). H. Kayser erhielt nach Injektion von Mischkulturen (d. s. solche, in denen Typhusbazillen und Staphylokokken zugleich gewachsen sind) nur ein Agglutinin für Typhusbazillen, nicht für Staphylokokken. Ein gleiches Resultat erzielte er, wenn er die beiden Arten abgetötet, einem Tiere injizierte, wobei der Agglutinationstiter für Typhus weit hinter dem der Kontrolltiere zurückblieb. — Wurden Staphylokokken und Typhusbazillen lebend Tieren einverleibt, so war bei zweien in den ersten Tagen kein Agglutinin nachzuweisen, bei zwei anderen am 9. Tage nach der Injektion mäßige Werte. — Es kann demnach bei Mischinfektion mit Staphylokokken die Gruber-Widalsche Reaktion negativ ausfallen.

Selbstverständlich können Mitagglutinine mitunter hohe Werte erreichen. Entsprechend den oben ausgeführten Anschauungen über die Mitagglutination, wird natürlich die Absorption des Nebenagglutinins kaum einen oder zumindest einen bedeutend geringeren Einfluß auf den Titer des Hauptagglutinins hochwertiger Immunsera ausüben, als die des Hauptagglutinins.

Bei weiterem Eindringen in diese scheinbar so klaren Verhältnisse fand man aber, daß es auch noch heterologe Nebenagglutinine gibt, d. h. solche, welche durch Absorption des Hauptagglutinins in ihrem Werte nicht oder nur sehr wenig beeinflußt werden (Posselt und Sagasser, Hetsh und Lentz, Posner und Zupnik). Unter Umständen kommt es sogar vor, daß nach Absättigung des Hauptagglutinins der Wert für das Nebenagglutinin steigt. Glücklicherweise bleiben aber die Nebenagglutinine in hochwertigen Immunseris bezüglich ihres Titers noch genügend weit hinter den Hauptagglutininen zurück, so daß man die Spezifizität des Immunserums noch immer zur Bakteriendiagnose benützen kann. — Von besonderer Bedeutung dürfte in dieser Hinsicht auch die Wahl der zur Immunisierung verwendeten Tierart sein, da nicht jede gleich viel Nebenagglutinine gibt. — Daneben ist es notwendig, die Beschaffenheit und Eigentümlichkeit der agglutinogenen Substanz jeder Bakterienart zu kennen, da dieselbe sich gegenüber ein und demselben Serum mitunter innerhalb weniger Tage verändert zeigt (Totsuka).

Hat man alle diese Verhältnisse genau beachtet, so würde sich die Bakteriendiagnostik mittels Agglutination ungefähr folgendermaßen in ihren Grundlinien skizzieren lassen: Stets verwende man ein möglichst hochwertiges Immunserum und prüfe auf die Endverdünnungen. — Unter Umständen — bei unagglutinabeln Bakterienspezies — wird man auch die Absorptionsmethode zu Hilfe nehmen oder nach dem Vorschlage von Porges vorher die inagglutinablen Bakterien erhitzen. — Werden andereBakterienarten auch beeinflußt, so kann man, wenn nach Absorption des Hauptagglutinins auch die anderen Agglutinine beeinflußt werden, sicher sagen, daß es sich um Nebenagglutinine handle. Ist dies jedoch nicht der Fall, so könnten im Krankenserum entweder Spezialagglutinine (Mischinfektion) oder heterologe Nebenagglutinine vorhanden sein; im hochwertigen Immunserum werden die letzteren im Titer jedenfalls gegenüber dem Agglutinationswert des homologen Stammes bedeutend zurücktreten. — Ist dies jedoch nicht der Fall, dann soll ein solches Serum zur Bakteriendiagnostik nicht verwendet werden.

Versuche über Mechanismus und Wesen der Agglutination. (Theorie der Agglutination.)

Es gehört wohl nicht in den Rahmen dieses Handbuches über die Theorien der Agglutination zu sprechen, diese Frage hat im Handbuch von Kolle und Wassermann durch Paltauf eine gründliche Erörterung gefunden. Wir möchten nur hervorheben, daß die älteren Theorien von Gruber, Nicolle, Dineur u. a. zum Teil von den Autoren selbst verlassen sind oder aber gegenüber der Paltaufschen Theorie an Beweismaterial weit zurückstehen. Diese hat zudem auch noch das für sich, daß sie mit der Erkenntnis der Kolloidnatur der reagierenden Körper und den bei den kolloidalen Fällungen gemachten Erfahrungen gut in Einklang zu bringen ist.

Sie stützt sich bekanntlich auf die durch Kraus entdeckte Präzipitation von Bakterienfiltraten durch Immunserum. Natürlich ist dieser Vorgang nicht so zu verstehen, als ob es sich um ein mechanisches Mitgerissenwerden der Bakterien durch das ausfallende Präzipitat handle, da ja sonst die Spezifizität der Reaktion nicht zu erklären wäre. Es müßten in einem Gemisch zweier Bakterienarten, z. B. von Typhus und Cholera, nach Zugabe von Typhusimmunagglutinin, wenn die Bakterien rein mechanisch mitgerissen würden, beide Arten ausfallen, was jedoch nicht eintritt, da die Choleravibrionen suspendiert bleiben. Es müssen demnach, wie Paltauf hervorhebt, feinste Veränderungen am oder im Bakterienleib sein, welche zur Ausflockung durch das Immunserum führen. Diese Veränderungen sind uns zur Zeit noch nicht in ihren Details bekannt, doch können wir hoffen, daß mit den Fortschritten der Kolloidchemie auch in diese Vorgänge mehr Klarheit kommen werde. Inwieweit die von Löwit um agglutinierte Bakterien färberisch dargestellten Niederschläge für die Theorie zu verwerten sind, wage ich nicht zu entscheiden. Rodet bestreitet übrigens ihre Existenz, während Löwit daran festhält. Ich verweise nochmals auf den Abschnitt: „Die Theorien über die Agglutination" im Handbuch von Kolle und Wassermann.

Soll die Theorie Paltaufs überhaupt akzeptabel sein, so mußte der Zusammenhang zwischen Agglutinin und Präzipitin studiert werden, und die Technik dieser Untersuchungen ist es, die uns beschäftigen soll. Auf den ersten Blick mußte ja ein gewaltiger Unterschied zwischen diesen beiden Reaktionen auffallen. Während nämlich ein agglutinierendes Serum noch in ganz hohen Verdünnungen seine Wirkung entfaltet, entsteht ein Niederschlag mit Bakterienfiltraten nur in unverhältnismäßig höheren Konzentrationen. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, daß die Ausfällung der viel größeren Bakterien eben schon durch geringere Mengen Agglutinin sichtbar wird als der der unendlich feinen Partikelchen der gelösten agglutinabeln Substanz.

Aber auch noch andere Momente würden dafür sprechen, daß Präzipitine und Agglutinine in ihrem Verhalten nicht vollständig identisch sind. So ist beim Pferdeimmunserum das Typhusagglutinin in der Pseudoglobulinfraktion, das Präzipitin am Euglobulin nachzuweisen. Es gelingt auch durch Dialyse die beiden Körper zu trennen, weil durch die Salzentziehung das Euglobulin (i. e. Präzipitin) ausfällt, während das Pseudoglobulin in Lösung bleibt. Es wird daher die obere Flüssigkeit mit Bakterienfiltrat versetzt keinen Niederschlag geben, während nach

Auflösung des Globulinniederschlages in 1 % NaCl-Lösung und Zusatz von präzipitabler Substanz dies der Fall ist. — Frisches Pferdeimmunserum durch $^1/_2$—$^3/_4$ Stunde auf 58—60° erhitzt zeigt keine Einbuße an Typhusagglutinin, dagegen sind die Koaguline (Pick) durch Niederschlagbildung nicht mehr nachzuweisen, ebenso sind die Koaguline gegen Fäulnis bedeutend empfindlicher als die Agglutinine.

Radziewsky, Bail, Beljaeff suchten durch Absorptionsversuche in dieses Gebiet Licht zu bringen. — Die Technik dieser Versuche ist im allgemeinen die, daß man präzipitable Substanz und Präzipitin aufeinander einwirken läßt und nach Absetzen des Präzipitats die obere Flüssigkeit auf ihren Agglutiningehalt prüft. Dabei zeigte sich nun nach den Arbeiten dieser Autoren kein Verlust an Agglutinin, trotzdem das Serum vorher zur Präzipitation verwendet worden war.

Bei Nachprüfung und Erweiterung dieser Untersuchungen durch Kraus und v. Pirquet ergab sich, daß man die quantitativen Verhältnisse ganz besonders beachten müsse. Es kommt auf das Verhältnis zwischen Filtrat und Serum an. — Gibt man zu gleichen Mengen Filtrat steigende Mengen Serum (A. E. 30000), so läßt sich erkennen, daß in den höheren Konzentrationen $^1/_{25}$, $^1/_{50}$ trotz dem reichlicheren Bodensatz sehr viel restliches Agglutinin nachgewiesen werden konnte, während nach Einwirkung von Serum auf Filtrat im Verhältnis $^1/_{100}$, $^1/_{200}$ der Agglutininverlust ein sehr großer war, selbstverständlich muß bei der Auswertung die durch Zugabe des Filtrats erhaltene Verdünnung berücksichtigt werden. — Es war dadurch erwiesen, daß in den Bouillonfiltraten eine Agglutinin bindende Substanz nachweisbar ist, deren Identität mit der in den Bakterien vorhandenen wohl angenommen werden kann; sie entzieht sich dem Nachweise, wenn nicht bestimmte Verhältnisse zwischen Präzipitin und präzipitierbarer Substanz eingehalten werden.

Auch die Versuche von Brieger und Mayer würden gegen die Identität der beiden Substanzen sprechen. Diese Autoren berichten, daß nach Injektion des Briegerschen Präparates wohl sehr hohe Agglutininwerte im Serum auftraten, dasselbe aber keine präzipitierende Kraft hatte. Ihr Präparat wurde in der Weise hergestellt, daß sie 3—4tägige Typhuskulturen zunächst durch 8—10 Wochen der Einwirkung von schwach alkalischem Ammonsulfat bei 37° aussetzten, wobei die Bakterien abstarben und mazeriert wurden. Hierauf wurden die Bakterien durch ein gehärtetes Filter vom Salz abfiltriert, die Bakterien in 20—30 ccm durch Sodalösung eben alkalisiertes destilliertes Wasser aufgenommen, durch 2—3 Stunden im Schüttelapparat geschüttelt und bis zur vollkommenen Autolyse im Brutschrank stehen gelassen. Nach mehrmaligem Zentrifugieren zwecks Absetzung der noch vorhandenen Bakterientrümmer wird durch Chloroformdämpfe sterilisiert. Das Präparat erwies sich als ungiftig für Meerschweinchen, das damit gewonnene Serum enthielt keine bakteriziden Substanzen.

Brieger und Mayer meinen, daß das Ausbleiben der Präzipitation darin seine Erklärung findet, daß, wie Wassermann zeigte, zu dieser viel größere Mengen präzipitierender Substanz notwendig wären als zur Agglutination. Ein vollständiges Ausbleiben kann aber bei den hohen Agglutininwerten kaum darin seinen Grund haben. Kraus und Joachim haben in der Tat nachgewiesen, daß ein durch Brieger-Mayersche Extrakte gewonnenes Serum wohl präzipitierend wirkt, wenn frische Bouillon- oder Kochsalzextrakte als präzipitable Substanz verwendet werden. Die Brieger-Mayerschen Präparate, auf die allein die Autoren das

Serum einwirken ließen, werden zwar nicht gefällt, weil ihnen offenbar die fällbare Gruppe verloren gegangen ist, wirken aber noch agglutinogen und präzipitinogen, da hierzu nur die erhaltene bindende, Gruppe notwendig ist.

Es gelingt aber durch Bindung und Ausfällung der präzipitablen Substanz mittels Immunserum in vitro ihre agglutinogene Kraft bedeutend herabzusetzen, wie dies Wassermann dadurch gezeigt hat, daß er Pyozyaneusfiltrat und Immunserum zunächst aufeinander einwirken ließ und dann die obere Flüssigkeit zur Immunisierung eines Kaninchens verwendete, während ein anderes mit unverändertem Filtrat injiziert wurde, wobei letzteres ein 10mal stärker agglutinierendes Serum lieferte. Er konnte übrigens auch nachweisen, daß Pyozyaneusimmunserum nach Einwirkung auf Pyozyaneusfiltrat eine bedeutende Abnahme seines Agglutinationstiters zeigte. Ja Asakawa erzielte sogar vollständige Absättigung.

In analogen Versuchsanordnungen wie beim Agglutinin wiesen Kraus und v. Pirquet nach, daß auch das Präzipitin aus einer bindenden thermostabilen und einer fällenden labilen Gruppe bestehen dürfte, welch letztere sie nach Müller als Präzipitoid bezeichnen. Die präzipitierende Komponente im Serum ist thermolabiler als die agglutinierende, da sie schon bei 60° zugrunde geht. Dies erklärt die Möglichkeit, daß ein Serum auf 60° erhitzt wohl nicht mehr imstande ist Niederschläge in Filtraten zu erzeugen, wohl aber noch Bakterien auszufällen. Da in einem solchen Serum wohl aber noch durch Bakterien und Filtrate Abnahmen im Titer zu erzielen sind, meint Kraus annehmen zu können, daß das Immunserum eine gemeinsame bindende Gruppe für beide hat, während die fällenden verschieden wären, woraus die nahe Verwandtschaft zwischen Agglutinin und Präzipitin wenigstens in bezug auf Bindung folgt.

Technik der Serodiagnostik der Bakterien.

Bacillus typhi und paratyphi.

Es sollen hier nur jene Bakterien besprochen werden, welche bezüglich Technik und Methodik der Agglutionationsprobe gewisse Besonderheiten zeigen. Da die im vorigen Kapitel wiedergegebenen Erfahrungen hauptsächlich durch Experimente mit Typhusbazillen und Choleravibrionen gemacht wurden, kann ich mich bei Besprechung dieser beiden Gruppen verhältnismäßig kurz fassen.

Benutzt man zur Identifizierung eines typhusverdächtigen Stammes hochwertige Immunsera und arbeitet mit Endverdünnungen, so wird man wohl in den meisten Fällen die Differentialdiagnose gegenüber typhusähnlichen Mikroben machen können, wenn diese auch zuweilen noch in recht hohen Verdünnungen mitagglutiniert werden. Zu empfehlen wäre immerhin die makroskopische Agglutinationsmethode und Ablesung der endgültigen Resultate nach 20—24 Stunden, da es Stämme gibt, die langsamer ausflocken. Allerdings wird diese Behinderung durch Vornahme der Agglutination bei 50—52° kompensiert. Selbstverständlich muß das Serum mit einem sicheren, leicht agglutinablen Typhusstamm vorher austitriert sein, denn die ganze Serodiagnostik beruht ja darauf, daß man mit einem bekannten Serum ein unbekanntes Bakterium klassifiziere.

Besonders hervorzuheben wäre nochmals das Vorkommen von hyp- resp. inagglutinabeln Typhusstämmen. Unter ersteren finden sich solche, die frisch aus dem Organismus, sei es bei Lebzeiten, sei es aus der Leiche, gezüchtet wurden, doch haben auch Typhusbazillen, die aus dem Wasser gewonnen wurden, mitunter die Eigenschaft schwer oder nicht ausflockbar zu sein. Die hypagglutinabeln Stämme gewinnen oft nach wenigen Passagen auf künstlichen Nährböden normale Ausflockungsfähigkeit und bieten dann der Identifizierung keine Schwierigkeiten. Anders verhält es sich mit den inagglutinabeln Stämmen. Auch mit diesen wäre zunächst ein Versuch mit Passage auf künstlichen Nährböden zu machen. Ebenso wäre der Vorschlag Wassermanns zu berücksichtigen, deren Bindungsfähigkeit für Typhusagglutinin zu prüfen. Porges hat gezeigt, daß solche Stämme auf 100° erhitzt oder aber auch in der Weise behandelt, daß man eine Bakterienemulsion in 10 ccm Kochsalzlösung mit 1 ccm $^1/_4$ Normalsalzsäurelösung versetzt und durch 15—30 Minuten auf 80° im Wasserbad erhitzt, Ausflockungsfähigkeit erlangen. Am besten eignet sich für die Prüfung in dieser Form ein Serum, das durch Injektion mit erhitzten Bakterien gewonnen wurde und dessen Titer auf ähnlich behandelte normal ausflockende Typhusbazillen ausgewertet wurde. da nur ein solches Serum erhebliche Werte für 100°-Bakterien gibt. Schließlich bliebe auch noch der Versuch übrig, mit einem solchen inagglutinabeln Typhusstamm ein Tier zu immunisieren und das auf diese Weise gewonnene Serum bezüglich seines Agglutiningehalts auf einen sicheren normalen Typhusstamm zu prüfen. Man kann durch intravenöse Injektion abgetöteter Kulturen in verhältnismäßig kurzer Zeit ein entsprechend hochwertiges Serum bekommen.

In den letzten Jahren ist die Literatur über typhusähnliche Bakterien und die durch sie hervorgerufenen Erkrankungen, sowie über die Beziehungen der einzelnen Repräsentanten dieser Gruppe zueinander und zum Eberthschen Bazillus so angewachsen, daß man allein durch Aufzählung der einzelnen Arbeiten Seiten füllen könnte. Ich kann dies um so eher unterlassen, als im I. und II. Ergänzungsband zum Kolle-Wassermannschen Handbuch diese Fragen eine eingehende Behandlung durch Kutscher erfuhren und die Literatur dort zu ersehen ist. Es genügt wohl, wenn ich auf die aus dem Studium dieser Frage sich ergebenden Schlüsse mit wenigen Worten eingehe. —

Der Paratyphusbazillus A ist sowohl vom Typhusbazillus als auch vom Paratyphus B durch ein hochwertiges Immunserum zu trennen, wenn er auch durch Sera der beiden letzteren Bazillen mitagglutiniert wird. Dabei steht er dem Typhusbazillus näher als dem Paratyphus B. Besondere Vorsicht ist natürlich bei Identitätsbestimmungen mittels minderwertigen Krankenseris geboten, und am besten sind solche für die Serodiagnose dieser Bakterien überhaupt nicht zu verwenden.

Durch Immunisierung von Tieren, am besten Eseln, gewinnt man leicht ein ziemlich hochwertiges Serum für den Paratyphus B, wodurch man dann diesen sowohl vom Typhusbazillus als auch vom Paratyphus A differenzieren kann, da der Mitagglutinationstiter für die beiden im Werte weit zurückbleibt. — Nur Jürgens und Zupnik berichten, daß die Mitagglutinine an Höhe die Hauptagglutitine erreichen, ja sogar übersteigen können, eine Behauptung, die bisher noch keine weitere Bestätigung fand. —

Der Bacillus enteritidis Gärtner ist von allen drei vorher genannten Arten als eine eigene Spezies abzuscheiden, wenn auch einige Autoren

(Schottmüller, v. Drigalski, Bonhoff) ihn als einen Paratyphusbazillus B nach ihren Agglutinationsergebnissen halten möchten. — Kutscher meint, daß an diesen Ergebnissen ein nicht einwandfreier Stamm des Gärtnerschen Bazillus Schuld gewesen sein mag. — Zu dieser Gruppe muß nach den Untersuchungen von de Nobele, Kutscher und Meinicke auch noch eine Reihe von Fleischvergiftern gezählt werden, so Bacillus Haustädt, Bac. Moorseele, Bac. Brügge etc. —

Dagegen hat schon Durham seinen Fleischvergifter vom Bacillus enteritidis Gärtner getrennt und nach den Agglutinationsverhältnissen muß man ihn zur Paratyphusgruppe zählen. In diese wäre noch die Hogcholeragruppe und einige andere Fleischvergifter einzureihen, so daß sie nun folgende Arten umfassen würde, die agglutinatorisch und durch spezifische Absorption nach Castellani nicht und nur zum Teil durch die Tierpathogenität zu trennen sind:

Bacillus paratyphus, Typus B,
Löfflersche Mäusetyphusbazillus,
Psittacosebazillus (Nocard),
Schweinepestbazillus,
Fleischvergifter (Durham, Aertryck-de Nobele, Günther-Posen, Flügge-Kaensche-Breslau, v. Drigalski, Kutscher, Uhlenhuth, Trautmann-Rattenpathogene).

Beachtenswert und von einer gewissen Wichtigkeit bei der Differentialdiagnose wäre eine Beobachtung von O. Lentz, falls sie weiteren Untersuchungen Stich hält. Die Hauptagglutinine für Paratyphus- resp. Typhusbazillen erreichen angeblich ihren Endwert schon nach halbstündiger Einwirkung bei Zimmertemperatur, während für die Nebenagglutinine erst nach zweistündigem Aufenthalte im Brutschranke die Endwerte und zwar natürlich bedeutend niedrigere zutage treten. — Mit den bisherigen Beobachtungen stimmt dies offenbar nicht gut überein, da die Ausflockung auch für Hauptagglutinine nur zu oft nach $^1/_2$ Stunde bei 15—18° C nicht beendet ist.

Zur Feststellung der Zugehörigkeit eines Bakteriums zur Hogcholeragruppe empfiehlt Smidt ein polyvalentes Schweinepestserum, während ein Psittacoseserum, auch wenn es monovalent ist, Ähnliches leistet (Böhme); doch scheint letzteres auch bei jedem anderen hochwertigen Paratyphus-Immunserum der Fall zu sein. — Als besonders wichtig möchte ich nochmals die Verwendung nur hochwertiger Immunsera zur Bestimmung eines Bakteriums hervorheben, wobei natürlich nicht zu übersehen ist, daß auch die mitunter allein nicht ausreichen. — So kann z. B. ein Enteritis-Stamm aus der Gruppe des Bac. Gärtner durch ein Typhusimmunserum ebenso hoch oder fast ebenso hoch agglutiniert werden wie ein schwer agglutinabler Typhusstamm. —

Wenn mehr als ein Bakterium in höherem Grade durch ein Krankenserum agglutiniert wird und die Titer für jedes nahe beieinander liegen, so muß man an eine Mischinfektion denken (Kayser); in solchen Fällen sind andere Methoden heranzuziehen (Züchtung, Castellanischer Absättigungsversuch, Pfeiffers Versuch). Dasselbe gilt von gewissen Typhusfällen, bei denen die Agglutination vollständig ausbleibt (Kayser, vide allg. T.). Bezüglich der Agglutination mit dem Serum Ikterischer verweise ich auf den nachfolgenden Teil von Kreissl.

A. Herz hatte vor kurzem Gelegenheit, einen Fall von Typhus abdominalis zu beobachten, bei dem ein im amphibolen Stadium einsetzendes Erysipel den Agglutinationstiter von $^1/_{150}$ auf 0 herabdrückte;

nach Ablauf des Erysipels stieg der Titer wieder auf die ursprüngliche Höhe, also ein ähnlicher Vorgang, wie ihn KAYSER bei Mischinfektion mit Staphylokokken, E. KRAUS und IVERSEN bei komplizierender Pneumonie beobachtet haben. — Der Versuch von HERZ, eine solche Verhinderung der Agglutination durch Mischen von Typhus und Erysipelseris in vitro zu erreichen, fiel negativ aus, während dies E. KRAUS nach seinen Angaben mit Pneumonieseris gelang. Es könnte sich demnach um einen nicht regelmäßig wiederkehrenden Vorgang handeln. Weitere Untersuchungen müssen darüber und über den Mechanismus überhaupt erst Aufschluß geben. —

Bacterium coli.

Es ist bisher nicht möglich, das Koliimmunserum zur Bakteriendiagnose zu verwenden, da ein solches konstant nur auf den zur Immunisierung verwendeten Kolistamm reagiert, während andere in verschiedenem Grade und ohne Gesetzmäßigkeit mitagglutiniert werden. (ACHARD, BENSAUDE, ROTHBERGER, VAN DE VELDE, DURHAM, SMITH u. a.). Kulturell differente Arten können agglutiniert werden, während dies bei kulturell ganz gleichen Arten nicht der Fall zu sein braucht. Dabei wechselt die Zahl der agglutinierbaren Stämme und die Höhe der Mitagglutination innerhalb weniger Wochen bei Verwendung ein und desselben Serums ohne bekannte Ursache (TOTSUKA). Auch die Versuche mit polyvalenten Seris ergaben keine besseren Resultate (ROTHBERGER). Einzig die Agglutination mit dem Krankenserum auf den aus dem Kranken gezüchteten Kolistamm gibt bezüglich der Ätiologie brauchbare Resultate (PFAUNDLER). Zur Vermeidung von Irrtümern bei der Serodiagnose (gegenüber Typhusbazillen) verwende man möglichst hohe Typhusimmunsera, da manche (Para-) Kolistämme hohe Mitagglutination geben.

Bacillus dysenteriae.

Durch die Agglutinationsprobe sind die echten Dysenteriestämme (KRUSE, SHIGA, FLEXNER) von den Pseudodysenteriestämmen zu scheiden (STRONG, „Y“ HISS u. a.), von denen einige höchstwahrscheinlich mit der Sommerdiarrhöe der Kinder in ätiologischem Zusammenhang stehen dürften. (DUVAL, BASSETT, HISS, LEINER, WOLLSTEIN). Auf diese Differenzen hat schon KRUSE hingewiesen. Um diese Scheidung sicher vornehmen zu können, haben MARTINI und LENTZ hochwertige Immunsera verwendet, wobei sie jedoch immerhin ziemlich bedeutende Mitagglutinationstiter für Pseudodysenteriebazillen erhielten. Auch sämtliche übrigen Untersucher konnten mindestens diese zwei Hauptgruppen unterscheiden. Gerade bei der Agglutination von Dysenteriebazillenmuß man sich vor Täuschungenhüten, da sie Neigung zur spontanen Verklumpung haben. — Die mikroskopische Beobachtung ist daher nicht geeignet, sondern die makroskopische Ablesung nach 20—24 Stunden ist vorzuziehen. (MARTINI, LENTZ, KRAUS und DOERR, HETSCH). Bei Immunisierung von Tieren gehe man recht vorsichtig vor, da in den Kulturen ein starkes Toxin produziert wird.

TODD zählt nach Prüfung mit einem Immunserum, das er durch Injektion von Kruse-Bazillen gewonnen hatte, nebst diesem Bazillus auch noch den von SHIGA und AYRE, der von einer Asyldysenterie in England stammt, dazu, während er in die zweite Gruppe mit geringerem Agglutinationswert den Bazillus FLEXNER (Král, Philippinen) und B. DUVAL

(Sommerdiarrhöe Baltimore und New-York) einreiht. Lüdke kommt auch zum Resultat, daß man den Kruse-Typus vom Flexner-Typus scheiden könne, wobei allerdings Bazillen von letzterem mit Kruse-Shiga-Serum Mitagglutination geben.

Inwieweit unter den Pseudodysenteriebazillen sich mittels Agglutination noch Gruppenbildungen zusammenfassen lassen werden, darüber sind die Untersuchungen noch nicht abgeschlossen. So nimmt Hiss drei Gruppen an 1. Kultur Y (Hiss), 2. Philippinen (Strong), 3. Flexner (Philadelphia) und Duval (Baltimore). Es ist gar kein Zweifel, daß die vielen Kulturen, die in beiden Gruppen unter verschiedenen Namen gehen, einmal genau werden klassifiziert werden können.

Die oben genannten Autoren sowie auch andere (Eisenberg und Jürgens) haben sich auch mit der spezifischen Absorption der Sera befaßt und konnten zeigen, daß aus einem Kruse-Serum durch die homologen Bazillen nicht nur die eigenen Agglutinine, sondern auch ein großer Teil des Partialagglutinins für den Flexnerschen Bazillus absorbiert wird, während durch den Flexner-Bazillus aus einem Kruse-Shiga-Serum zwar das Partialagglutinin gebunden wird, während das Hauptagglutinin gar nicht oder nur sehr wenig in seinem Wert beeinflußt wird.

Vibrio cholerae.

Ähnlich wie beim Typhusbazillus sind auch frisch aus dem Organismus, aus dem Wasser usw. gezüchtete Choleravibrionen mitunter hyp- oder inagglutinabel. Viel häufiger als bei ersterem zeigen aber solche Stämme spontane Ausflockung nach Aufschwemmung in Kochsalzlösung. — Friedberger und Luerssen haben sich mit dieser Frage beschäftigt.

Die frisch von isolierten Plattenkolonien gewonnenen jungen Schrägagarkulturen wurden bei Aufschwemmung in 0,8 % NaCl-Lösung stark ausgeflockt. Ließ man die Kultur länger wachsen (14—15 Stunden) bei 37°, so verlor sich diese Eigenschaft, bei Zimmertemperatur dauerte dies etwas länger. — Nach mehrmaligen Überimpfungen von Agar zu Agar wurde die Pseudoagglutination immer geringer, so daß man schon von 6stündigen Agarkulturen homogene Aufschwemmungen erhalten konnte. Wenn dies nicht der Fall wäre, so kann der Pfeifersche Peritonealversuch schon frühzeitig die Choleradiagnose sichern.

Andererseits wäre aber auch die Erhitzung eventuell nach vorhergegangener Ansäuerung nach Porges und Prantschoff für solche Stämme in Anwendung zu bringen.

Wie aus den Arbeiten von Kolle, Gottschlich, Hetsch, Otto und Lentz hervorgeht, ist die Agglutinationsprobe vorzüglich dazu geeignet, um Choleravibrionen zu identifizieren. Zu ähnlichen Ansichten kommt auch Prausnitz auf Grund seiner an einem außerordentlich reichen Materiale ausgeführten Untersuchungen.

Ohne mich auf die theoretischen Erörterungen in der Arbeit von Meinicke, Jaffé und Flemming einzulassen, sei hier nur das praktisch wichtige Resultat, herausgenommen, daß der positive Ausfall einer mit hochwertigem Immunserum ausgeführten Agglutinationsprobe die Choleradiagnose des fraglichen Vibrio sichert. Choleraähnliche Vibrionen werden entweder gar nicht oder in verhältnismäßig nur sehr hohen Werten ausgeflockt, sie vermögen auch nicht den spezifischen Antikörper aus dem Cholera-Immunserum zu binden, da ihr Rezeptorenapparat von dem des Vibrio cholerae verschieden ist.

Der Vorschlag, den WASSERMANN für Typhusagglutinine gemacht hat, nämlich unter Umständen aus dem Bindungsvermögen des betreffenden Bazillus auf seine Zugehörigkeit zum Typhus zu schließen, wäre für Choleravibrionen nicht anwendbar, da nach Versuchen der letztgenannten Autoren selbst Cholerakulturen, die durch ein Immunserum annähernd gleich hoch agglutiniert werden, in ihrem Bindungsvermögen bedeutende Unterschiede zeigen.

Auch die von GOTTSCHLICH kultivierten 6 El-Torstämme werden von einem hochwertigen Immunserum ebenso hoch agglutiniert wie echte Choleravibrionen (KRAUS und PRIBRAM). Dagegen ist der Titer eines mit ElTor gewonnenen Immunserums gegenüber den andern als den zur Immunisierung verwendeten Stamm oft bedeutend niedriger; doch erweist sich auch da die Spezifizität, als dieses Serum choleraähnliche Vibrionen nicht höher als ein Normalserum agglutiniert. Die El-Torstämme zeigen mitunter auch ein regelwidriges Verhalten gegenüber andern (Ziegen-, Kaninchenimmunsera). Unter solchen Umständen wird man gewiß auch andere Reaktionen noch zu Rate ziehen, so das PFEIFFERsche Phänomen, die Hämotoxin- und -antitoxinproduktion usw. (s. PRIBRAM und RUSS, Hämotoxine, Bd. I).

Bacillus diphtheriae.

Ich erwähne bloß die älteren Versuche, ein agglutinierendes Serum zu finden (NICOLAS, LANDSTEINER, NICOLLE u. a.) und gehe sogleich zu den Arbeiten von LUBOWSKI, SCHWONER und LIPSTEIN über. Nach diesen gelingt es, durch ein hochwertiges Diphtherieagglutininserum die Diphtherie- von den Pseudodiphtheriestämmen zu trennen.

Zur Immunisierung eines Pferdes wurden mehrere Stämme echter, virulenter Diphtherie verwendet, und zwar wurden zunächst zweitägige Bouillonkulturen abgetötet, später lebend in steigenden Dosen injiziert. Zur Agglutinationsbeobachtung wurde nur die makroskopische Methode benutzt, da unter dem Mikroskope selbst scheinbar homogene Kulturen noch reichliche Häufchen zeigten. — Man konnte auf diese Weise Serumwerte bis $^1/_{10\,000}$ erreichen.

SCHWONER konnte durch oftmaliges Schütteln der Bouillonkulturen keine Homogenisierung erzielen. Er ging deshalb so vor, daß er je nach dem Wachstum 1—2 48stündige Agarkulturen in 35 ccm Bouillon aufschwemmte, indem er mittels Platinöse die Kultur an der Eprouvettenwand zunächst möglichst sorgfältig verrieb und dann in die Bouillon hineinschwemmte. Die Aufschwemmung wird hernach kräftig durchgeschüttelt und zwei Stunden ruhig stehen gelassen. Von dem sich bildenden Bodensatz wird nun die obere, trübe Flüssigkeit abgehebert und in die Röhrchen verteilt. — Nach Zusatz des Immunserums bleiben die Proben 2—3 Stunden bei 37 °, dann bis 20 Stunden bei Zimmertemperatur. Die Reaktion ist nach verschieden langer Zeit beendet, diese schwankt zwischen 7 und 22 Stunden. Wenn sich nach längerer Zeit auch ein Bodensatz in der Kontrolle entwickelt, so ist dieser doch nicht so massig und läßt sich auch leicht aufschütteln, wobei wieder eine diffuse Trübung entsteht.

Während also echte Diphtherie bis $^1/_{10\,000}$ agglutiniert wurde, entsprach der Titer des Serums für Pseudodiphtheriebazillen dem eines normalen Pferdeserums, also 1:5 bis 1:10. Mit Diphtherietoxin gewonnenes Immuniserum bleibt im A. W. weit hinter dem mit Kulturen

erzeugten zurück. — Immunisiert man ein Tier mit einem Pseudodiphtheriestamm, so wirkt das Serum selbst in hohen Verdünnungen noch auf den homologen Stamm, während es andere Stämme von Pseudodiphtherie und auch echte Diphtherie unbeeinflußt läßt. — Schwoner schließt aus diesen Erfahrungen, daß der Pseudodiphtheriebazillus kein einheitliches Bakterium ist.

Lipstein erhielt rasch ein ziemlich hochwertiges Serum durch intraperitoneale Injektion toter und später lebender Diphtheriekulturen und prüfte dann das Serum mit formalinisierten Bouillonkulturen aus. Zu diagnostischen Zwecken erwies sich ein polyvalentes Serum am geeignetsten, während das mit einem avirulenten Diphtheriestamm gewonnene Serum von E. Neisser und Lubowski Diphtheriestämme in verschieden hohem Grade agglutinierte. —

Von den Pseudodiphtheriestämmen läßt sich vielleicht der Hofmann-Wellenhofsche Typus als besondere Art abscheiden, da verschiedene dieser Stämme durch ein monovalentes Serum ausgeflockt werden. —

Bacterium pestis.

Die Agglutination des Pestbazillus durch ein Immunserum ist eine absolut spezifische, so daß selbst sehr nahe stehende Mikroorganismen, z. B. Bac. typhi murium, Hühnercholera, rattenpathogene Bakterien von demselben Serum gar nicht oder höchstens bis $^1/_{10}$ agglutiniert werden. (Paltauf, Kolle und E. Martini, Markl, Neumann). Die Agglutination ist dadurch ein außerordentlich wichtiger Behelf bei der Stellung der Pestdiagnose geworden (Dunbar, Kister, Markl u. a.). Ebenso spezifisch wirkt das Serum von Pestkranken, selbst wenn der Titer gar nicht hoch ist (Wyssokowitsch und Zabolotny).

Kolle und Martini verwenden das Pariser Trockenserum, von welchem 1 g Trockenrückstand in 10 ccm Wasser aufgelöst als Ausgangsverdünnung benützt wird. In 1 ccm jeder Verdünnung wird 1 Öse Pestkultur hineingeschwemmt, wonach die Ausflockung schon nach wenigen Minuten beginnen muß und dann rasch fortschreitet. Die Beobachtung erfolgt makroskopisch. — Echte Agglutination läßt sich von der nach einiger Zeit entstehenden Sedimentierung durch Aufschütteln unterscheiden. — In ähnlicher Weise gehen Dunbar und Kister bei Agnoszierung einer aus pestverdächtigen Ratten gewonnenen Kultur vor. Sie nehmen eine Serumverdünnung $^1/_{200}$, welche prompte Agglutination geben muß, während derselbe Stamm durch ein 10—15fach verdünntes normales Pferdeserum unbeeinflußt bleibt. —

Die Serumwerte sind recht verschieden, können jedoch auch Höhen bis $^1/_{6000}$ erreichen. Dabei zeigt sich der weniger virulente Stamm agglutinabler, während der virulente wieder ein höherwertiges Serum liefert. — Shibayama konnte sich, entgegen Kolle, nicht überzeugen, daß die schwer agglutinierbare Kultur virulenter ist. Dagegen konnte er nachweisen, daß die Agglutinabilität eines Stammes geringer wird, wenn er eine zähe, fadenziehende Kultur bildet, wie dies durch Züchtung bei 32° der Fall ist. Läßt man diesen Stamm bei Eisschranktemperatur wachsen, dann verliert er seine fadenziehenden Eigenschaften und wird gleichzeitig in viel höherem Grade agglutinierbar, z. B. von $^1/_{600}$ auf $^1/_{2000}$ (vide Befunde von Porges!).

Bacterium tuberculosis.

Um Tuberkelbazillen, die ja gewöhnlich verklumpt wachsen, für die Agglutinationsprüfung brauchbar zu machen, bedarf es gewisser Manipulationen, um die Kultur zu homogenisieren. — Arloing-Courmont veröffentlichten 1898 das folgende Verfahren, mit welchem das kurze Zeit darnach von Dubard angegebene große Ähnlichkeit hat: Man schneidet gute Kartoffeln in Scheiben, übergießt sie mit 6 % Glyzerinwasser, so daß der untere Teil noch in die Flüssigkeit taucht, und sterilisiert sie. Die mit Tuberkelbazillen geimpfte Kartoffel wird bei 38—39° belassen, bis die Kultur fettglänzend geworden ist und sich ein Teil derselben in der Flüssigkeit aus dem Verbande losgelöst hat, was man noch durch Abschwemmen der Kultur mit dem Glyzerinwasser befördern kann. — Davon impft man nun weiter auf eine 6 % ige Glyzerin-Rinderbouillon, der 2 % Pepton hinzugefügt ist und welche sehr kurz bei 110° sterilisiert wurde. — Die Bouillonröhrchen müssen nun täglich ziemlich kräftig durchgeschüttelt werden, dann sieht man nach drei- bis viertägigem Bodenwachstum sich die früher klare Bouillon trüben. Bei monatlich einmaliger Impfung gewöhnen sich die Tuberkelbazillen an das homogene Wachstum. — Zur Aufbewahrung versetzt man sie mit 1—2 % Formol und hält sie im Eisschrank. — Diese Kulturen zeigen auch biologisch gewisse Eigentümlichkeiten. — Ganz alte Kulturen klären sich wieder unter Bildung eines Bodensatzes.

Die Kochsche Tuberkelbazillenmasse wird in der Höchster Fabrik von Meister & Lucius hergestellt. Getrocknete Tuberkelbazilen werden in einer Kugelmühle zu einem feinen Staub verrieben. Davon wird zum Gebrauche 0,1 in 100 ccm einer Lösung von 0,5 Karbolsäure in 0,85 NaCl verrieben, hierauf durch 6 Minuten zentrifugiert und abpipettiert. Die nochmals 10fach verdünnte Flüssigkeit kann durch etwa 14 Tage im Eisschrank ohne Schaden aufbewahrt werden. Vor dem Gebrauche wird sie noch einmal 10fach verdünnt, so daß eine Verdünnung $^1/_{10\,000}$ resultiert.

v. Behring (zitiert nach Romberg) empfiehlt folgendes Vorgehen: 10 g getrocknete und zerkleinerte Tuberkelbazillen werden in 1 Liter $^1/_2$ %iger Natronlauge durch 8 Tage bei 37° gehalten, hierauf die Flüssigkeit mit Essigsäure vorsichtig abgestumpft. Eine solche Bazillenemulsion klärt sich bei Zusatz von agglutinierendem Serum. Nun kann man aber durch komplette Lösung auch eine vollkommene klare Flüssigkeit bekommen, aus der bei Zusatz von wirksamem Serum ein Niederschlag ausfällt. Diese Lösung wird in einer Verdünnung von $^1/_{1000}$ angewendet und erweist sich oft noch empfindlicher als die Bakterienemulsion. Weitere Methoden haben auch noch Hawthorn, Kitajima angegeben.

Die Reaktion wurde bisher hauptsächlich dazu verwendet, um eine spezifische Erkrankung nachzuweisen, doch scheint sie dazu deshalb nicht geeignet, weil die Agglutination offenbar keine spezifische ist. Das Nähere hierüber bleibt dem nächsten Kapitel vorbehalten. Jedenfalls sind die Serumwerte Kranker im allgemeinen sehr niedrige.

Ganz anders verhält sich dies bei Tieren, welche durch Immunisierung recht hohe Werte, z. B. bei Eseln bis $^1/_{3500}$ (Koch) erreichen können. Ebenso nehmen Sera nach Tuberkulinbehandlung an Agglutininwert zu, was Koch als Zeichen zunehmender Besserung ansieht. — Der weniger virulente Stamm soll leichter agglutiniert werden.

Ob und inwieweit durch die Agglutination eine Scheidung der verschiedenen Tuberkelbazillen und Säurefesten möglich ist, läßt sich heute noch nicht sagen. — Koch, Beck und Rabinowitsch leugnen diese Möglichkeit, denen sich auch Schwoner (nach persönlicher Mitteilung) anschließt.

Anaerobe Bakterien.

Versuche, in die Gruppe der Bazillen des malignen Ödems, des Rauschbrandes, der Gasphlegmone usw. durch die Agglutination eine gewisse Klärung zu bringen, wurden von Leclainche und Vallée, Kamen, zuletzt von Bachmann gemacht. Es ist gar kein Zweifel, daß man durch Injektion von Tieren ein selbst hochwertiges agglutinierendes Serum erhalten kann, doch ist die Ausführung der Probe stets mit größeren Schwierigkeiten verbunden, da die anaëroben Bakterien teils ihre Beweglichkeit im hohlen Objektträger rasch verlieren, teils große Tendenz zur spontanen Agglomeration zeigen.

Bachmanns Untersuchungen ergaben, daß eine Gruppe von Stämmen ein hochwertiges Serum für den homologen Stamm, geringere Werte für die übrigen Stämme dieser Gruppe im Tierkörper zu erzeugen vermögen. — Eine zweite Gruppe gibt bei Injektion kein deutlich agglutinierendes Serum für diese Stämme, doch werden mitunter Stämme der ersten Gruppe davon agglutiniert.

Bacillus mallei.

Kleine konnte durch intravenöse Injektion von Rotzbazillen bei Ziegen und Eseln ein hochwertiges agglutinierendes Serum erhalten, und er erachtet die Identitätsbestimmung mittels Agglutination für die Dianose des Rotzbazillus für notwendig. Er geht dabei nach dem Vorgange Kochs so vor, daß 3—4 gut gewachsene Agarkulturen bei 60° abgetötet werden. Hierauf übergießt man die Kulturen mit je 2 ccm Phenolkochsalzlösung ($^1/_2$ % Phenol, 0,85 % NaCl) und kratzt sie sorgfältig ab. Die Aufschwemmungen werden nun in einem Meßzylinder zusammengegossen und so lange Phenolkochsalzlösung zugegeben, bis die Flüssigkeit einen schwach milchigen Farbenton hat, wozu pro Kultur 40—50 ccm Phenolkochsalzlösung notwendig ist. Hierauf wird durch ein dünnes Papierfilter filtriert und diese Testflüssigkeit dann verwendet. Die beste Menge in den Reagenzgläsern soll 3 ccm sein, weil sonst die Deutlichkeit der Agglutination leidet.

Bonome gibt speziell bei der Beurteilung der Agglutinationskraft von Endverdünnungen der mikroskopischen Beobachtung einer lebenden etwa dreitägigen Bouillonkultur den Vorzug gegenüber der makroskopischen Beobachtung von auf 60° erhitzten abgetöteten Bakterien (Kleine). Ohne auf die interessanten Befunde bei rotzkranken Tieren hier einzugehen, die in Fortsetzung der Arbeiten von Mac Fadyean, Wladimiroff u. a. gemacht wurden, möchte ich nur hervorheben, daß es ihm gelungen ist, auf 60—65° erhitztes, inaktiviertes agglutinierendes Serum durch Zugabe von normalem Pferde- (aber auch Menschen- und Katzen-) Serum im Verhältnis 1:2 bis 1:3 zu reaktivieren.

Schnürer macht seine Untersuchungen mit der Lupe, wozu er Kochsalzaufschwemmungen von bei 60° abgetöteten Kartoffelkulturen

verwendet. Die Dichte der Aufschwemmung wird nach dem Prinzip des Fäserschen Laktoskops beurteilt. Die Beobachtung soll auf 24 Stunden und länger ausgedehnt werden. Moore züchtet auf Glyzerinagar, tötet durch zweistündiges Erhitzen auf 60° ab und suspendiert in einer mit Karbolsäurelösung versetzten NaCl-Lösung.

Während Kleine die Agglutination als ein leicht und gut verwendbares Verfahren zur Diagnose des Rotzbazillus ansieht, deutet Schnürer an, daß differente Stämme verschiedene Agglutinierbarkeit haben können, letztere auch mit Alter und Virulenz der Kultur zusammenhängen kann. — Ausführliche Mitteilungen hierüber stehen zurzeit noch aus.

Kapselbakterien.

Auf die ersten und älteren Untersuchungen durch Kraus, Donath, Landsteiner, Defalle, Sicard, Klemperer, Scheider u. a. folgt die ausführliche Arbeit über diese Bakteriengruppe von Clairmont, welcher zu dem Resultat kommt, daß sich eine Differenzierung der einzelnen dahin gehörigen Arten durch die Agglutination nicht durchführen ließe. — Ein Immunserum, gewonnen durch Injektion eines Bacillus lactis aërogenes, agglutinierte auch drei andere Stämme ähnlicher Herkunft (Säuglingsstuhl), während ein Stamm, aus dem Stuhl Erwachsener gezüchtet, sich vollständig refraktär verhielt. Interessant war es auch, daß Bacillus aërogenes aus cystitischem Harn, aus dem Respirationstraktus gewonnen, keine Agglutinine produzierten. Es ergaben sich demnach Unterschiede je nach dem Fundorte.

Porges hat die Frage von neuem zur Bearbeitung aufgenommen. Während die meisten Untersucher mangelnden Agglutiningehalt des Serums infolge refraktären Verhaltens der Versuchstiere annahmen, ging Porges von der Ansicht aus, daß in einem eigentümlichen Zustand der Bakterien die Ursache für ihre Inagglutinabilität zu suchen sei. Anderweitige ähnliche Erscheinungen ließen Porges vermuten, daß auch für diesen Fall die Menge oder die physikalisch-chemische Beschaffenheit der Suspension für die Stabilität der Bakteriensuspension ausschlaggebend sei.

In der Tat gelingt es, Agglutination mit ziemlich hohen Verdünnungen von Immunserum zu erhalten, wenn man eine Agarkultur in 10 ccm NaCl-Lösung aufschwemmt, mit dem vierten Volumteil einer $^1/_4$ NHCl versetzt und 15′ auf 80° erhitzt. Stark schleimige Kulturen müssen länger, bis zu 45′ erhitzt werden. — Die Beobachtung der Ausflockung erfolgt makroskopisch, wobei die Röhrchen bei 50° gehalten werden.

Durch einen Absorptionsversuch konnte erwiesen werden, daß auch die unveränderten Kapselbakterien Agglutinin absorbieren, aber offenbar erst die Zerstörung der Kapsel vermindert die Stabilität der Suspension; denn die Bakterien der behandelten Kulturen erwiesen sich als dünne Stäbchen, eine Kapsel war nicht nachzuweisen. — Im übrigen macht auch Landsteiner auf Kapselveränderungen bei agglutinierenden Stämmen aufmerksam.

Durch Anwendung dieser Methode ist es v. Eisler und Porges gelungen, Friedländerbazillus vom Rhinosklerombazillus zu differenzieren; für Ozäna sind die Untersuchungen noch nicht abgeschlossen. Allerdings gibt es auch Stämme, welche nativ agglutiniert werden, aber diese sind meist durch eine spärliche Kapselbildung ausgezeichnet (Streit).

Das trockene Wachstum der Kulturen und damit bessere Agglutinabilität suchte Streit auf verschiedene Weise zu erreichen, die besten Methoden sind Züchtung bei 8—12° oder auf Kartoffelagar bei 37°. Doch hält er alle Methoden, auch die von Porges nicht für alle Stämme für zuverlässig.

Auch Bertarelli konnte z. T. ziemlich hoch agglutinierende Sera erhalten und will auf Grund seiner Versuche folgende Einteilung machen:

I. Grundform: Bac. aërogenes { Lact. aërogenes (Escherich), Pneumobazillus Friedländer mit einigen Abarten.

II. Grundform: Bac. capsulat. mucosus { Caps. muc. Fasching, Rhinosklerom.

Andere Arten der Gruppe könnten leicht ihre Einreihung finden.

Hier sei auch der sogenannten „amorphen Agglutination" Erwähnung getan, welche Schmidt mit dem Serum eines an Friedländer-Pneumonie Erkrankten bei Einwirkung auf Friedländerbazillen erhalten hat. Neben Agglutination (einen Monat nach Beginn der Erkrankung), Fadenreaktion ließen sich „meist sofort oder wenigstens nach sehr kurzer Zeit im agglutinierenden hängenden Serumtropfen feinste, z. T. glänzende, z. T. matte Granula von ungleicher Größe nachweisen, welche in der Folge zu größeren, hellglänzenden Klümpchen konfluierten, bis in ca. 2 Stunden allenthalben ausgedehnte, mit Ausläufern versehene Rasen von grobkörnigen, stark lichtbrechenden Granula sich vorfanden, ein Phänomen, welches durch die Mächtigkeit seiner Erscheinung das Agglutinationsphänomen geradezu in den Hintergrund drängte". Die Granularasen lagen in einem höheren Niveau als die agglutinierten Bakterien und sanken auch nicht unter. Diese eigentümliche Reaktion will Schmidt von der Agglutination abtrennen und meint, daß sie auch mit Präzipitationserscheinungen nichts zu tun hat, da man sie auch mit jungen (6stündigen) Agarkulturen erhalten kann. — Clairmont erwähnt in seiner Arbeit auch „körnig aussehende Häufchen", ebenso findet sich in Paltaufs Referat über Sklerombazillen eine Bemerkung über amorphe Haufen derselben.

Diplococcus pneumoniae.

Agglutinationsphänome an diesen Mikroorganismen gehören wohl zu den frühesten Beobachtungen, welche in dieser Hinsicht gemacht wurden; denn Metschnikoff hat bereits 1891 beobachtet, daß Pneumokokken, welche in einem Immunserum gewachsen waren, die Tendenz zeigten, in langen, vielfach verschlungenen und verfilzten Ketten zu wachsen. Weitere Arbeiten von Besançon und Griffon, Huber, Pane, Jehle, Gargano und Fattori bestätigten und erweiterten das Tatsachenmaterial. In ausführlicher Bearbeitung der Frage zeigte Neufeld, daß die Agglutination so vor sich geht, daß sich die einzelnen Exemplare oder kurzen Ketten aneinander reihen und so Ketten von vielen Hunderten Exemplaren entstehen, die sich vielfach zusammenrollen und verfilzen; so werden Häufchen gebildet, die zunächst erst mikroskopisch sichtbar sind. Bei weiterem Fortschreiten klärt sich die Flüssigkeit in der Eprouvette, so daß nach Stunden auch makroskopisch die Agglutination erkennbar ist. Am schönsten lassen sich diese Phänomene bei Einwirkung nicht zu konzentrierten Serums erkennen. Erwähnenswert ist auch die rasche Abnahme des Titers bei Aufbewahrung des Serums.

Der Titer der Immunsera war von den meisten Autoren als nicht sehr hoch gefunden. JEHLE gewann als höchsten Wert von einem pneumoniekranken Kinde 1:160. KINDBORG konnte durch intravenöse Injektion von abgetöteten Agarkulturen bei Kaninchen Werte von 1:1000, ja bei Schafen, deren Serum schon von Haus aus stärker wirksam ist, bis $^1/_{5000}$ erzielen. Es zeigte sich dabei, daß nur der homologe Stamm von den Endwerten beeinflußt wurde, während andere nur in starker Konzentration des Immunserums agglutiniert wurden. Positiv wäre der Ausfall der Agglutination nur dann anzusehen, wenn sich auch makroskopisch nach etwa 15 Stunden deutliche Klärung der Flüssigkeit ergibt. Die Technik weicht von der gewöhnlichen WIDALschen nicht ab.

Die Untersuchungen KINDBORGS stimmen mit den älteren Befunden von BESANÇON und GRIFFON, GARGANO und FATTORI überein, die auch fanden, daß der aus dem Sputum gezüchtete Stamm allein oder in den höchsten Werten agglutiniert wird. Die nicht homologen Stämme geben oft unvollkommene Agglutination, indem makroskopisch keine Klärung eintritt, mikroskopisch aber nach KINDBORG sternförmige Bilder durch Übereinanderlagerung von längeren Ketten entstehen.

HEYROVSKY meint zu besseren Resultaten zu kommen, wenn er den Diplokokkus durch Züchtung in bestimmten Kulturflüssigkeiten zur Degeneration bringt und dann erst zur Agglutination verwendet. Er züchtet zunächst 12—20 Stunden in alkalischer 1%iger Traubenzuckerbouillon und läßt hierauf die Kultur einige Tage bei Zimmertemperatur stehen. Nach Zusatz von Immunserum zu einer solchen Kultur tritt nach 12 Stunden bei Zimmertemperatur typische Agglutination ein, welche spezifisch ist.

Meningococcus. — Gonococcus.

Durch Injektion, speziell intravenöse Injektion von Meningokokken läßt sich bei Tieren (Kaninchen, Pferden) verhältnismäßig leicht ein agglutinierendes Serum herstellen (WEICHSELBAUM, ALBRECHT und GHON). Beachtenswert bei der Meningokokkenagglutination ist nur, daß man nicht zu selten auf Stämme trifft, die schwer oder gar nicht agglutinabel sind (RAUTENBERG, KOLLE und WASSERMANN). In solchen Fällen empfiehlt KUTSCHER die Probe bei 55° vorzunehmen und erst nach 24 Stunden abzulesen. Bezüglich der Bindung verhalten sich diese Stämme auch bei 37° wie leicht agglutinable Meningokokken, d. h. sie binden Agglutinin. RUPPEL bekam ein stark agglutinierendes Meningokokkenserum durch Immunisierung mit einem Stamm, der durch tägliche Passage in einem flüssigen Nährboden wuchs und hochvirulent war.

Um ein Serum zu erhalten, welches Gonokokken agglutinierte, ging VANNOD so vor, daß er nach dem Vorgang von GALEOTTI und LUSTIG ein „Nukleoproteid" aus Kulturen herstellte. In PETRUSCHKY-schalen läßt man die Gonokokken durch 4—5 Tage auf Ascitesagar oder auf dem Nährboden von LIPSCHÜTZ auswachsen. Dann läßt man durch 2—3 Stunden eine 1% iger Kali causticum einwirken, wobei eine graugelbe opaleszierende Flüssigkeit entsteht. Unter Umrühren mit einem Glasstab wird 1%ige Essigsäure zugesetzt, wobei das Nukleoproteid als eine homogene Masse herausfällt. Hierauf wird die Essigsäure abgegossen, das Nukleoproteid 2—3 mal mit sterilisiertem Wasser gewaschen. Die auf ein steriles Papierfilter gebrachte Masse wird nun mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, bis das Waschwasser vollkommen neutrale Reaktion gegen Lackmus gibt. Das Nukleo-

proteid wird darnach zur Trockne eingedampft; es entsteht ein grauweißes Pulver, welches vor Licht geschützt aufbewahrt wird und, in 1%iger Sodalösung gelöst, zu Injektionen verwendet werden kann.

Immunisiert man Kaninchen mit diesem Nukleoproteid durch intravenöse, subkutane oder intraperitoneale Injektionen, so bekommt man ein agglutinierendes Serum, in manchen Fällen bis $^1/_{1000}$. Agglutinierende Sera gegen Gonokokken erhielten auch Wildbolz und Brückner und Christéanu, während das antitoxische Serum von Christmas keine agglutinierenden Eigenschaften hat.

Sowohl Vannod als auch Brückner und Christéanu konnten erweisen, daß das Serum spezifisch für Gonokokken ist; nur für eine Bakterienart, für Meningokokken, enthält es Partialagglutinine, mitunter bis zu hohen Graden, doch bleibt der Titer immer etwas hinter dem für Gonokokken zurück. Ein ähnliches Verhalten findet man beim Meningokokkenserum gegenüber Gonokokken. Diese Tatsachen sprechen für eine Artverwandtschaft der beiden Bakterienarten.

In dem Streit, ob der leicht züchtbare, grampositive Jägersche Diplokokkus mit dem gramnegativen Weichselbaumschen Meningokokkus identisch sei, wurde von ersterem auch das Agglutinationsverfahren herangezogen. Auf Grund seiner Untersuchungen, mit denen auch die von Sorgente, Jasper übereinstimmen, würde der Jägersche Diplokokkus durch ein Meningokokkenserum agglutiniert, und damit wäre die Identität erwiesen.

Dagegen sprechen jedoch die Versuche von Feldermann und Fischer. Benutzt man hochwertige Sera, so zeigt der Diplokokkus Jäger zwar auch im Meningokokkenserum Agglutination selbst in verhältnismäßig starken Verdünnungen. Hält man sich jedoch an die Forderung von Kolle und Wassermann, nach der die Serodiagnose auf Meningokokken nur dann beweisend ist, wenn normales Serum keine Agglutination gibt, so findet man bei entsprechenden Versuchen, daß Diplokokkus Jäger von vielen normalen Seris selbst in hohen Verdünnungen agglutiniert wird, während dies beim Weichselbaumschen Meningokokkus nicht der Fall ist (v. Lingelsheim, Manteufel, Fischer).

Zur Serodiagnose der Meningokokken sind demnach hochwertige Immunsera zu verwenden. Als Kontrolle ist auch eine Probe mit normalem Serum aufzustellen, in welchem echte Meningokokken nicht agglutiniert werden; eine Agglomeration derselben kann jedoch vorgetäuscht werden; dieselbe verschwindet aber, wenn man die Probe bei 55° durch 24 Stunden stehen läßt, während sie bei unechten Meningokokken bestehen bleibt.

Streptococcus.

Die Frage nach der Verwendbarkeit der Agglutinationsprobe zur Identifizierung resp. Spezifizierung der Streptokokken harrt noch immer ihrer definitiven Lösung. Die diesbezüglichen Arbeiten werden schon durch die mitunter schwer herstellbare homogene Aufschwemmung erschwert. Einzelne in kurzen Ketten wachsende Streptokokken geben ja ohne weiteres brauchbare Aufschwemmungen; wo dies jedoch nicht der Fall ist, suchte man sich auf verschiedene Weise zu helfen. — So führt mitunter die Aufschwemmung von Agarkulturen in Bouillon oder NaCl zum Ziele (Zelensky, Karwacky), oder oftmalige Überimpfung innerhalb kurzer Zeit (Detot); auch oftmaliges Schütteln der Bouillonkultur eventuell mit Porzellankügelchen gibt verwendbare Emulsionen (van de Velde, Aronson,

Schwoner). Moser und v. Pirquet nahmen eine Durchlüftung der Kulturen vor, indem sie während des Wachstums oder auch nach Beendigung desselben Luft durch die Röhrchen durchtrieben. — Einer eigenen Methode bedienten sich Salge und Hasenknopf, die im wesentlichen darauf beruht, daß Streptokokken aus Bouillonkulturen nach Einwirkung von Normalnatronlauge im Achatmörser zerrieben und nach Neutralisierung mit Normalsalzsäure wieder in NaCl aufgeschwemmt werden, wodurch eine homogene, opaleszierende Flüssigkeit entsteht. — Angaben hierüber finden sich auch in den Arbeiten von Fischer und Kerner.

Auch über die Art der Beobachtung sind die einzelnen Autoren nicht einig. Während die einen der mikroskopischen Untersuchung das Wort reden, bevorzugen andere wieder die makroskopische; jedenfalls sind Fehler und Täuschungen in der Beobachtung bei letzterer Art eher zu vermeiden. — Landsteiner hat auf den besseren Verlauf der Reaktion bei höherer Temperatur aufmerksam gemacht.

Zur Immunisierung werden sowohl lebende als auch tote saprophytische und virulente Streptokokken verwendet; doch scheinen die hochwertigsten Agglutininsera nach Injektion virulenter (lebender oder abgetöteter) Kulturen erzielt worden zu sein. — Erwähnenswert scheint mir die Beobachtung Kerners, daß ein nicht tierpathogener Streptokokkenstamm erst dann ein Serum gab, als man eine Proteuskultur mitinjizierte.

Mit den durch Injektion gewonnenen Immunseris bekommt man nun ziemlich hochwertige Agglutinationstiter, mindestens für den homologen Stamm; doch werden auch heterologe, verwandte Stämme bis zu ziemlich starken Verdünnungen agglutiniert. Eine Unterscheidung von saprophytischen und virulenten Stämmen durch die Agglutination ist wohl nicht möglich.

Die Untersuchungen, ob man krankheitsspezifische Streptokokken voneinander unterscheiden kann, sind noch nicht eindeutig abgeschlossen. — Meyer wollte die Streptokokken in solche der Anginen und in die der pyogenen Infektionen teilen, Moser und v. Pirquet berichten über eine spezifische Beeinflussung der aus Scarlatina gezüchteten Streptokokken durch ein mit diesen gewonnenes Serum, de Wacle und Sugg erzielten Agglutination der bei Variola vorkommenden Streptokokken nur durch das Serum und andere Flüssigkeiten von Variolakranken. — Andere Forscher, so Aronson, Neufeld, Jogichess leugnen diese Spezifizität. — Es ist wohl sehr plausibel, daß diese Unterschiede in Änderungen des Rezeptorenapparates der Mikroorganismen bestehen. Inwieweit hierbei Tierpassage, Nährboden usw. eine Rolle spielen, ist noch nicht ganz geklärt, wenn auch das tatsächliche Bestehen einer solchen Beeinflussung nicht geleugnet werden kann.

Vielleicht wird auch da die Erhitzung der Aufschwemmung auf 100° eindeutigere und konstantere Resultate geben. — Vorläufig ist die Serodiagnose der Streptokokken noch keineswegs eine verläßliche Methode zur Spezifizierung.

Staphylococcus.

Abgesehen von älteren Angaben über Staphylokokkenagglutination (Landsteiner, Silvestrini, Kraus und Löw) haben sich J. Nicolas und Lesieur, sowie Kolle und Otto mit der künstlichen Immunisierung von Tieren und der Brauchbarkeit des Serums zur Differenzierung von pathogenen und nichtpathogenen Staphylokokken beschäftigt. Weitere Arbeiten von Pröscher, Klopstock und Bockenheimer bestätigten

die Resultate dieser Autoren, daß es gelingt, mittels der Agglutination die pyogenen von den saprophytischen Staphylokokken zu unterscheiden, indem ein mit ersteren gewonnenes Serum nur die pyogenen Staphylokokken (aureus, albus, citreus) agglutiniert, gar nicht oder nur in sehr hohen Konzentrationen die saprophytischen.

Allerdings gibt es auch unter den pyogenen Stämmen solche, die sich nur schwer agglutinieren lassen; auch geben Sera verschiedener Tiere mit denselben Stämmen verschiedene relative Agglutinationswerte, sogar Sera von derselben Tierart verhalten sich gegen die Staphylokokkenstämme nicht gleich. Es ist also von Vorteil, polyvalente Sera zu gewinnen.

Zur Immunisierung wurden Kaninchen und Ziegen verwendet. Von letzteren fand Amberger und Shiga (zit. nach Neisser, Kolle-Wassermann Bd. IV), daß das Serum auch normalerweise mitunter recht hohe Agglutininwerte gibt, doch immer niedriger als ein hochimmunisiertes Tier.

Am besten bewährte sich die intravenöse Immunisierung mit abgetöteten pyogenen Staphylokokken. Die Reaktion wird entweder makroskopisch in Eprouvetten oder mit schwacher Vergrößerung im Blockschälchen nach Pröscher angestellt. Während Kolle und Otto eine $^1/_2$ stündige Beobachtung bei 37° für genügend halten, wird von anderen die endgültige Ablesung erst nach längerem Verweilen in Zimmertemperatur vorgenommen.

Durch ein mit saprophytischem Staphylokokkus gewonnenes Serum wurden die pyogenen Stämme gar nicht, der homologe und ein zweiter saprophytischer Stamm in schwacher Verdünnung, andere saprophytische Stämme nicht agglutiniert. Es scheint daraus hervorzugehen, daß es unter letzteren noch Artunterschiede gibt.

Trypanosomen.

Die Trypanosomenagglutination zeigt sehr schön die Unabhängigkeit dieser Erscheinung von anderen Immunitätsreaktionen, vor allem müssen die Trypanosomen trotz Agglutination nicht ihre Beweglichkeit einbüßen. Bringt man Trypanosomen mit Immunserum von nicht zu hoher Agglutinationskraft zusammen, so kann man die Vorgänge dabei sehr gut beobachten. Es treten nämlich die einzelnen Individuen mit ihren Hinterenden zusammen und bilden prächtige Rosetten, während das freie Geißelende seine Beweglichkeit beibehält.

Zuerst und am gründlichsten wurde die Agglutination der Trypanosomen von Laveran und Mesnil an dem Trypanosoma Lewisi studiert. Im Zentrum einer solchen Rosette findet sich nicht selten ein Leukocyt. Ist das Serum kräftig wirkend, so treten mehrere, ja viele Rosetten zu einem Haufen zusammen, welcher dann mit freiem Auge sichtbar ist, und in dessen Mitte Absterbeerscheinungen an den Trypanosomen häufig auftreten.

Die Beweglichkeit schädigende Eigenschaften treten im Serum erst später, bei viel höheren Immunitätsgraden als die agglutinierenden auf. Wendet man ein solches Serum an oder tötet man die Trypanosomen vorher durch Chloroform oder Formol und läßt dann ein agglutinierendes Serum einwirken, so entstehen unregelmäßige Haufen, die Rosettenbildung bleibt aus.

Mitunter kann man bei noch beweglichen Trypanosomen eine Desagglutination wahrnehmen, offenbar lösen sich einzelne Individuen los

und zerreißen dadurch den Haufen; büßen sie mit der Zeit ihre Beweglichkeit ein, so kann es wieder zur Reagglutination kommen.

Das Studium verschiedener normaler Sera zeigte, daß manche derselben agglutinierende Eigenschaften besitzen, und zwar auch für rote Blutkörperchen ebenso wie die Immunsera, nur ist der Titer für Blutkörperchen gewöhnlich höher als der für Trypanosomen. — Gegen Einwirkung von Temperaturerhöhung erweisen sich normale und Immunsera gleich empfindlich: Schädigung durch $^1/_2$ stündige Erwärmung auf 56—58°, Zerstörung bei etwa 65°. Peritonealexsudat von hochimmunisierten Tieren wirkt leicht agglutinierend.

Die Art der Agglutination wird neuestens als Einteilungsprinzip für die Trypanosomen verwendet.

Literatur.

Achard und Bensaude, Académ. des Sciences 1896. — Presse méd. 1896.
Achard und Lannelongue, Soc. de Biol. 1897.
Albrecht, H. und Ghon, A., Wiener klin. Wochenschr. 1901.
Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. XVI und XVII (Vagedes).
Arloing, S., Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1898. — Congrès intern. de Paris 1900.
Arloing und Courmont, Zeitschr. für Tuberkulose 1900. — Deutsche med. Wochenschrift 1900.
Aronson, Deutsche med. Wochenschr. 1903.
Arrhenius, Zeitschr. für Elektrochemie, Bd. X.
Asakawa, N., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLV.
Bachmann, E., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVII.
Bail, O., Prager med. Wochenschr. 1901. — Archiv für Hygiene, Bd. XLII.
Ballner, F. und Sagasser, R. v., Archiv für Hygiene, Bd. LI.
Beck, M. und Rabinowitsch, L., Deutsche med. Wochenschr. 1900 und 1901.
v. Behring, Deutsche med. Wochenschr. 1903.
Beljaeff, W., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIII.
Bensaude, Le phénomène de l'Agglutination. Paris 1897.
Bertarelli, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIX. Referat.
Bessançon und Griffon, Ann. de l'Inst. Pasteur 1900.
Biltz, Bericht der Deutschen chemischen Gesellschaft 1904.
Böhme, A., Zeitschr. für Hygiene, Bd. LII.
Bonhoff, H., Arch. für Hygiene 1904, Bd. L. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIII.
Bonome, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII, Nr. 4, pag. 5.
Bordet, Ann. de l'Inst. Pasteur 1896 und 1899.
Bossaert, Ann. de l'Inst. Pasteur 1898.
Bredig, Inaug.-Diss. Leipzig 1901.
Brieger und Mayer, Deutsche med. Wochenschr. 1903.
Brieger, L. und Schütze, Deutsche med. Wochenschr. 1902.
Brion, A. und Kayser, H., Münchener med. Wochenschr. 1902.
Bruns, H. und Kayser, H., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLIII. (Literatur.)
Buxton, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. I. Referat.
Buxton und Vaughan, Journ. of Medical Research, Vol. XII.
Cantani, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLII.
Castellani, Aldo, Zeischr. für Hygiene 1902, Bd. XL, Nr. 37.
Charrin und Roger, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1889, pag. 667.
Clairmont, P., Zeitschr. für Hygiene und Infekt., Bd. XXXIX.
Cole, Rufus J., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLVI.
Conradi, v. Drygalski und Jürgens, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLII.
Courmont, P., Paris 1897. — Révue de méd. 1900. — Sém. méd. 1897. — Congrès de la Tuberc. Paris 1898. — Soc. de Biol. 1897, 1898 und 1900.
Courmont und Julien, Arch. de méd. exper.
Defalle, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902.
Detot, Soc. de Biol. 1905. — Centralbl. für Bakt. 1905. Referat.
Deutsch, L., Ann. de l'Inst. Pasteur 1899.
Deutsch, Centralbl. für Bakt. 1900.
Dieudonné, Schutzimpfung und Serotherapie, Leipzig. — Habilitationsschrift, Würzburg 1898. — Festschr. der phys.-med. Gesellsch., Würzburg 1899.

Dineur, Bull. de l'Acad. Royal Belgique 1897.
Dörr, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIV.
Dreyer, G. und Jex-Blake, Mém. de l'Acad. Royal des sciences et des l. de Danemark, Sér. VII, Sect. des sciences, Tome I.
Drygalski, v., Festschrift für Rob. Koch. Jena 1903.
Dubois, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902.
Dunbar und Kister, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVI.
Dungern, E. v., Festschrift für Rob. Koch. Jena 1903. — Die Antikörper. Jena 1903. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIV.
Durham, The Lancet 1896, 1897 und 1898. — Münchener med. Wochenschr. 1898, Nr. 5. — Journ. of Path. and Bact. 1897. — Brit. medical Journal 1898. — Journal of exper. Med., Vol. 5. — Transactions of the path. Society of London 1899.
Duval, C. W. und Bassett, V. H., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIII.
Ehrlich, P., Schlußbetrachtungen. Nothnagels Handbuch der intern. Med., Bd. VIII.
Ehrlich, P. und Morgenroth, Berliner klin. Wochenschr. 1901.
Eisenberg, Ph., Centralbl. für Bakt., Bd. XLI. — Wiener klin. Wochenschr. 1904.
Eisenberg, Ph. und Keller, E., Centralbl. für Bakt. 1903.
Eisenberg, Ph. und Volk, R., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XL.
van Emden, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXX.
Emmerich und Löw, Zeitschr. für Hygiene 1899. — Münch. med. Wochenschr. 1899. — Centralbl. für Bakt., Nr. 29.
van Ermengem, Handb. für path. Mikroorg. von Kolle-Wassermann, Bd. II.
Falta, W. und Noeggerath, H., Deutsches Archiv für klin. Med., Bd. LXXXIII.
De Feyfer und Kayser, Münchener med. Wochenschr. 1902.
Ficker, Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 45.
Fischer, H., Zeitschr. für Hygiene 1902. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVII.
Flexner, Centralbl. für Bakt., Bd. XXX.
Ford, W. W., Zeitschr. für Hygiene 1902, Bd. XL.
Förster, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXIV.
Fränkel, E. und Otto, Münchener med. Wochenschr. 1897.
Friedberger, Centralbl. für Bakt. 1901 und 1902. — Berliner klin. Wochenschrift 1902. — Salkowski, Festschrift.
Gaethgens, Arch. f. Hyg. Bd. LXVI.
Gaffky und Paak, Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. VI.
Gengou, O., Ann. de l'Inst. Pasteur 1899. — Arch. intern. de pharmac. 1899.
Ghon, A., Wiener klin. Wochenschr. 1907.
Glässner, K., Zeitschr. für experim. Pathologie und Therapie, Bd. I, Heft 1.
Grassberger, R. und Schattenfroh, A., Archiv für Hygiene, Bd. XLVIII. — Münchener med. Wochenschr. 1901 und 1902.
Graziani, A., Centralbl. für Bakt., Bd. XLII.
Gruber, M., Wiener klin. Wochenschr. 1896, Heft 11 und 12. — Münchener med. Wochenschr. 1896, 1897, 1899 und 1901. — Referat auf dem 16. internat. Kongreß für Hygiene, Brüssel 1903. Sektion I.
Gruber und Durham, Münchener med. Wochenschr. 1896.
Grünbaum, The Lancet 1896, Vol. II. — Ann. de l'Inst. Pasteur 1897.
Hahn und Trommsdorff, Münchener med. Wochenschr. 1900.
Halban, H., Ann. de l'Inst. Pasteur 1898.
Halban, J. und Landsteiner, K., Wiener klin. Wochenschr. 1901.
Hawthorn, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1902 und 1903.
Herz, A., Wiener klin. Wochenschr. 1907.
Hetsch, H., Klin. Jahrbuch 1904.
Hetsch, H. und Lentz, O., Festschrift zu Ehren Rob. Kochs 1904.
Heyrovsky, J., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII.
Huber, Centralbl. für innere Medizin 1902.
Hünermann, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XL.
Jakobsthal, E., Archiv für Hygiene, Bd. XLVIII.
Jäger, H., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLIV. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXXV.
Jatta, M., Zeitschr. für Hygiene 1900.
Jehle, Wiener klin. Wochenschr. 1903.
Jogichess, M., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVI.
Johnston, Centralbl. für Bakt., Bd. XXI. — American Journ. of med. scienc. 1902.
Joos, A., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIII, pag. 30. — Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXVI, pag. 40.
Jörgensen, Axel, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII.
Jörgensen und Madsen, T., Festschrift. Kopenhagen 1902.

Jssajeff, Ann. de l'Inst. Pasteur 1893, pag. 269.
Isajeff und Ivanoff, Zeitschr. für Hygiene 1894.
Jurewitsch, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIII.
Jürgens, Zeitschr. für Hygiene 1903. — Zeitschr. für klin. Medizin 1904. — Deutsche med. Wochenschr. 1903.
Kafka, V., Centralbl. für Bakt., Bd. XL.
Kasten, F., Deutsche med. Wochenschr. 1903.
Kayser, H., Deutsche med. Wochenschr. 1903 und 1904. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXXI und XXXV.
Kerner, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII.
Kindborg, Amy, Zeitschr. für Hygiene, Bd. LI.
Kirstein, F., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLVI.
Kister, Centralbl. für Bakt., Bd. XLI.
Kitayima, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIII.
Kleine, F. R., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLIV.
Kemperer, F. und Scheier, M., Zeitschr. für klin. Medizin, Bd. XLV.
Koch, R., Deutsche med. Wochenschr. 1901.
Köhler, Fr., Klinische Jahrbücher 1901, Bd. VIII.
Kolle, W., Deutsche med. Wochenschr. 1897. — Klinische Jahrbücher, Bd. XI. — Zeitschr. für Hygiene, Bd. LII.
Kolle, W. und Gottschlich, E., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLIV.
Kolle, W. und Martini, E., Deutsche med. Wochenschr. 1902.
Kolle, W. und Otto, R., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLI.
Korte, W., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLIX.
Korte und Steinberg, Münchener med. Wochenschr. 1905. — Deutsches Arch. für klin. Medizin, Bd. LXXXII.
Kraus, R., Wiener klin. Wochenschr. 1897, Nr. 18. — Zeitschr. für Heilkunde 1900 und 1902. — IX. Internationaler Kongreß für Hygiene zu Madrid.
Kraus, R. und Joachim, J., Wiener klin. Wochenschr. 1903. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVI.
Kraus, R. und Löw, L., Wiener klin. Wochenschr. 1899.
Kraus, R. und v. Pirquet, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXII.
Kraus, R. und Prantschoff, A., Centralbl. für Bakt., Bd. XLI.
Kraus, R. und Pribram, E., Centralbl. für Bakt., Bd. XLI.
Kraus, R. und Schiffmann, Ann. de l'Inst. Pasteur.
Kretz, Jahrbuch der Wiener Krankenanstalten 1897.
Kruse, Deutsche med. Wochenschr. 1900 und 1901.
Kurth, Deutsche med. Wochenschr. 1901.
Kutscher und Meinicke, E., Zeitschr. für Hygiene, Bd. LII.
Landsteiner, K., Wiener klin. Wochenschr. 1897. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXV.
Landsteiner und Jagič, N., Münchener med. Wochenschr. 1903. — Wiener klin. Wochenschr. 1904.
Landsteiner und Reich, M., Centralbl. für Bakt, Bd. XXXIX. Zeitschr. für Hyg. Bd. LVIII.
Landsteiner und Uhlirz, Centralbl. für Bakt., Bd. XL.
Laveran, A. und Mesnil, F., Trypanosomes et Trypanosomiases. Paris 1904.
Leclainche, E. und Vallée, H., Ann. de l'Inst. Pasteur 1900.
Lentz, O., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLXXXI und XLXXXIII.
Levaditi, Soc. de Biol. 1899.
Levy, E. und Bruns, H., Berliner klin. Wochenschr. 1897.
Liefmann und Nieter, Medizinische Klinik 1906.
Lipschütz, B., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXV.
Lipstein, Deutsche med. Wochenschr. 1902.
Löffler, E., Deutsche med. Wochenschr. 1904.
Löwit, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIV.
Lubowski, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXV.
Lubowsky und Steinberg, Arch. für klin. Chirurgie, Bd. LXIX bzw. LXXIX.
Lüdke, H., Centralbl. für Bakt., Bd. XL.
Malvoz, Ann. de l'Inst. Paris 1897 und 1899. — Centralbl. für Bakt. 1901.
Markl, Centralbl. für Bakt., Bd. XXIX.
Marmorek, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902.
Martini und Lentz, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLI und XLIII.
Meyer, Fr., Berliner klin. Wochenschr. 1902.
Metschnikoff, E., Ann. de l'Inst. Pasteur 1891, pag. 473 u. 474, 1892, pag. 296, 1900 — L'immunité, Paris 1901.
Möller und Kayserling, Zeitschr. für Tuberkulose 1902.

Morello, C., Annali di Igiene sperimentale, Tome XIV.
Moser, P. und Pirquet, Cl. v., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIV.
Müller, P. Th., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIV. — Münchener med. Wochenschrift 1903. — Arch. für Hygiene, Bd. LI.
Neisser, M., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVI.
Neisser, M. und Friedemann, U., Münchener med. Wochenschr. 1904.
Neisser, M. und Lubowski, Centralbl. für Bakt., Bd. XXX.
Neisser, M. und Shiga, K., Deutsche med. Wochenschr. 1903.
Neufeld, F., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XL und XLIV.
Neumann, R. O., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLV.
Nicolas, J. und Lesieur, Ch., Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1901.
Nicolle, Ch., Ann. de l'Inst. Pasteur 1898.
Nicolle, Ch. und Trénel, M., Ann. de l'Inst. Pasteur 1902. — Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1900.
de Nobele, Ann. de la Soc. de Méd. de Gand 1899 und 1901.
Nocard, Maladies microbiennes. Paris 1903.
Obermayer und Pick, E. P., Wiener klin. Wochenschr. 1904.
Otto, Centralbl. für Bakt. 1903. Erste Abteilung. Original.
Paltauf, R., Wiener klin. Wochenschr. 1897. — Deutsche med. Wochenschr. 1903. — Kolle und Wassermanns Handbuch „Agglutination“. — Baumgartens Jahrbuch 1897.
Paltauf, R. und Eiselsberg, A. v., Fortschritte der Medizin 1886.
Passini, Fr., Münchener med. Wochenschr. 1904.
Pauli, W., Pflügers Archiv, Bd. LXXVIII. — Vortrag, gehalten in der Gesellschaft der Ärzte zu Wien 1905.
Pauli und Rona, Hofmeisters Beiträge, Bd. II.
Pfaundler, M., Centralbl. für Bakt. 1898. — Münchener med. Wochenschr. 1899.
Pfeiffer, R., Zeitschr. für Hygiene, Bd. X, XVIII und XIX. — Deutsche med. Wochenschr. 1894, Nr. 48 und 1896. — Referat auf dem XVI. Internationalen Kongreß in Brüssel 1903.
Pfeiffer, R. und Friedberger, Berliner klin. Wochenschr. 1902.
Pfeiffer, R. und Kolle, Deutsche med. Wochenschr. 1896. — Centralbl. für Bakt. 1896, Bd. XX.
Pfeiffer, R. und Marx, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXVII.
Pfeiffer, R. und Proskauer, Centralbl. für Bakt. 1896.
Pfeiffer und Vagedes, Centralbl. für Bakt. 1896, Bd. XIX.
Pick, E. P., Hofmeisters Beiträge 1901 u. 1902.
Porcile, V., Zeitschr. für Hygiene, Bd. L.
Porges, O., Zeitschr. für experim. Pathol. und Therapie, Bd. I. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIX und XL. — Wiener klin. Wochenschr. 1905.
Porges, O. und Prantschoff, A., Centralbl. für Bakt., Bd. XLI.
Posselt, A. und Sagasser, R. v., Wiener klin. Wochenschr. 1903.
Prausnitz, C., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLIII.
Pröscher, F., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXI und XXXIV. — Deutsche med. Wochenschr. 1903.
Radziewsky, Centralbl. für Bakt., Bd. XXVI. — Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXIV.
Rath, Centralbl. für Bakt., Bd. XXV.
Rehns, J., Soc. de biol. 1900.
Remlinger, Ann. de l'Inst. Pasteur 1899.
Richardson, Centralbl. für Bakt., Bd. XXI.
Rodet, M. A., Journal de phys. et path. gener. 1901. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVII. — Soc. de Biol. 1902.
Romberg, Deutsche med. Wochenschr. 1901. — Münchener med. Wochenschr. 1902.
de Rossi-Gino, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVI und XL.
Rothberger, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXIV. — Centralbl. für Bakt., Bd. XL.
Ruppel, Deutsche med. Wochenschr. 1906.
Sachs, H., Centralbl. für Bakt., Bd. XXX.
Salge und Hasenknopf, Münchener med. Wochenschr. 1902.
Saquepée, E., Ann. de l'Inst. Pasteur 1901 und 1906.
Sauerbeck, Ernst, Lubarsch-Ostertag, X. Jahrg. 1906 (Literatur).
Scheller, R., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVI und XXXVIII.
Schmidt, R., Wiener klin. Wochenschr. 1903.
Schnürer, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIX.
Schottmüller, Deutsche med. Wochenschr. 1900 und 1904. — Zeitschr. für Hyg., Bd. XXXVI. — Münchener med. Wochenschr. 1900.
Schuhmacher, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXVII.

Schwoner, J., Wiener klin. Wochenschr. 1902.
Shibayama, G., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII und XLII.
Shiga, Centralbl. für Bakt., Bd. XXIII und XXIV. — Zeitschr. für Hygiene 1902. Berliner klin. Wochenschr. 1904.
Sicard, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1899.
Smidt, Henry, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII.
Smith, Th., Centralbl. für Bakt., Bd. XXV.
Sorgente, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIX.
Stäubli, C., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVI.
Steinberg, Münchener med. Wochenschr. 1904.
Stern, Berliner klin. Wochenschr. 1897 und 1903. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXIII.
Stern, R. und Korte, W., Deutsche med. Wochenschr. 1904. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXIII.
Sternberg, C., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XXXIV.
Streit, H., Centralbl. für Bakt., Bd. XL.
Strong, Bull. John Hopkins Hosp. 1902.
Thellung, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXII.
Totsuka, K., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLV.
Trautmann, Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLV. — Centralbl. für Bakt., Bd. XLI.
Trommsdorff, R., Münchener med. Wochenschr. 1903. — Arch. für Hygiene, Bd. LV.
Trumpp, Arch. für Hygiene 1898, Bd. XXXIII.
Vannod, Deutsche med. Wochenschr. 1906.
van de Velde, Bull. de l'Académie Belgique 1897. — Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1897. — Centralbl. für Bakt., Bd. XXIII. — Arch. de méd. exper. 1897.
Verney, L., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXII.
Volk, R. und Waele, H. de, Wiener klin. Wochenschr. 1902.
de Waele und Sugg, Arch. internat. de pharmacodyn. et de ther. 1903.
Wassermann, A., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLII. — Festschrift zu Ehren Kochs. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIV.
Wassermann, A. und Citron, J., Zeitschr. für Hygiene, Bd. L.
Weichselbaum, A., Handb. der pathogenen Mikroorganismen.
Weil, E., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVI und XXXVII. — Arch. für Hygiene, Bd. LIII.
Widal, Soc. med. des hop., 26. VI. 1896. — Soc. biol., Paris 1897. — Sém. med. 1896.
Widal und Nobécourt, Soc. de biol. 1897.
Widal, M. F. und Sicard, M. A., Ann. Pasteur 1897, Nr. 5. — Soc. med. des hopit. 1896. — Bull. de l'Acad. de méd. 1896. — Soc. de Biol. 1. VIII 1897.
Winterberg, G., Zeitschr. für Hygiene 1899, Bd. XXXII.
Wirgin, Germund, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII.
Wladimiroff, Petersburger med. Wochenschr. 1900. — Kolle-Wassermann, Handb.
Wolff, A., Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIII.
Wright, The Lancet 1901.
Zangger, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIV.
Zelensky, Th., Wiener klin. Wochenschr. 1904.
Zupnik, L., Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLIX und LII. — Berliner klin. Wochenschrift 1906.
Zupnik, L. und Posner, Prager med. Wochenschr 1903.

XXXI.

Technik und Methodik der klinischen Serodiagnostik mittels Agglutination.

Von

Dr. B. Kreissl

in Wien.

Einleitung.

Seit WIDAL in dem Artikel „Sérodiagnostic de la fièvre typhoid“ auf die klinische Verwertbarkeit des GRUBER-DURHAMschen Phänomens hingewiesen hatte, hat sich diese Reaktion eine dauernde Position in den klinisch-diagnostischen Behelfen nicht nur bei Typhus abdominalis, sondern auch bei einer Reihe anderer Infektionskrankheiten erworben. Die Einfachheit der Methode und die wesentliche Unterstützung für die Diagnose, die durch die Probe geboten wird, macht sie zu einem Hilfsmittel, das der Kliniker in vielen Fällen nicht mehr entbehren kann. Aber nicht nur das; gerade beim Typhus abdominalis hat die Reaktion durch ihre Beweiskraft neue Bilder kennen gelehrt, Fälle, die früher unter dem Namen gastrisches Fieber, Magendarmkatarrh geführt wurden, und die gerade durch ihren kurzen günstigen Verlauf bei gleicher Infektiosität der Weiterverbreitung der Krankheit Vorschub leisten. Die Reaktion fordert, wenn auch an sich technisch leicht ausführbar, eine sorgfältige Versuchsanordnung, genaue Beobachtung und eingehende Kenntnis der Fehlerquellen.

In einem allgemeinen Teil sollen alle Akte bei Anstellung der Reaktion, ferner die Fehlerquellen und ihre Vermeidung, in einem speziellen die Technik und die Erfahrungen bei den einzelnen Infektionskrankheiten besprochen werden.

Allgemeiner Teil.

Blutentnahme.

Die Reaktion wird zumeist mit dem Blutserum des Patienten ausgeführt. Von der Methode, natives Blut zu benutzen ist abzuraten. Denn die Reaktion wird, falls sie makroskopisch gemacht wird, unsicher, indem sich Häufchen bilden, und auch bei der mikroskopischen Unter-

suchung wird ein positiver Ausfall teils verdeckt, teils vorgetäuscht. Die Methode, getrocknetes Blut zu verwenden, sei nur kurz erwähnt; sie ist verlassen, seitdem das quantitative Vorgehen bei der WIDALschen Reaktion in seiner Bedeutung erkannt ist.

Zur Gewinnung der nötigen Blutmenge genügt es, mit einem gedeckten Messerchen, wie man es auch sonst bei Blutuntersuchungen benutzt, einen kleinen Einstich in das Ohrläppchen oder in die Fingerbeere zu machen. JAKSCH, FICKER entnehmen das Blut mittels Schröpfkopf, CONRADI benutzt eine Lanzette mit einer 1 cm breiten Messerklinge, deren Vorderteil abschraubbar ist. Die Klinge ist verstellbar. SPILKA sticht mit einer Lanzette in den passiv hyperämisierten Finger, CLAMANN macht einen kleinen Einschnitt in den Vorderarm und saugt mittels Pravazscher Spritze auf, CZAPLEWSKI benutzt ein kleines Messer mit Platinirridiumspitze (F. & M. Lautenschläger, Berlin). Andere machen die Venaepunktion in der Ellbogenbeuge. Tatsächlich ist dieser Eingriff sehr einfach und schmerzlos. Es ist dazu kein anderes Instrument nötig als eine nicht zu enge Pravazsche Kanüle. Man erfaßt nach erfolgter Desinfektion den Oberarm des Patienten mit der linken Hand, bringt so, indem man gleichzeitig den Arm fixiert, die Venen zum Anschwellen und sticht die Nadel in die gestaute Vene der Ellbogenbeuge parallel zu ihrem Verlauf ein. Ein einfaches Heftpflaster deckt die kleine Wunde. Die Blutung steht sofort. Die von verschiedenen Autoren empfohlenen gebogenen Nadeln sind empfehlenswert, aber durchaus nicht notwendig.

Das Blut wird am besten in einer kleinen Eprouvette aufgefangen, eventuell bei tropfenweisem Aussickern mittels Pipette in das Gefäß übertragen. FISCHER benutzt eine Pipette mit einem Draht, der, vorn mit Watte umwickelt, wie ein Spritzenstempel wirkt.

Nach Gerinnung des Blutes wird mittels ausgeglühter Öse der Blutkuchen vom Glase abgelöst, hierauf zentrifugiert und das Serum mittels Kapillaren entnommen. BLUM entnimmt aus der Vorderarmvene mit Pravazscher Spritze ca. 1 ccm Blut, entfernt die Nadel und verschließt die Öffnung mit steriler Watte. Hierauf wird der Stempelknopf abgeschraubt und die Spritze, mit dem ausgezogenen Stempel nach unten, senkrecht aufgestellt. Nach Abschrauben des zur Aufnahme der Nadel bestimmten konischen Ansatzes wird abpipettiert. Die Spritze darf nicht ganz angesogen und nicht geschüttelt werden. Durch diese recht praktische Methode entfällt das Loslösen des Koagulums und das Zentrifugieren. MARTINEK verwendet zum Auffangen des Blutes Spitzgläschen. PRÖSCHER benutzt U-förmig gebogene Kapillaren. Die Röhrchen werden mit Siegellack verschlossen und sind so transportfähig. Vor der Untersuchung wird zentrifugiert, in jedem Schenkel an der Grenze zwischen Serum und Blutkuchen abgebrochen, das Serum hierauf ausgeblasen. Doch hat diese Methode, wie GOSSNER und SCHOTTELIUS hervorheben, den Nachteil, daß sich die Röhrchen oft verstopfen. SCHOTTELIUS benutzt eine kleine Eprouvette, die mit einem Gummistopfen verschlossen werden kann. Das RÖHRCHEN ist 7 cm lang und hat 1,2 cm im Durchmesser. 3 cm von der Öffnung verjüngt es sich auf 0,6 cm. Durch den Gummistopfen ist eine Insektennadel durchgesteckt, die an ihrem Ende einen Schwammzylinder von 0,8 cm Durchmesser trägt. Nach Aufsaugen des Blutes wird die Öffnung mit Paraffin gedichtet. So erhält man leicht 10—15 Tropfen Serum. Der Apparat verhindert das Austrocknen des Blutes, ein Fehler, den man z. B. bei Verwendung von Fließpapier empfindet (Fa. Katsch, München). CZAPLEWSKY benutzt ein 5,5 cm langes, oben 0,8 cm im

Durchmesser haltendes, 3 cm von der Mündung auf 0,4 cm verjüngtes Röhrchen. Statt des Schwammes befestigt er einen Wattepfropf (Th. Schroetter, Leipzig-Konnewitz).

Testobjekt (Kultur).

Weitaus der wichtigste und für den Ausfall der Reaktion bedeutungsvollste Faktor liegt in der Wahl und Bereitung des Testobjektes. Ihm gebührt besondere Beachtung, denn hier liegen die meisten Fehlerquellen. Die Schwierigkeiten häufen sich, wenn es sich um solche Bakterien handelt, die von Natur aus Neigung zur Haufenbildung haben. Man kann lebende oder abgetötete Bakterien verwenden. Nicht jeder Stamm eignet sich als Testobjekt, Lipschütz, Müller u. a. haben gezeigt, daß es Stämme mit größerer und geringerer Agglutinabilität gibt. Zu klinischen Zwecken sind nicht immer die bestagglutinabeln Stämme die besten Testobjekte. Da nämlich gewisse Bakterien auch durch normale Sera bis zu einer gewissen, oft nicht sehr geringen Höhe agglutiniert werden, könnte sich die Fehlerquelle ergeben, daß positiver Ausfall durch die zu gute Agglutinabilität des Testobjektes vorgetäuscht würde. Andererseits kann die Wahl eines schwer oder nicht agglutinablen Stammes zum negativen Ausfall der Reaktion führen (s. Volk, dieses Handbuch). Endlich können Stämme, die sogenannte Spontanagglutination zeigen (und dieses Phänomen kann bei allen Bakterien vorkommen), nicht als Testobjekte verwendet werden. Ein anderes Moment, das berücksichtigt werden muß, liegt darin, ob ein beliebiger, entsprechend agglutinabler Stamm einer Bakterienart benutzt werden kann oder ein ganz bestimmter Stamm. Es hat sich gezeigt, daß ein Immunserum, gewonnen mit einem Stamm einer Bakterienart, bisweilen nicht alle Stämme derselben Bakterienart agglutiniert. Es werden bei bestimmten Infektionen, bei denen solche Verhältnisse bekannt sind, die Bakterien, die aus dem Kranken selbst gezüchtet worden sind, benutzt werden müssen. Müller hat auf das verschiedene Verhalten verschiedener (Typhus-)Stämme gegenüber demselben Serum 197 Proben angestellt. In 88 fielen die Werte verschieden aus. Es kommt vor, daß ein Stamm hoch, der andere weniger hoch oder gar nicht, daß beide gleich hoch, aber verschieden stark reagieren, endlich daß der eine Stamm eine Hemmungszone aufweist, der andere nicht.

Auch das Alter der Kultur ist zu berücksichtigen. Gewöhnlich wird eine 24stündige Agar- oder Bouillonkultur benutzt. Friedberger und Luerssen haben z. B. gezeigt, daß junge Cholerakulturen stärkere Spontanagglutination zeigen als ältere.

Ebenso ist das Kulturmedium von Bedeutung. So ist von gewissen Arten von Streptokokken bekannt, daß sie in Bouillon in langen Ketten, auf Agar in kurzen wachsen, eine Tatsache, die bei Herstellung eines Testobjektes für diese unbeweglichen Bakterien wesentlich in Betracht kommt. Auch hat man gezeigt, daß Zusatz von bestimmten chemischen Agentien zum Nährboden eine Steigerung, resp. eine Herabsetzung der Agglutinabilität herbeiführen kann. So hat z. B. der Zusatz von Asparagin zum Agar Spontanagglutination der auf ihm wachsenden Typhusbazillen zur Folge.

Auch die Dichte der verwendeten Aufschwemmung, d. h. der Menge der Bakterien ist Bedeutung beizumessen, worauf zuerst Eisenberg und Volk aufmerksam gemacht haben (s. Volk, d. Handbuch).

Bordet, Widal, Förster, Pröscher u. a. haben gezeigt, daß auch abgetötete Bakterien zum Versuch verwendet werden können. Das Abtöten geschieht teils durch Hitze (Widal z. B. erhitzt Typhusbazillen durch $^{1}/_{2}$—$^{3}/_{4}$ Stunde auf 60°), teils durch Zusatz von chemischen Agentien, z. B. Toluol, Formol, Karbolsäure. Das Desinfiziens wird während oder nach dem Wachstum der Bakterien zugesetzt. Die Resultate mit abgetöteten Bakterien stimmen im allgemeinen mit denen bei Verwendung lebender überein. Gewisse Vorteile bringt das Arbeiten mit abgetöteten Bakterien (wenn zunächst von der praktischen Seite der Frage abgesehen wird) insofern, als stets dieselbe Kultur desselben Stammes in einer Reihe von Proben benutzt wird und dadurch die Möglichkeit des Vergleiches und der Konstanz der Befunde gegeben wird. Diese Tatsachen, die bereits in der Literatur festgelegt waren, legten den Gedanken nahe, abgetötete Kulturen als Reagens für klinisch-serodiagnostische Zwecke zu verwerten. Im Fickerschen Typhusdiagnostikum hat sich die Verwendung abgetöteter Kulturen sehr gut bewährt.

Die Kulturen, die auf Agar gewachsen sind, müssen, um für die Reaktion verwertbar zu sein, erst aufgeschwemmt werden. Die Aufschwemmung erfolgt entweder mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit Bouillon in der Weise, daß entweder in eine bestimmte Menge Flüssigkeit die Bakterien ösenweise eingetragen werden oder so, daß zur ganzen Kultur eine bestimmte Menge Flüssigkeit zugesetzt wird (siehe Eisenberg und Volk). Die Verteilung in der Flüssigkeit geschieht so, daß an der Wand des Glases, in dem die Suspension erfolgt, die Kultur verrieben und dann erst mit der Flüssigkeit abgespült wird, resp. indem man zu den auf schiefem Agar gezüchteten Bakterien 10—15 ccm Kochsalzlösung hinzufügt und dann schüttelt.

Diese letztere Methode ist nur dann möglich, wenn es sich um leicht aufschwemmbare Bakterien handelt, die sich nicht etwa in Klumpen oder Bröckeln ablösen. Denn die gleichmäßige Suspension ohne Bodensatz und ohne Klumpenbildung ist für die makroskopische und mikroskopische Reaktion von großer Wichtigkeit. Große Schwierigkeiten ergeben sich zur Erreichung dieses Zieles dort, wo es sich um Bakterien handelt, die von Haus aus in Haufen- oder Kettenform vorkommen oder sich nur schwer suspendieren lassen. Verschiedene Methoden suchen diesen Hindernissen abzuhelfen. So hat Pirquet bei Streptokokken durch Durchblasen von Luft während oder nach dem Wachstum und durch Verwendung von Streptokokken, die aus dem Herzblut von Scharlachleichen gezüchtet wurden (diese Streptokokken wachsen in kurzen Ketten), homogene Kulturen herzustellen versucht. Detot erzielte durch nach wenigen Stunden wiederholte Überimpfungen leicht suspendierbare Streptokokken. Hasenknopf und Salger verrieben die Kulturen im Achatmörser. Über andere Methoden, besonders über die von Arloing bei Tuberkulose, wird im speziellen Teil näher die Rede sein.

Serumauswertung und Anstellung der Reaktion.

Ein wichtiges Prinzip, auf dem die Serodiagnostik beruht, liegt in der Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse, d. h. in der Verwendung verdünnter Sera. Das Serum wird verdünnt, ehe es mit dem Testobjekt zusammengebracht wird.

Die Methoden der Mischung und Verdünnung des Serums sind mannigfaltig.

Widal ging folgendermaßen vor. 1 Tropfen Serum wird mit 9, 19, 29 Tropfen steriler Bouillon verdünnt. So erhält man Verdünnungen von 1:10, 20, 30. Zusatz der entsprechenden Mengen von Typhusbouillonkultur ergibt weitere Verdünnungen von 1:100, 200 usw. Pröscher nimmt eine Stammlösung von 2 Tropfen Serum und fügt 8 Tropfen Wasser hinzu (1:5). 1 Tropfen dieser Mischung wird mit 6, 8, 10, 16 Tropfen der Typhusbouillonkultur zusammengebracht. Als Gefäße benutzt er Uhrschälchen, Schnürer empfiehlt Blockschälchen. Die Methode von Aaser besteht in folgendem: 4 ccm Testkultur (abgetöteter Typhusbazillen) werden in Röhrchen von 14 cm Länge und 8 mm Breite eingebracht. Das Serum wird auf ein sterilisiertes Uhrschälchen gebracht und mittels Tropfenzählers in die Röhrchen gefüllt. Zusatz von 1 Tropfen entspricht einer Verdünnung 1:100, von 2 Tropfen 1:50, von 4 1:25, von 5 1:20, von 10 1:10. Jörgensen setzt in einem Röhrchen (11 cm × 70 mm) zu 1,5 ccm Kultur Serum mittels einer 1 ccm haltenden Pipette zu, die $^1/_{100}$ Einteilung trägt. Die Kollesche Methode besteht darin, daß 1 Normalöse einer 20stündigen Agarkultur in 1 ccm der betreffenden Serumverdünnung verrieben wird. Spilka stellt sich 15 ccm einer 0,7 %igen sterilisierten Kochsalzlösung her und gibt in Gläschen Nr. 1 0,9 ccm, Nr. 2 0,9 ccm, Nr. 3 0,8 ccm, Nr. 4 1 ccm der Lösung. Ohne abzuspülen wird das Fickersche Typhusdiagnostikum pipettiert, die Pipette in der übrigen Kochsalzlösung abgespült und ohne weitere Reinigung zum Aufsaugen von 0,1 ccm Serum benutzt. Das Serum wird in Gläschen 1 gefüllt, durch 2—3maliges Aufsaugen gemischt, hierauf 0,1 ccm des Gläschens Nr. 1 in Gläschen Nr. 3 abgefüllt usw. Statt der Pipette kann man auch Tropfenzähler oder Kapillaren benutzen. Auf diese Art kommt man mit 0,25 ccm Blut aus. Kirstein nimmt die Probe in unten konisch ausgezogenen Glasröhrchen vor, die 8,5 cm lang sind. Der ausgezogene Teil ist 3,5 cm lang und hat 8 mm im Durchmesser. Man stellt die entsprechende Serumverdünnung her und bringt je 1 ccm in das Röhrchen. Hierauf fügt man 1 Normalöse (2 mg) der Agarkultur hinzu und verreibt diese Menge an der Innenseite des Röhrchens. Die Luftblase an der Spitze des Röhrchens wird mit einem Platindraht entfernt. Die Methode Bensaudes unterscheidet sich dadurch, daß erst nach hergestellter Verdünnung des Serums mit Bouillon die Impfung (mit Typhusbazillen) erfolgt. Stern benutzt den Gowersschen Hämoglobinometer. Abgemessene Mengen der Typhuskultur werden mit dem in das $^1/_{50}$ ccm haltende Instrument eingesogenen Blut vermischt. Rostoski verwendet den Melangeur von Thoma-Zeiss. Er geht so vor, daß er zunächst Blut bis zur Marke 0,5, hierauf destilliertes Wasser bis 11 aufsaugt (1:20).

Kafka beschreibt die auf der Klinik Jaksch übliche Methode: Zu $^1/_2$ ccm der Kultur (oder des Typhusdiagnostikums) wird 1 Tropfen Serum mittels „Serumpipette" zugefügt. Diese ist eine 5 mm im Durchmesser haltende Glasröhre, die in eine kapillare Spitze endigt und so geeicht ist, daß $^1/_2$ ccm 40 Tropfen enthält; es entsteht also eine Verdünnung 1:40; 1 ccm Testobjekt + 1 Tropfen aus der Pipette entspricht einer 80fachen Verdünnung usw. Von Pfaundler wurde ein automatischer Serummischer angegeben.

Für die mikroskopische Prüfung hat sich folgende Methode gut bewährt. In einer kleinen Eprouvette wird eine Verdünnung des Serums auf das 10-, 20-, 30fache durch Zusatz von Bouillon hergestellt. Auf ein Deckglas wird ein Öse des z. B. 10fach verdünnten Serums

gebracht. Knapp daneben ein gleich großer Tropfen der in Bouillon aufgeschwemmten oder gezüchteten Typhusbazillen. Hierauf mischt man beide Tropfen (20fache Verdünnung).

Die Reaktion wird makroskopisch oder mikroskopisch ausgeführt. Zur Anstellung der mikroskopischen Probe werden hohle Objektträger benutzt. Man bringt auf ein Deckglas je einen Tropfen des verdünnten Serums und des Testobjektes, mischt und legt das Deckglas auf den mit Vaselin bestrichenen Objektträger.

Die makroskopische Probe ist ebenso eindeutig wie die mikroskopische. Die Erfahrung des Untersuchenden kommt hier wesentlich in Betracht. Während Fichtner die makroskopische Probe für genügend erachtet, ja vorzieht, empfiehlt Rolly die mikroskopische als die genauere, Korte und Steinberg erklären die letztere Untersuchungsart namentlich in Fällen, in denen die Bestimmung des Grenzwertes in Betracht kommt, als die einzig mögliche. Immerhin steht fest, daß geringere Grade der Agglutination nur mikroskopisch zu erkennen sind. Daß auch auf diesem Wege, d. h. bei wahlloser Anwendung der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung Fehler entstehen können, lehrt ein Fall von Scheller, der bei makroskopischer Beobachtung ein negatives Resultat erhielt, bei der mikroskopischen jedoch ein positives noch in der Verdünnung 1:160. Im allgemeinen ergibt sich für die Praxis, daß dort, wo genügende Mengen von Serum zur Verfügung stehen, die makroskopische Probe angestellt wird.

Zu berücksichtigende Kautelen bei der Reaktion.

Im allgemeinen verläuft die Reaktion bei höherer Temperatur besser als bei Zimmertemperatur insofern, als sie rascher und intensiver vor sich geht. Weil hat nachgewiesen, und Sadler hat diese Angabe bestätigt, daß das Agglutinationstemperaturoptimum bei 50—55° C liegt und zwar nicht nur für B. typhi, sondern auch für Staphylokokken, Cholera und Tuberkulose. Andererseits aber haben die Beobachtungen, wie die von Scheller und Gähtgens gelehrt, wie vorsichtig man, wenigstens in klinisch-diagnostischer Beziehung, diese Tatsache verwerten kann. Ersterer nämlich fand, daß eine Probe nach 2stündigem Aufenthalt im Brutschrank negativ ausfiel, nach weiterer Beobachtung bei Zimmertemperatur jedoch positiv, und daß in einem anderen Fall bei Bruttemperatur sofort Agglutination eintrat, die bei weiterem Aufenthalt des Präparats im Brutschrank schwächer wurde, um bei Zimmertemperatur wieder zuzunehmen. Gähtgens beobachtete in einem Paratyphusfalle (B) positiven Ausfall bis zum Grenzwert 1:50, der bei Zimmertemperatur nach 24 Stunden auf 1:150 anstieg. Es ergibt sich aus solchen Beobachtungen im allgemeinen, daß zwar Temperaturen von 55° C das Optimum bieten, daß aber doch zu empfehlen ist, die Proben bei Zimmertemperatur noch stehen zu lassen und nach einiger Zeit zu kontrollieren.

Die Zeit, nach welcher die Reaktion beendigt erscheint, schwankt zwischen wenigen Minuten und vielen Stunden. Sie hängt ebenso sehr von der Art des Bakteriums, als von der Beschaffenheit des Serums ab. Die Art des Serums ist hierbei nicht nur in bezug auf die Höhe der Agglutination zu beachten. Denn Sera, die anfangs nur langsam und unvollständig agglutinieren, weisen manchmal nach genügend langer Zeit höhere Titres auf als solche, bei denen die Reaktion sofort eintritt. Es empfiehlt sich, auch negativ ausgefallene (Typhus-)Proben noch $^1/_2$ Tag bei Zimmertemperatur stehen zu lassen und zu beobachten. Besonders

bei Fällen, in denen es darauf ankommt, den oberen Grenzwert zu bestimmen, empfiehlt es sich, lange zu beobachten, da kurze Beobachtungszeit oft zu niedere Werte ergibt. Auch ist zu erwähnen, daß bei Verwendung abgetöteter (Typhus-)Bazillen die Reaktion $\frac{1}{4}$—$\frac{1}{2}$ Stunde später eintritt als bei Arbeiten mit lebenden Kulturen. Porcile hebt hervor, daß alle seine Proben bei weniger als 20—24 stündiger Beobachtungszeit unzuverlässige Resultate ergaben, Lion, daß bei Verwendung lebender Kulturen die Beobachtungszeit 3 Stunden betrug, und daß vor 1 Stunde ein Resultat nicht in Betracht kommt. Ficker empfiehlt eine 8 stündige Beobachtungsdauer, bei Tuberkulose nimmt die Reaktion 4—44 Stunden in Anspruch. Im Paltaufschen Institute werden die Typhusproben 2 Stunden im Brutofen gehalten, jede Stunde kontrolliert, hierauf noch 1 Stunde bei Zimmertemperatur beobachtet.

Beurteilung der Reaktion.

Wesentlich für die Beurteilung der mikroskopischen Reaktion ist es, die Frage zu beantworten, wann die Probe als positiv zu bezeichnen ist. Die Beobachtung erfolgt sofort und nach verschiedenen Zeiten. Man benutzt zunächst die schwache Vergrößerung bei enger Blende und künstlicher Beleuchtung und sucht den Rand des Objektträgers auf. Schon bei dieser Vergrößerung sieht man die Haufenbildung. Hierauf untersucht man noch mit stärkerer Vergrößerung, um Details festzustellen. Bei der makroskopischen Untersuchung bezeichnet man die Probe als positiv, wenn sie sich völlig klärt, so daß am Boden des Reagenzglases die in Haufen zusammengeballten Bakterien liegen, die darüberstehende Flüssigkeit durchsichtig und klar ist. Widal bezeichnet die mikroskopische Probe als terminal, wenn im Sehfeld noch Centres agglutinatifs vorhanden sind, d. h. einzelne aus 5—6 Bakterien bestehende Häufchen zu sehen sind. Es wird dann von einem positiven Befund gesprochen, wenn große und dichte Haufen zu beobachten und die noch einzeln stehenden Typhusbazillen unbeweweglich sind; als komplett wird die Agglutination bezeichnet, wenn alle Bakterien agglutiniert erscheinen. Doch sei hier erwähnt, daß der Begriff „komplette Agglutination“ nicht mit dem „hohe Agglutination“ zusammenfällt. Denn ein Serum, das z. B. bei einer Verdünnung 1:30 komplett agglutinierte, zeigte den Grenzwert 1:120; ein anderes, das positiven, aber nicht kompletten Befund ergab, hatte den Titer 300. (Es wurde derselbe Typhusstamm verwendet.)

Zupnik rechnet nach Einheiten und versteht unter einer solchen den Befund, daß bei einer Verdünnung 1:40 positive Reaktion in 8 Stunden eintritt. 5 Einheiten bedeuten also: Bei 8 stündigem Aufenthalt im Brutofen gibt eine Probe bei einer 200 fachen Serumverdünnung positiven Befund. Stern bezeichnet mit A_2 den Grenzwert. $300 > A_2 > 250$ bedeutet: Bei 250 facher Verdünnung bilden sich noch kleinste Häufchen, bei 300-facher nicht mehr. An dieser Stelle sei auf das eigentünliche Bild der Fadenreaktion hingewiesen, ein Phänomen, das sich bei Agglutination von B. typhi, coli, cholerae und rhinoscleromatis findet. Bei Berücksichtigung gewisser Kautelen (Verdünnung der Agarkultur) beobachtet man nach 24 Stunden ein Netzwerk, aus Fäden bestehend. Es können entweder isolierte, reichverzweigte, verschlungene Knäuel vorhanden sein, oder das ganze Gesichtsfeld ist von einem Netzwerk erfüllt. Pfaundler, der diese Erscheinung stets nur bei Fiebernden und bei Verwendung isohomologer Sera in Koli- und Proteusinfektionen beobachtet hatte, hielt

sie für spezifisch und dachte an eine diagnostische Verwertbarkeit. KRAUS, EISENBERG, TARCHETTI haben jedoch nachgewiesen, daß es sich um nichts anderes handelt als um das Auswachsen der agglutinierten Bakterien zu längeren Fäden, also nicht um etwas Spezifisches, sondern um eine mit der Agglutination zusammenhängende Erscheinung.

Fehlerquellen.

Eines der wichtigsten Versäumnisse ist das, nur 1 oder 2 Verdünnungen des Serums in Betracht zu ziehen. Bei der heutigen Kenntnis der Wirkung normaler Sera, sowie der Phänomene der Mitagglutination und Hemmung muß als Grundsatz aufgestellt werden, daß die obere Agglutinationsgrenze festgestellt werden soll. Nur aus diesen Zahlen ist ein Rückschluß auf Art und Charakter des Serums gestattet.

Weiterhin ist der Zeitpunkt der Krankheit zu berücksichtigen, wann die Probe angestellt wird. In gewissen Fällen tritt die Reaktion erst spät auf. So sind Fälle von Typhus bekannt. in denen erst in der Rekonvaleszenz ein positiver Befund erhalten wurde. Bei Streptokokkeninfektionen tritt die Serumreaktion oft erst in der 5.—6. Woche auf. SCHNÜRER empfiehlt die Probe bei Rotzinfektionen nach 6—8 Wochen zu wiederholen. Bei Typhusinfektionen können an jedem Krankheitstage, förmlich plötzlich, hohe Titers auftreten. So empfiehlt es sich, in Fällen, die als Typhus abdominalis klinisch imponieren, und bei denen die Reaktion negativ ausfällt, jede Woche die Reaktion zu wiederholen. Denn zu frühes Einstellen der Untersuchung könnte z. B. bei positivem bakteriologischen Befund zu dem Trugschlusse führen, es liege ein Typhusfall ohne Agglutinationsphänomen vor. Auch zu früh darf nicht untersucht werden. Bei Typhus abdominalis z. B. tritt die Reaktion nur selten vor Ablauf der 1. Woche auf. Wie sehr es auch sonst auf den Zeitpunkt der Untersuchung ankommt, zeigt ein Fall von HIRSCHBRUCH. Ein Typhusserum agglutinierte B. Eberth bis 1:50, Paratyphi A bis 1:200; 1 Woche später jedoch B. paratyphi A bis 1:200, B. typhi bis 1:1000. Kulturell wurde B. Eberth nachgewiesen.

Ferner ergibt sich eine Fehlerquelle daraus, daß auch normale Sera in höheren Verdünnungen bei manchen Bakterien Agglutination hervorrufen. So heben DETOT und BOURCART hervor, daß normales Serum Streptokokken agglutiniert, der Dysenteriebazillus, Stamm Flexner, wird vom bis zum 30fach verdünnten normalen Serum beeinflußt, abgetötete Rotzbazillen bis zur Verdünnung 1:400. Ähnliches ist vom B. coli, Melittense, von dem M. staphylococcus bekannt.

Ferner ergeben sich Fehlerquellen dadurch, daß durch konstitutionelle und andere Prozesse im Organismus das Serum abweichend von der Norm reagiert. So ist es bekannt, daß z. B. Chlorose dem Serum agglutinierende Eigenschaften gegenüber Typhusbazillen verleiht. LÜDKE fand bei 8 Chlorotischen 4mal positiven Befund bis zur Verdünnung 1:60, 2mal bis 1:40 (Typhusbazillen). Kreosotmedikation ruft bei normalen Seris agglutinierende Eigenschaften gegenüber Tuberkelbazillen hervor. EBSTEIN behauptet, er habe bei Nichttyphösen nach vorhergegangener Brommedikation positive WIDALsche Reaktion beobachtet. Das Blut Ikterischer zeigt Agglutination gegenüber Typhusbazillen, eine Erscheinung allerdings, deren Ursache in anderen Momenten zu liegen scheint.

Auf der anderen Seite gibt es Individuen, die, wie es scheint, keine Agglutinine erzeugen. So berichtet Pane über einen Fall, bei dem Typhusbazillen im Blut nachweisbar waren und die Widalsche Reaktion im ganzen Verlauf negativ blieb, Stern einen anderen, wo bei sicherer Infektion mit B. Eberth der Paratyphusstamm A bis zur 250-fachen Verdünnung agglutiniert wurde, B. typhi jedoch und Paratyphusstamm B. nicht. Mayr beschreibt negativen Ausfall bei sicherem Typhus, Lenz einen andern, bei dem erst am 28. Tage, knapp nach einer Darmblutung die Reaktion positiv wurde. Auch wir haben in der letzten Zeit 2 ähnliche Fälle beobachtet. Die Reaktion war 3 Wochen hindurch negativ. Unmittelbar nach einer Darmblutung stieg die Reaktion bis zum Grenzwert 1:360, resp. 1:200. Ramon y Cayal beschreibt fehlende Reaktion bei Maltafieber. Daß Mischinfektionen (z. B. Staphylokokkentyphusinfektionen) eine Verzögerung resp. einen negativen Ausfall bewirken können, beschreibt Kayser.

Bisweilen bewahrt sich das Serum nach einmal überstandener Infektion noch jahrelang agglutinierende Eigenschaften. So wurde nach 10, ja 27 Jahren noch positiver Ausfall gegenüber Typhusbazillen beobachtet. Eine andere Fehlerquelle liegt in der Mitagglutination. Diese Erscheinung besteht darin, daß das Serum nicht nur auf das infizierende Bakterium, sondern auch auf artverwandte, ja bisweilen auch auf in der Art weit entfernte Mikroorganismen Agglutination aufweist. Um die Häufigkeit dieses Phänomens zu illustrieren, sei erwähnt, daß nach Brion und Kayser das Serum Typhuskranker in ca. 10% B. paratyphi A, in 8% B. paratyphi B mitagglutiniert, nach Erne bei 14 Fällen von Infektion mit B. paratyphi B 5mal Mitagglutination für B. Eberth auftrat, ja Clemens kommt zur Ansicht, daß das Serum von Paratyphuskranken stets B. typhi mitagglutiniere. Drigalsky beschreibt 24 sichere Typhusfälle, in denen B. paratyphi B ebenso rasch und stark wie der Infektionserreger agglutiniert wurde. Ebenso ist es bekannt, daß das Serum von mit dem Flexnerschen Dysenteriestamm Infizierten Mitagglutination auf den Stamm Kruse zeigt und umgekehrt. Manteufel hat durch Injektion von Proteuskulturen Agglutinine auf Typhusbazillen bis zur Verdünnung 1:640 erzeugt. Labovwsky und Steinberg haben darauf hingewiesen, daß Staphylokokken- und Streptokokkeninfektionen Agglutinationsfähigkeit des Serums auf Typhusbazillen bis zu einer 80-fachen Verdünnung hervorrufen können. Arloing und Courmont beobachteten, daß Typhusserum häufig Tuberkelbazillen agglutiniere. Bei der speziellen Besprechung des Typhus abdominalis werden die hierher gehörigen Fälle von positiver Widalscher Reaktion bei Endokarditis, Influenza, Miliartuberkulose, Ikterus besprochen werden.

In Berücksichtigung der Mitagglutination ist die Feststellung des obersten Titers, namentlich in zweifelhaften Fällen notwendig. Denn wenn auch ein Serum manchmal verwandte Stämme höher agglutiniert als den gerade nachweisbaren Erreger, so ist doch — Mischinfektionen ausgeschlossen — die Regel, das der infizierende Organismus höher agglutinert wird. Die häufigsten Ausnahmen finden sich am Beginn der Erkrankung und in der Rekonvaleszenz. Doch möge hier eine Bemerkung Zupniks Platz finden, der in 13 Fällen von Typhus mit Mitagglutination auf B. Paratyphi 3 fand, in denen das Serum auf B. Paratyphi A und B höher agglutinierte als auf B. Eberth. Auch beobachtete er Fälle von Paratyphus (B), in denen B. typhi höher agglutiniert wurde als der Infektionskeim.

Ein auffallendes und namentlich bei Grenzwertbestimmungen wohl zu berücksichtigendes Phänomen ist die Hemmung. Eisenberg und Volk haben gezeigt, daß bei alten Immunseris durch hohe Konzentrationen Agglutinationshemmungen auftreten, d. h. ein Serum bei geringerer Verdünnung keine, bei höherer deutliche Agglutination bewirkte. Volk und de Waele haben dieses Phänomen auch bei frischen Immunseris beobachten können. Bei Verwendung von Bouillonkulturen kommt Hemmung öfters vor als bei Verwendung von Kochsalzlösung und Peptonkulturen. Dante de Blasi beobachtete zuerst das Phänomen bei einem Typhuskranken. In einem Fall reagierte das Serum bei einer Verdünnung 1:10 fraglich, bei 1:25 und 1:50 deutlich, in einem anderen, den Ceritto mitteilt, bei 1:50 und 1:100 negativ, bei 1:250 und 1:500 positiv. Ein anderes Beispiel, das gleichzeitig den Einfluß illustriert, ob man makroskopisch oder mikroskopisch untersucht, führen Korte und Steinberg an.

Verdünnung	Bac. typhi		Bac. paratyphi B	
	makroskopisch	mikroskopisch	makroskopisch	mikroskopisch
1: 10	—	—	+	+
1: 20	—	Spur	+	+
1: 40	—	„	+	+
1: 80	—	+	+	+
1: 160	+	+	—	+
1: 320	+	+	—	—
1: 640	+	+	—	—
1:1280	—	+	—	—
1:2560	—	schwach +	—	—
1:5120	—	—	—	—

Bei B. typhi bestand Hemmung, bei B. paratyphi B nicht. Hätte man also nur makroskopisch und nur bei einer Verdünnung 1:80 untersucht, so hätte scheinbar das Serum B. paratyphi höher agglutiniert.

Es ist bereits davon gesprochen worden, daß Verwendung von spontan agglutinierenden, zu leicht oder zu schwer agglutinierenden Stämmen den richtigen Ausfall der Reaktion bedrohen.

Ergänzende diagnostische Methoden.

Um alle die angeführten Fehlerquellen zu vermeiden, ist eine Reihe von Kautelen zu beobachten, die sich zum größten Teil aus der Art der Fehlerquellen ergeben. Außerdem aber lassen sich noch zur Korrektur und zur Ergänzung der Gruber-Widalschen Reaktion eine Reihe anderer Methoden heranziehen: der Nachweis der Bakterizidie, der Pfeiffersche, der Castellanische Versuch, die bakteriologische Blutuntersuchung. Bestimmung desopsonischen Index.

Schlußfolgerungen in bezug auf die klinische Verwertbarkeit der Reaktion.

Aus dem Vorhergehenden ergibt sich für die praktische klinische Verwertbarkeit der Reaktion der Schluß, daß das Phänomen ein Symptom von weittragender diagnostischer Bedeutung darstellt. Besonders muß hervorgehoben werden, daß es nicht genügt, aus der einfachen Konstatierung des Agglutinationsphänomens bei einer bestimmten Verdünnung bindende Schlußfolgerungen zu machen. In allen irgendwie

zweifelhaften Fällen ist die Bestimmung der Agglutinationshöhe unbedingte Notwendigkeit. Aber auch bei Berücksichtigung aller Kautelen kommt der Reaktion nicht die Bedeutung eines zwingenden Beweises zu. In manchen Fällen ermöglicht erst, wie gesagt, die Heranziehung der bakteriologischen Blutuntersuchung, des Pfeifferschen, des Castellanischen Versuches usw. die klinische Diagnose.

Spezieller Teil.

Typhus abdominalis.

Die Gruber-Widalsche Reaktion hat gerade beim Typhus abdominalis ihre weitaus größte Anwendung und ihr besonderes Studium gefunden. Bezüglich der Technik sind eine Reihe von Details hervorzuheben, insbesondere diejenigen, die sich auf die Herstellung abgetöteter Kulturen als Testobjekt beziehen. Gewöhnlich werden 24stündige Bouillonkulturen oder Agarkulturen, die in Kochsalzlösung suspendiert sind, verwendet. P. Aaser stellt sich eine Typhuskultur in Peptonzuckerwasser her (10 g Pepton Witte, 10 g Rohrzucker, 5 g Kochsalz, 1 l Wasser), alkalisiert, erhitzt im Autoklaven, setzt 1 $^0/_0$ Dezimalsalzsäure zu und sterilisiert mit 1 $^0/_0$ Formalin oder Toluol. Das Testobjekt hält sich 2—3 Monate. Er beobachtet 24—48 Stunden bei Zimmertemperatur und benutzt zur makroskopischen Probe 14 cm lange, 8 mm breite Reagenzgläser. In jedes füllt er 4 ccm der Testflüssigkeit und setzt hierauf 1 Tropfen (Verdünnung 1:100), resp. 2 Tropfen (1:50) Serum hinzu. Widal stellte abgetötete Kulturen her, indem er entweder durch $^1/_2$—$^3/_4$ Stunde auf 60^0 erhitzte oder Formol im Verhältnis 1:150 zusetzte. Pröscher verwendet eine 1tägige Typhusbazillenkultur und setzt zu 100 Teilen 1 Teil 40 $^0/_0$iges Formalin zu, hält 2 Tage im Brutschrank bei 37^0, gießt vom Bodensatz ab und verwahrt das Testobjekt im Eisschrank. Rolly impft große Bouillon-Erlenmayerkolben mit Typhusbazillen und schüttelt 2—3mal täglich um. Er läßt die Proben 5 Tage im Brutschrank und setzt dann Toluol im Überschuß zu, so daß eine 2—3 mm breite Schicht über der Flüssigkeit steht. Hierauf wird der Kolben noch 5—10 Tage im Brutschrank gehalten, 2—3mal täglich umgeschüttelt, mit einem losen Wattepfropf geschlossen und 2—4 Wochen ruhig stehen gelassen. Häufchen, die sich noch bilden, sinken zu Boden. So ist man in der Lage, die toten Typhusbazillen schwebend zu erhalten. Die Agglutination tritt bei Verwendung dieses Testobjektes $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde später ein als bei Verwendung lebender Bakterien. Bei makroskopischer Probe ist die Untersuchung in 12, bei mikroskopischer in $^1/_4$—2 Stunden vollendet. Barlocco züchtet die Typhusbazillen auf Agar und säet sie in eine Flüssigkeit, die aus 100 g Wasser, 2 g Pepton, und 60 cg Kochsalz besteht. Dann sterilisiert er durch Zusatz von 1 $^0/_0$ Formollösung.

Welchen Einfluß der Zusatz von Formol auf die Agglutinabilität der Typhusbazillen hat, zeigen die Untersuchungen von de Luchi. Er verwendete eine Typhuskultur, der er auf je 7,5 ccm 1 Tropfen des Handelsformol zusetzte. Die Typhusbazillen verloren ihre Bewegungsfähigkeit nicht völlig. Werden sie weniger als 48 Stunden mit Formol behandelt, so ist ihre Agglutinabilität geringer als die lebender Kulturen, nach 2—5 Tagen gleich, nach 6—14 Tagen größer. Nach 14 Tagen tritt Pseudoagglutination auf. Man benutzt also am besten die Kultur nach 2—5tägiger Einwirkung des Formols. Falta und Noegerath haben

empfohlen, zuerst Bouillon zu impfen und nach vollendetem Wachstum zu formalisieren, um so möglichst dichte Kulturen zu gewinnen. Ein Vergleich bei Verwendung dichterer und dünnerer Kulturen ergab:

Verdünnung	Dünnere Kultur	Dichtere Kultur
1: 20	—	+
1: 40	—	+
1: 80	±	+
1: 160	+	+
1: 320	+	+
1: 640	±	+
1-1280	—	±
1:2560	—	—

Eine Methode, die auf das ältere von Widal angegebene Verfahren zurückgreift, beschreibt Gino de Rossi. Die Kulturen werden 1 Stunde bei 58—59° gehalten, doch darf diese Temperatur nicht überschritten werden, da sonst die Agglutinabilität der Bakterien leidet. Die Kulturen waren 10 Monate (bei 37°) haltbar. Dasselbe Verfahren ist bei B. pyocyaneus, subtilis und staphylococcus verwendbar. H. Borden züchtet die Typhusbazillen auf Agar und schwemmt den Rasen in einer Lösung von 450 g Kochsalz, 50 Glyzerin und 1,25 Karbolsäure auf. Nach 2 Wochen wird die Aufschwemmung durchsichtig, die Bazillen sind abgestorben. Jörgensen und Madsen züchteten in Fleischpeptonbouillon (0,5 Kochsalz 1 % Pepton), die auf Lackmus alkalisch reagierte, Phenolphtalein nicht rötete. Der 24stündigen Kultur wurde unmittelbar vor dem Gebrauch $^1/_5$ % Formaldehyd zugesetzt.

Ficker, der seine Methode nicht genauer publizierte, hat ein Instrumentarium zusammengestellt, das in der Praxis viel Verwendung gefunden hat und als Fickersches Diagnostikum bekannt ist. Über seine klinische Verwertbarkeit besteht eine ausführliche Literatur. Verwoort faßt seine Meinung folgendermaßen zusammen: 1. Die Reaktion ist weniger sicher als die Gruber-Widalsche. 2. Sie tritt vielfach später als nach 20 Stunden auf. 3. Man muß mehrere Verdünnungen anstellen. 4. Die mit Formalin abgetöteten Kulturen sind gleichwertig. Holmarer findet in 15 Fällen völlige Übereinstimmung mit der ursprünglichen Gruber-Widalschen Reaktion. Fichtner, Walter, der die Herstellung eines Typhoidmischdiagnostikums (Paratyphus) befürwortet, Blum, Ehrsam, Gramann, Lion u. a. berichten über gute Erfolge. Skutetzky zieht das Fickersche Diagnostikum vor, denn: 1. arbeitet man immer mit demselben Stamm, 2. gibt es nur sicher positive oder sicher negative Resultate und 3. war einmal die Fickersche Probe bei sicherem Typhus positiv, bei dem die Gruber-Widalsche Reaktion versagte, und 3 mal negativ, wo die ursprüngliche Probe bei fehlendem Typhus positiv war.

Eine ähnliche Beobachtung machte van Loghen und Citron. Es gelang die Züchtung aus dem Blut. Die Fickersche Reaktion war positiv, die Agglutination mit lebenden Bazillen negativ.

Im allgemeinen tritt die Reaktion etwa zu Beginn der 2. Woche auf. Doch bietet diese Regel ihre Ausnahmen. So sagt O. Wendel: Gelegentlich ließ die Widalsche Reaktion durch späten Eintritt im Stich. 1 mal trat sie erst am 24., 1 mal am 29., 1 mal am 36. Tage auf. Auch sind Fälle beobachtet, in denen die Reaktion erst in der Rekonvaleszenz

positiv wurde. Jochmann berichtet über 5 Typhusfälle mit völlig fehlender Reaktion bei positivem bakteriologischem Befund. Pane erzählt von einem 9 Monate dauernden Fall, bei dem Typhusbazillen im Blut nachweisbar waren, die Probe bis zum Ende negativ blieb. Ähnliches berichten Mayer, Masuni, Hösslin. Falta und Noegerath erklären den negativen Ausfall durch Verwendung schwer agglutinabler Typhusstämme, was namentlich anfangs bei dem niederen Titer wesentlich in Betracht komme. Hilgermann hat deshalb neuerlich Verwendung von Typhusmischkulturen empfohlen. Auch nehmen die agglutinationshemmenden Körper gegen Ende der Rekonvaleszenz zu. Auch ist zu berücksichtigen, daß Mischinfektionen (Staphyl. albus, Diploc. pneum, Streptokokken) den positiven Ausfall der Reaktion hemmen. Tatsächlich dürften diese technischen Mängel allein die Erscheinung nicht durchweg erklären. Es gibt Individuen, die nicht genügend Agglutinine produzieren, eine Beobachtung, die ihr Analogon bei anderen Infektionskrankheiten und auch in bezug auf die Bildung von Immunsubstanzen findet.

Fehlt auf der einen Seite bisweilen die Reaktion, so gibt es andererseits Fälle, in denen noch Monate, ja Jahre nach abgelaufenem Typhus positiver Ausfall beobachtet wird. So berichten Brown und Crompton über 68 Fälle, von denen einer noch nach 4 Jahren, einer nach 33 Monaten, einer nach 1 Jahr positive Reaktion bei 50facher Serumverdünnung aufwies. Kühn erwähnt einen Fall nach 27 Jahren. A. Weil berichtet über einen Fall von Abszeß der Thyreoidea, in denen Typhusbazillen nachweisbar waren. Der Patient hatte vor 4 Jahren Typhus. Das Serum agglutinierte bis zur Verdünnung 1:20. Auch Jversen erwähnt einen Fall von positiver Reaktion 10 Jahre nach Ablauf der Krankheit bis zur Verdünnung 1:100.

Bezüglich der Mitagglutination kommen klinisch besonders B. paratyphi A und B in Betracht. Das Verhältnis gegenüber diesen Mikroorganismen stellt sich nach Brion und Kayser etwa so, daß man für B. paratyphi A etwa in 10%, für B. paratyphi B in ca. 8% Mitagglutination findet. Besondere Erwähnung möge hier das Verhalten der Gruber-Widalschen Reaktion bei Ikterus finden. Steinberg fand unter 22 Fällen von Ikterus 15mal die Reaktion negativ, 7mal positiv und zwar bei einer Verdünnung 1:40 und darüber; 2 Fälle davon hatten früher Typhus durchgemacht (1:640 und 1:160 positiv). Die übrigen waren: 2 Fälle von Ikterus catarrhalis, 1 schwer fieberhafter Ikterus, 1 unklarer Fall und 1 Fall von Carcinoma hepatis. Joachim beschreibt einen Fall von Cholangitis (nach 2 Stunden 1:60 partielle, nach 15 Stunden positive Reaktion) und 1 Fall von Carcinoma hepatis mit negativer Probe. Kämmerer fand bei 50 Fällen von Ikterus verschiedener Provenienz nur 1mal positiven Befund über 1:50, er mißt also der Erscheinung keine wesentliche klinische Bedeutung zu; derselben Ansicht ist Königstein. Zevi erhob 4 positive Resultate bei 24 Fällen; es handelte sich um 1 Fall von Kystoma ovarii, 1 von Degeneratio adiposa hepatis (1:1000), 1 von Carcinoma ventriculi (1:200, vor 18 Jahren Typhus) und 1 von Cirrhosis hepatis (1:100). Bei Ikterus neonatorum und bei Phosphorintoxikationen wurde nie positive Reaktion beobachtet.

Es handelt sich um verschiedene Momente, die den positiven Ausfall bedingen können. In der Regel sind es Darmerkrankungen, bei denen positive Widalsche Reaktion beobachtet wurde. Infektion

der Gallenwege mit B. coli z. B. können auf dem Wege der Mitagglutination dem Serum agglutinierende Eigenschaften gegenüber B. typhi verleihen. Andererseits kommen Infektion der Gallenwege mit B. typhi selbst (der Typhus kann längst abgelaufen sein und eine Rekrudeszenz vorliegen) nicht so selten vor. Ein Beispiel für die erste Möglichkeit gibt Büning. Bei einem Morbus Weilii wurde im Harn, Stuhl und postmortal in allen Organen B. fluorescens proteus nachgewiesen. Typhusbazillen wurden in der Verdünnung 1:50 sofort agglutiniert. Für die zweite Möglichkeit, zugleich als Illustration für manchen unklaren Fall, sei ein Fall Müllers angeführt. Es lag eine eitrige Cholecystitis vor. Im Lebersaft waren Typhusbazillen nachweisbar, im Darm nicht. Es handelte sich um eine Primäraffektion der Gallenwege oder um eine Infektion des Darmes, ohne daß es an diesem zu anatomischen Veränderungen gekommen wäre. Im allgemeinen kann gesagt werden, daß die Tatsache des Vorkommens positiver Widalscher Reaktion bei Ikterus infolge der Inkonstanz und der geringen Intensität für die Bedeutung der Probe als diagnostisches Hilfsmittel nicht wesentlich in Betracht kommt.

Viel schwieriger zu erklären und für die Bedeutung der Widalschen Reaktion in der Klinik von weit größerer Bedeutung sind jene Fälle, bei denen es sich um weitab liegende Infektionen handelt und bei denen positive Reaktion beobachtet wird. So wurden bei Endokarditis maligna, bei Sepsis, Influenza, Malaria, Miliartuberkulose positive Resultate gesehen. Dadurch erhält die Probe, klinisch genommen, nicht den Wert eines Beweises, sondern nur den eines sehr wertvollen Symptomes. Unter Umständen können Mischinfektionen den Ausfall der Reaktion beeinträchtigen. So berichtet Kayser über einen Fall, bei dem Typhusbazillen im Stuhl und Staphylococcus aureus im Blute nachzuweisen waren. Die Reaktion blieb aus. Vielleicht wäre hierher auch ein Fall zu zählen, den wir vor kurzem beobachteten. Im Blute war außer Typhusbazillen auch Diplococcus lanceolatus nachweisbar. Die Widalsche Probe war negativ. Die Obduktion ergab: Typhus abdominalis in der 3. Woche; Pneumonia crouposa. In diesem Sinne ist der Rat Kaysers beachtenswert, in Fällen von klinisch sicherem Typhus mit fehlender Agglutination an eine Mischinfektion zu denken.

Für die Praxis genügt es im allgemeinen (nach dem Vorgehen, das im Paltaufschen Institute üblich ist), das Serum auf das 30- und 50fache zu verdünnen, die Probe auf 2 Stunden in den Brutofen zu stellen, jede Stunde zu kontrollieren und eventuell noch 1 Stunde bei Zimmertemperatur zu beobachten. In allen zweifelhaften Fällen aber sind alle jene Hilfsmittel heranzuziehen und alle jene Kautelen in Rücksicht zu bringen, die im Vorstehenden erwähnt wurden. Insbesondere wird dann die Bestimmung des obersten Grenzwertes nötig.

Paratyphus (A und B).

Im allgemeinen ist bezüglich des Wertes der Gruber-Widalschen Reaktion zur Unterscheidung typhoider Infektionen mit Bac. Eberth und Bac. paratyphi A und B hervorzuheben, daß die Mitagglutination bei der nahen Verwandtschaft dieser Mikroorganismen eine bedeutende Rolle spielt. Als Grundprinzip ist hinzustellen, daß der höhere Agglutinationstiter für ein bestimmtes Bakterium für dieses als Krankheitserreger spricht. Korte und Steinberg fanden, daß unter 70 Fällen von Typhusinfektionen in 24 weder Bac. paratyphi A noch B

mitagglutiniert wurden, in 7 Fällen nur Stamm A, in 9 nur Stamm B, in 30 A und B. Stets war der Titer für Bac. Eberth höher als für die Paratyphusstämme, wenn sich auch am Beginne und in der Rekonvaleszenz Ausnahmen fanden. Auch Schottelius und Manteufel kommen zu dem Schlusse, daß bei genauer Bestimmung des Grenzwertes Zweifel kaum bestehen. So fand auch Ellermann in 4 Fällen von Infektion mit Bac. paratyphus B, dessen Serum zwischen 1000 und 3000 reagierte, weder Bac. paratyphi A noch Bac. Eberth höher als 1:50 agglutiniert.

Auf einem anderen Erfahrungsstandpunkte aber steht Zupnik. Er fand unter 300 Typhoidfällen 21 Fälle von Infektion mit Bac. paratyphi A, 1 mit Bac. paratyphi B. 13 Fälle, die kulturell nur Bac. typhi ergaben, zeigten Agglutination für Paratyphus. Im allgemeinen liegen die Verhältnisse bei Infektion mit Bac. paratyphi A so, daß das Serum dieses Bakterium vielfach höher agglutiniert als den Bac. Eberth. Dagegen besitzen die Sera bei Infektion mit Bac. typhi oft einen nahezu gleichen Titer für Bac. paratyphi A und B. Hat ein Serum den gleichen oder nahezu gleichen Titer für Bac. typhi, Paratyphi A und B oder für 2 dieser Mikroorganismen, so liegt wahrscheinlich eine Infektion mit Bac. Eberth vor. Einen Fall, in dem bei Infektion mit Bac. typhi das Serum für Bac. paratyphi B höher agglutinierte, beobachtete Brion auf der Naunynschen Klinik. In den ersten 2 Wochen agglutinierte das Serum nur Bac. paratyphi B zuerst bei einer Verdünnung 1:100, dann 1:200. Später aber agglutinierte das Serum Bac. typhi bis 1:500. Anfangs also ist die Maximalagglutination nicht absolut beweisend.

Kayser stellt den Grundsatz auf, daß dort, wo mehr als 1 Bakterium in höherem Grade agglutiniert wird, und wo die Maxima nahe beieinander liegen, der Gedanke an Mischinfektion zu berücksichtigen ist. Dann liegt die Entscheidung im Ausfall des Castellanischen und Pfeifferschen Versuches.

Einen solchen Fall beschreibt Gaethgens; eine Mischinfektion mit Bac. typhi und paratyphi B.

Gruber-Widalsche Reaktion.

9. Tag: Bac. typhi: 1:100; Bac. paratyphi A: ø; Bac. paratyphi B: ø.
44. u. 49. Tag: Bac. typhi: 1:250; Bac. paratyphi A: ø; Bac. paratyphi B: 100.

Gruppenagglutination konnte ausgeschlossen werden, da sich bei Bac. paratyphi B, als man die Probe 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen ließ, eine Erhöhung des Titers auf 1:150 zeigte.

Castellanischer Versuch.

Bac. paratyphi B gesättigt: Agglutination auf Bac. typhi: 1:250.
Bac. typhi gesättigt: Agglutination auf Bac. paratyphi B: 1:50.

Pfeifferscher Versuch.

24stündige Paratyphus(B)-Kultur 6 mg + 6 mg Löffler-Bouillon; davon 1 ccm = 1 mg injiziert (Meerschweinchen):

Nr. 1:	1 ccm Kultur	+ 0,9 ccm Kochsalzlösung . . .	300 Kolonien.
Nr. 2:	1 ccm „	+ 1 ccm $^1/_{10}$ Serum	20 „
Nr. 3:	1 ccm „	+ 1 ccm $^1/_{10}$ „ + 0,4 Kochsalz	35 „
Nr. 4:	1 ccm „	+ 1 ccm $^1/_{10}$ „ + 0,8 „	70 „

Der Befund eines von Kayser beobachteten Falles von Infektion mit Bac. paratyphi A sei gleichfalls detailliert wiedergegeben:

Krankheitstag	Bac. typhi	Bac. paratyphi A	Bac. paratyphi B
6.	1:100 pos. 1:200 neg. (1:50 neg.)	1:100 neg.	1:100 neg.
11.	1:100 pos.*)	1:100 pos.*)	1:100 neg.*)
16.	1:100 pos. 1:200 neg. (1:50 neg.)	1:200 pos. 1:300 neg.	
29.	1:100 pos. 1:50 neg.	1:100 pos.	
43.	1:100 neg.	1:50 pos.	

Es bestand also am 16. Krankheitstage das Maximum für Bac. paratypi A.

Fleischvergiftung.

Bei der sogen. Fleischvergiftung sind als Erreger eine Reihe von Bakterien bekannt geworden. Eine strikte Klassifikation ist derzeit nicht durchgeführt. In der Regel handelt es sich um Paratyphus(B)-Infektion. So beschreibt Heller eine Fleischvergiftungsepidemie, bei der Bac. paratyphi B bis zur Verdünnung 1:500 agglutiniert wurde. Eine andere, die Schottmüller beobachtete, sei hier als Beispiel angeführt. Als Erreger wurde Bac. enteritis Gärtner gefunden.

Die Agglutinationsverhältnisse gestalteten sich folgendermaßen:

Stamm	Krankheitstag	Höhe	Krankheitstag	Höhe
Enteritis-Stamm 1	8	1 : 150 +	14. u. 30.	1 : 100
do. do. 2	8	1 : 300 +	do.	1 : 160
do. do. 3	8	1 : 100 +	do.	1 : 100
Original-Gärtner	8	1 : 650 +	do.	1 : 100
do. Kaen	8	1 : 100 +	do.	1 : 100
do. Günther	8	1 : 75	do.	1 : 75
Bac. typhi	8	1 : 37	do.	negativ
Bac. paratyphi A	8	1 : 30	do.	negativ
do. do. B	8	1 : 150	do.	negativ

In den gleichfalls durch Bac. enteritis Gärtner hervorgerufenen Fällen Liefmanns wurde auch Bac. typhi durch das Serum agglutiniert.

Es empfiehlt sich in der Regel den Infektionserreger zu isolieren und mit ihm die Gruber-Widalsche Reaktion vorzunehmen.

Dysenterie.

Die Untersuchungen von Shiga, Kruse und Flexner haben die Verwertbarkeit der Agglutinationsprobe bei Dysenterie dargetan. Schon im allgemeinen Teile ist darauf hingewiesen worden, daß bezüglich der Dysenterie mannigfache Erscheinungen zu berücksichtigen sind. So ist die Bemerkung Leiners anzuführen, der Unterschiede fand, ob er den aus dem Kranken gezüchteten Stamm verwendete oder einen fremden.

*) Anm. Castellani: Typhus gesättigt: 1:100 positiv (A)
Bac. paratyphi A gesättigt: negativ.

Ferner gibt es Fälle, in denen der Bazillus im Stuhl nachgewiesen wurde, die Probe aber negativ ausfiel. Namentlich bei leichten Fällen, sowie in den ersten Tagen der Erkrankung (die Reaktion tritt gewöhnlich anfangs der 2. Woche auf) kann die Probe negativ ausfallen (Leiner, Korentschevsky). Aber auch bei letalen Fällen kommt ein Versagen bis zum Schlusse vor. Ferner berichtet Leiner über einen leichten Fall von Infektion mit dem Stamme Flexner, der am 8. Tage bis zu einer Verdünnung 1:400 agglutinierte, in der 3. Woche aber ein negatives Resultat ergab und über einen schweren, der erst im 3. Monate positive Reaktion bot. Auch wird der Stamm Flexner bisweilen bis zur 30fachen Verdünnung von normalem Serum agglutiniert. Mitagglutination, namentlich in bezug auf artverwandte Dysenteriestämme, Bac. coli und typhi kommen häufig zur Beobachtung. Nach Doerrs Untersuchungen kamen unter 20 Fällen von Infektion mit Bac. Flexner die ein Titer 10 bis 400 boten, 3 vor, die Bac. Kruse bis zur Verdünnung 10 bis 50 agglutinierten. Stets war der Titer für den Stamm Kruse beträchtlich niedriger. Bei einer durch den Stamm Kruse hervorgerufenen Epidemie fand sich unter 15 Fällen stets Agglutination bis zur Verdünnung 25 bis 400, Mitagglutination auf den Stamm Flexner 8mal. Durch Bestimmung des Grenzwertes war die Entscheidung leicht zu treffen.

Als wichtigstes Hilfsmittel in der Diagnose steht die Kultur obenan. Konnte doch Morgenroth aus den sagoähnlichen Körnern des Stuhles in 81 % der Fälle den Stamm Kruse leicht züchten. Als Methode für die Widalsche Reaktion eignet sich die Kollesche Verdünnung (1 Normalöse einer 20stündigen Agarkultur wird in 1 ccm der betreffenden Serumverdünnung verrieben). Zur mikroskopischen Probe benützt man eine Öse einer 14stündigen Bouillonkultur, die mit einer Öse der halb so starken Serumverdünnung gemengt wird als gewünscht ist.

Baczynsky benützt zur makroskopischen Probe eine Aufschwemmung einer 24stündigen Agarkultur in Kochsalzlösung.

Infektionen mit Bac. coli.

Die Untersuchungen einer Reihe von Autoren haben gelehrt, daß die Agglutinationsprobe zur Identifizierung einer bestimmten Coliart nicht verwendbar ist. Immerhin besitzt die Gruber-Widalsche Reaktion eine gewisse diagnostische Bedeutung. Da aber die Probe in der Regel nur auf den homologen Stamm ausführbar ist, hat die diagnostische Verwertbarkeit Grenzen, da zunächst der infizierende Stamm isoliert und der Titer dieses Stammes auf normales Serum geprüft werden muß. Denn schon das normale Serum Erwachsener zeigt Agglutination oft bis zu ziemlich bedeutender Höhe (1:250) und die Agglutinationswerte auf andere Koliarten als auf den aus dem Infizierten gezüchteten ist sehr bedeutend; bisweilen fehlt die Agglutination völlig. Dazu kommt die Mitagglutination auf Bac. paracoli, typhi, paratyphi. In dem Sinne aber kann die Agglutinationsprobe Verwertung finden, „als die isohomologen Kolistämme allein oder doch in viel höherem Grade beeinflußt werden als fremde homologe Stämme“ (Pfaundler). Bei Kindern liegen die Verhältnisse insofern um ein Geringes besser, als das normale Serum junger Individuen weniger häufig Agglutination aufweist. Nach den Untersuchungen von Glissl hat der normale Mensch einen Koliagglutinationstiter von 1:300, das neugeborene Kind von 1:40. Escherich beschreibt unter dem Namen Colitis infectiosa eine ruhrähnliche Er-

krankung der Kinder, bei dem es ihm gelang, einen Kolistamm zu züchten, der 2mal mit dem homologen Serum bei der Verdünnung 1:200, 3mal bei 1:50, 4mal 1:10 agglutiniert wurde, auch noch zu einer Zeit, wo der betreffende Kolistamm im Organismus nicht mehr nachweisbar war. Ebenso kam Kalagussa zu dem Resultate, daß das Serum der an Ruhr erkrankten mit Bac. coli infizierten Kinder das aus dem Darm gezüchtete Bac. coli agglutiniere. Bei fieberhaften Kolibazillosen, namentlich bei Pyelitis, findet sich die Agglutination am häufigsten. Im allgemeinen lassen sich die Befunde so zusammenfassen, daß bei Kolibazillosen die Gruber-Widalsche Reaktion zwar nicht selten gelingt, jedoch nur der positive Befund, unter allen Kautelen angestellt, zu verwerten ist und auch dieser nur mit größter Vorsicht. Der negative Ausfall beweist nichts.

Proteusinfektionen.

Pfaundler, Grassberger haben auf die Möglichkeit hingewiesen, aus dem Serum der mit Bac. proteus Infizierten den Nachweis des ätiologischen Zusammenhanges zwischen dem gezüchteten Proteusstamm und der Krankheit zu erbringen. Hier bestehen ähnliche Verhältnisse wie bei Infektion mit Bac. coli. Tochmann berichtet über einen Fall von Mischinfektion. Bei einer Ohreiterung kam es zu allgemeiner Sepsis. Intra vitam konnten im Blute Streptokokken und Bac. proteus nachgewiesen werden, etwa im Verhältnisse 5:200. Das Serum des Kranken agglutinierte Bac. proteus bis zur Verdünnung 1:640. Bac. typhi wurde bis zur Verdünnung 1:160 mitagglutiniert. Auch Lobowsky, Sternberg, Haim berichten über Mitagglutination von Typhusbazillen bei Proteusinfektionen. Im Falle von Haim wurde am 3. und 14. Krankheitstage Bac. proteus bei 50facher Verdünnung komplett, bei 100facher unvollstäudig agglutiniert; Typhusbazillen bis zur Verdünnung 1:100. Der Autor ist geneigt, den Fall als Mischinfektion (Proteus-Typhusbazillose) aufzufassen. In dem Falle von Brüning, bei dem intra vitam aus Stuhl und Harn und post mortem aus allen Organen Bac. fluorescens proteus nachzuweisen war, zeigte das Serum gegenüber dem Infektionskeim schwächere Agglutination als gegen Bac. typhi (Bac. proteus: 1:50 nach 10 Min. gering; nach 18 Stunden 1:100 hochgradig — Bac. typhi: 1:50 sofort).

Pyozyaneusinfektionen.

Die Angabe über die Verwertbarkeit der Gruber-Widalschen Reaktion bei diesen Infektionen schwanken. Während Escherich in 2 Fällen negative Befunde erhob, erhielt Eisenberg in seinem Falle positive Proben. Das Serum zeigte Mitagglutination auf Bac. fluorescens liquefaciens. Kretz berichtet über 2 Fälle, deren Serum geringe Agglutination aufwies (1:3, eine Reaktion, die auch normales Serum aufweisen kann). Bei einem Typhusfall fanden sich im pleuralen Exsudate Typhusbazillen, in einer gleichzeitig bestehenden Armphlegmone Bac. pyocyaneus. Das Serum agglutinierte Bac. pyocyaneus innerhalb 10 Min. bis zur Verdünnung 1:10, den Typhusstamm in derselben Verdünnung innerhalb $^{3}/_{4}$ Stunden. Nach 3 Wochen war die Probe für Bac. pyocyaneus negativ, für Typhusbazillen die gleiche. Kienberg beobachtete in seinem Falle: Agglutination des homologen Stammes bis zum Titer 40960; heterologe Stämme wurden teils gleich hoch, teils gar nicht agglutiniert. Es bestand Mitagglutination auf Bac. typhi.

Rotz.

Als Testobjekt empfiehlt sich eine dünne Phenol-Kochsalzaufschwemmung von Agarkulturen. Schnürer benützt eine 8—14stündige Kultur, die, in Kochsalzlösung aufgeschwemmt, durch 3—4stündiges Erhitzen auf 60° abgetötet wird. Im Dunkeln aufbewahrt, hält sich diese Flüssigkeit längere Zeit. Stets soll derselbe Stamm verwendet werden. Denn die Agglutinabilität der einzelnen Stämme ist sehr variabel. Man tut gut daran, einen Stamm durch monatliche Meerschweinchenpassage in seiner Virulenz zu erhalten. Schnürer benützt zur Ausführung der Reaktion Blockschälchen und beobachtet, nachdem er die Probe ca. 1 Stunde bei 50—54° gehalten hat, durch 16—36 Stunden. Bei positivem Ausfall sieht man am Boden des Blockschälchens eine zirkumskripte, scharf begrenzte, aus kleinen Körnern bestehende Masse, bei negativen eine graue wolkige Trübung.

Auch normale Sera vom Pferde agglutinieren bisweilen den Bac. mallei bis zur 400fachen Verdünnung. Höhere Verdünnungen (etwa 1:500—2000) geben bei Gesunden oder anderweitig Erkrankten kaum ein positives Resultat. Bisweilen aber fehlt die Reaktion bei Rotzkranken oder fällt sehr niedrig aus. Dazu kommt, daß bedeutende Schwankungen der Agglutinationswerte im Verlaufe der Erkrankung vorkommen. Ein Hilfsmittel zur Entscheidung besteht darin, daß durch Injektion von Mallein eine Steigerung des Titers oft auf das Doppelte herbeigeführt werden kann, so daß es sich empfiehlt, bei Werten unter 300 durch subkutane Injektion von 2—3 Tropfen Mallein die Erhöhung des Titers zu erzeugen.

Pest.

Die Gruber-Widalsche Reaktion spielt bei der Pestdiagnose wegen ihres späten Eintrittes keine wesentliche Rolle. Sie tritt, wenn überhaupt, am 9. Krankheitstage auf und erhält sich bis in die 8. Woche, oft bis in die Rekonvaleszenz. Positiver Befund ist beweisend; denn die Spezifizität der Reaktion ist sehr bedeutend. So untersuchten Kolle und Martini das Serum von 38 teils Gesunden, teils anderweitig Erkrankten in bezug auf seine Agglutinationsfähigkeit gegen den Bac. pestis, ohne je positiven Ausfall zu beobachten. Die Höhe der Agglutination ist sehr gering. Positiver Ausfall bei 3—5facher Serumverdünnung ist beweisend. Reaktion bei 100facher, ja nur 20- oder 40facher Verdünnung ist sehr selten. Der Wert der Reaktion liegt bei dem späten Eintritt nicht darin, die Diagnose stellen zu können, sondern eher darin, unter Umständen den Nachweis einer vor kurzem abgelaufenen Pestinfektion erbringen zu können. Aber auch in diesem Sinne versagt die Probe nicht selten. Das souveräne diagnostische Mittel bei Pest ist die bakteriologische Untersuchung.

Tuberkulose.

Zunächst seien die Herstellungsarten des Testobjektes angeführt.

Arloing und Courmont züchteten auf Kartoffeln, deren unterer Teil durch Neigung des Glases von dem 6% Glyzerin enthaltenden Kondenswasser bespült wurde. Die oberflächlichen Kolonien wurden langsam abgespült und trübten die Flüssigkeit. Von ihr wurde Bouillon geimpft und mehrmals täglich geschüttelt, bis man eine homogene Kultur erhielt. Diese wächst schneller als gewöhnlich, die Virulenz der Bakterien ist beträchtlich herabgesetzt. Am besten verwendet man Bouillon mit

2 % Pepton und 6 % Glyzerin. Man verdünnt das Serum mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:3 und hält die Probe 40—44 Stunden im Brutschrank.

Koch findet die Methode von Arloing und Courmont zu umständlich und unzweckmäßig und schlägt folgendes Verfahren ein. Die Bakterien, die in einem Kölbchen, auf der Kulturflüssigkeit schwimmend, gezüchtet werden, werden auf einem Filter gesammelt und zwischen Fließpapier gepreßt, um die Flüssigkeit zu enfernen. Man nimmt ca. 0,2 g der Bakterien, verreibt sie im Achatmörser mit wenigen Tropfen $^1/_{50}$ Normalnatronlauge und setzt unter kräftigem Schütteln immer mehr Natronlauge bis zur Verdünnung 1:100 zu. Hierauf wird 6 Min. zentrifugiert, abgefüllt und mit verdünnter Salzsäure zu schwach alkalischer Reaktion gebracht. Hierauf setzt man 0,5 % Karbollösung und 0,85 % völlig klare Kochsalzlösung bis zur Verdünnung 1:3000 zu. Die Bazillen stehen nun einzeln und in wenigen Exemplaren. Die Testflüssigkeit wird auf 24 Stunden in den Brutschrank gebracht.

Benützt man ein Neutuberkulinpräparat, das aus getrockneten, feinst pulverisierten Tuberkelbazillen besteht, so bedarf es bloß der Verdünnung mit Karbolkochsalzlösung bis 1:100. Nach Zentrifugieren durch 6 Min. wird vom Bodensatz abgegossen und auf das 1000fache verdünnt. Die Testflüssigkeit läßt sich durch 2 Wochen im Eisschrank konservieren. Vor dem Gebrauch verdünnt man auf das 10fache.

Romberg berichtet über das Präparat von Behring. 10 g getrocknete und verkleinerte Tuberkelbazillen werden in 1 l $1^1/_2$ %ige Natronlauge eingetragen, 8 Tage bei 37° gehalten, dann wird mit Essigsäure abgestumpft. 1 Teil dieser Emulsion wird mit 3 Teilen sterilen Wassers verdünnt. 0,5 ccm Serum wird mit der 5-, 10-, 15-, 20-, 30fachen Menge der Testflüssigkeit ohne Schütteln vermischt. Es ist gleich, ob man bei Zimmer- oder Bruttemperatur untersucht. Nach 19 Stunden treten die ersten Zeichen der Reaktion auf, nach 24 Stunden ist sie manchmal beendet. In der Regel bedarf es 40—44 Stunden. Als Grenzwert (L +) bezeichnet Romberg die Erscheinung, daß gegen einen hellen Hintergrund keine Trübung zu sehen ist, gegen einen dunklen noch geringe; als positiven Ausfall, wenn die Emulsion völlig klar ist. Koch bezeichnet als L, wenn eben noch deutlich erkennbar schwebende und gleichmäßig verteilte Niederschläge zu beobachten sind.

A. Koeppen benützt zur Herstellung des Testobjektes eine Verseifungsmethode. Die ganze Glyzerinbouillonkultur wird auf Fadenfilter gebracht, das Glyzerin entfernt, mit Kochsalzlösung übergossen und im Brutschrank getrocknet. 1 g wird mit 3 g $33^1/_3$ % Kalilaugenlösung durch mehrere Stunden im Achatmörser verrieben, auf das kalte Wasserbad gesetzt, das Wasser hierauf durch 15 Minuten zum Kochen erhitzt. Der Brei wird unter Zusatz von Wasser und langsamem Verrühren dickflüssig. Hierauf wird Spiritus und Wasser tropfenweise bis zu 100 ccm zugesetzt. Zu $1^1/_2$ ccm dieses Präparates werden 50—90,5 ccm Kochsalzlösung zugesetzt. Schkarin, der mit diesem Testobjekt arbeitete, stellte folgende Proben auf.

I. Kochsalzlösung + Testobjekt (Kontrolle).

II. Testobjekt + Serum.

0,2	Serum	+ 0,8	Testobjekt	(1:5)
0,1	„	+ 0,9	„	(1:10)
0,05	„	+ 2,45	„	(1:50)
0,05	„	+ 4,95	„	(1:100).

Die Reagenzgläser werden durchgeschüttelt und 24 Stunden bei 37° gehalten.

Vasilescu züchtete auf Kalbsserum; 25 ccm der Kultur werden mit 75 ccm Wasser und 3 ccm Glyzerin gemischt und im Wasserbade zum Kochen erhitzt. Hierauf läßt man das Reagenzglas abkühlen und sterilisiert im Autoklaven. Nach 8—14 Tagen bilden sich homogene Kulturen.

Marzagalli filtriert eine wässerige Emulsion von Tuberkelbazillen durch Chamberlandfilter und wäscht kalt. Diese „Pulpa" kommt in Röhrchen von 6 cm Länge und 8 mm Durchmesser und wird mit 8, 9, 14, 19 Tropfen Kochsalzlösung verdünnt. In jedes Röhrchen wird 1 Tropfen (bei der schwächsten Verdünnung 2 Tropfen) Serum hinzugefügt. Man untersucht nach 4, 6, 12, 24 Stunden. Zuerst bildet sich ein Hof, dann ein kegelförmiger Niederschlag (mit der Basis nach unten). Dieses Testobjekt ist lange haltbar.

Über den Wert der Probe in klinischer Beziehung ist folgendes zu berichten.

Eisenberg und Keller, die das aseptische Blut von 81, gleichgültig, ob tuberkulösen oder nicht tuberkulösen, Leichen untersuchten, fanden in 37 Fällen von nicht Tuberkulösen 70% positive Resultate. Sie bemerken, daß Alter der Kultur und Individualität des Untersuchters wohl in Betracht kommen; daß Kreosotmedikation auch normalem Serum agglutinierende Eigenschaften verleihen; daß auch in vorgeschrittenen Fällen die Reaktion ausbleibt. Letztere Beobachtung bestätigen auch Sabaréaun und Salomon, Arloing und Courmont. Zwischen Intensität der Agglutination und Infektion besteht ein umgekehrtes Verhältnis. Auf dem Internationalen Tuberkulose-Kongreß zu Paris 1905 berichtet Forment über negativen Ausfall der Probe bei Greisen und Neugeborenen, sowie bei akuter Tuberkulose. Bezüglich des negativen Ausfalles mancher Probe sei auf die Tatsache hingewiesen, daß manche Tuberkelbazillenstämme (z. B. ein solcher aus einer Meningitis tuberculosa, Arloing und Courmont) sehr wenig oder gar nicht agglutiniert werden. Ältere Stämme eignen sich besser als junge. Dagegen ist zu erwähnen, daß das Serum von an Typhus und Pneumonie Erkrankten bisweilen Tuberkelbazillen agglutiniert (Arloing und Courmont).

Als niedrigsten verwertbaren Titer setzt Jessen 1:25 an. Er fand bei klinischer Besserung Steigen des Titers, bei völliger Heilung Sinken desselben. Positiver Ausfall bei fieberlosen Individuen ist suspekt, je geringer die Lokalveränderung, desto größer ist die Chance einer positiven Reaktion.

Im allgemeinen spricht positiver Ausfall für Tuberkulose, ohne beweisend zu sein; negativer beweist gar nichts.

Marchetti und Stefanelli kamen zu folgenden Resultaten:

1. sichere Tuberkulose in 43% positiv,
2. leichte Fälle in 88% positiv,
3. 3 Lupusfälle negativ,
4. gesunde negativ.

Skrofulöse Kinder reagierten in 62% der Fälle positiv. Romberg fand bei von Tuberkulose freien Individuen in 56,4%, bei Tuberkulösen in 81,4% positive Resultate. Grysez und Job fanden, daß von denjenigen, die positive Reaktion gaben, später 62% an manifester Tuberkulose starben, von denen, die negative gezeigt hatten, nur 37%. Koch fand bei 30 Nichttuberkulösen 5mal Agglutination bei der Verdünnung

1:25, 6mal bei 1:10; bei 78 Tuberkulösen 1mal bei der 50fachen, 4mal bei 25facher Verdünnung positive Resultate, sonst aber nur negative Befunde. KOCH und ROMBERG sehen in der Probe kein diagnostisches Hilfsmittel. Endlich sei hier der Versuch ROSENBERGERS erwähnt, durch Bestimmung der Agglutination säurefester Bazillen mittelbar auf Tuberkulose zu schließen. Er benützt zwei stark agglutinable Stämme des von ihm beschriebenen säurefesten Bazillus in Glyzerinbouillonkultur mit 4 ‰ Formolzusatz.

Streptokokkeninfektionen.

Die Serodiagnostik der Streptokokkenerkrankungen mittels Agglutination hat bisher keine klinische Bedeutung. Zunächst sei auf einen Punkt hingewiesen, der im Prinzipe nicht in den Rahmen dieser Arbeit fällt. Über den Streptokokkus bei den verschiedenen Infektionen (Sepsis, Scharlach, Variola) besteht bezüglich seiner Arteinheit und in diesem Sinne über sein Verhalten gegenüber Immunseris keine einheitliche Anschauung. Dazu kommt, daß wahrscheinlich bei Übertragung des Streptococcus pyogenes vom Tier auf den Menschen eine Änderung des Rezeptorenapparates eintritt. Es besteht also sicherlich die Anzeige, bei der Wahl des Testobjektes sowohl auf Herkunft des Stammes in bezug auf Tierspezies, als auch in bezug auf Art der Infektion Rücksicht zu nehmen. Die Untersuchungen von KRAUS, MOSER und PIRQUET lehren, homologe Stämme zu wählen also bei Scharlach, „Scharlachstreptokokken", bei pyogenen Infektionen solche, die aus Sepsisfällen gezüchtet wurden. Die Frage, ob normales Serum Streptokokken beeinflußt, ist nicht völlig entschieden. KRAUS und LÖW negieren sie, andere (JOGISCHES) fanden, daß auch normales Serum einige Streptokokkenstämme agglutiniere.

Die Herstellung des Testobjektes findet ihre Schwierigkeit darin, homogene Objekte herzustellen. HASENKNOPF und SALGER gingen folgendermaßen vor: Streptokokkenbouillon wird 10 Min. scharf zentrifugiert, der Bodensatz mit einer Phenolkochsalzlösung (0,5 % Phenol) aufgeschwemmt, hierauf neuerlich zentrifugiert. Der Bodensatz wird mit 1 ccm $^1/_{50}$ Normalnatronlauge 15 Min. im Achatmörser verrieben, hierauf mit $^1/_{100}$ Normalsalzsäure auf Lackmus neutralisiert und mit Phenolkochsalzlösung zu einer zart opaleszierenden Flüssigkeit verdünnt. Hierauf wird die Probe so vorgenommen, daß zu 10 ccm der Testflüssigkeit 0,5—0,02 ccm Serum zugesetzt wird. Die Probe bleibt 24 Stunden bei 37°. Nach dieser Zeit zeigt sich am Grunde des Röhrchens bei positivem Ausfall eine zusammenhängende membranähnliche Masse, die durch Schütteln nicht aufgelöst werden kann. VAN DER VELDE und ARONSON wenden die Methode von ARLOING und COURMONT an. MOSER und PIRQUET benützen Stämme, die sie aus dem Herzblut von Scharlachleichen züchten. Diese Streptokokken wachsen in kurzen Ketten. Bei solchen, die in langen Ketten wachsen, gebrauchen die Autoren den Kunstgriff, in oder nach dem Wachstum Luft durchzublasen. Es entsteht auf diese Weise eine homogene, aus kurzen Ketten bestehende Testflüssigkeit. Die Probe wird mikroskopisch ausgeführt. 1 Tropfen Serum wird mit 3 Tropfen der Streptokokkenbouillon vermengt. Diese Verdünnung (1:4) bildet die Stammlösung, von der aus leicht die weiteren Verdünnungsn 1:16, 64 usw. hergestellt werden können.

ZELENSKY, der auch dem normalen Serum mitunter sogar sehr hohe, je nach Provenienz der Bakterien verschiedene Agglutinationskraft

zuschreibt, benützt eine Agarkultur. In ihr wachsen nämlich die Streptokokken in kurzen Ketten. Der Rasen wird mit Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Detot stellt sich homogene Kulturen her, indem er aus dem Rachen Scharlachkranker gezüchtete Stämme innerhalb weniger Stunden wiederholt überimpft. Die klinischen Erfahrungen beziehen sich hauptsächlich auf Scharlachfälle. Das Urteil über die Verwertbarkeit ist sehr different. Zu einem völlig negierendem Urteil kommen Detot und Bourcart. Sie sagen: Wenn auch die Streptokokken agglutiniert werden, jedenfalls besteht die Einschränkung, daß dies nur unter gewissen Umständen und nicht so leicht und konstant wie bei Typhus geschieht. Rechnet man hinzu, daß auch normale Sera positive Reaktionen geben, so folgt daraus, daß die Probe diagnostisch nicht verwertbar ist. Jogiches kommt zu folgenden Schlußsätzen:

1. Das Serum Scharlachkranker agglutiniert Streptokokken verschiedener Provenienz bis zur Verdünnung 1:600.
2. Die Probe wird in der 5.—6. Woche positiv.
3. Die makroskopische Untersuchung ist vorzuziehen.
4. Es treten mitunter Hemmungsbilder auf.

Hasenknopf und Salger fanden bei ihrer Methode Agglutination bis 1:500. Moser und Pirquet fanden unter 37 Scharlachfällen 19mal positiven Befund bis zur Maximalverdünnung 1:8; bei normalen Sera in 28 Fällen 3 positive Resultate maximal bis 1:4. Personen, die früher einmal Streptokokkeninfektionen überstanden haben, geben keine sichere Probe (Kraus und Löw).

Im allgemeinen ist also die Agglutinationsprobe bei Streptokokkeninfektionen, wenn sich auch aus manchen Befunden gewisse für die Spezifität sprechende Resultate ergeben haben, diagnostisch-klinisch nicht verwertbar.

Staphylokokkeninfektionen.

Als Methode empfiehlt sich die von Klopstock und Bockenheimer, die die Autoren zur Unterscheidung der einzelnen Staphylokokkenarten benützten. 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung wird mit einer Öse einer 24stündigen Kultur versetzt, hierauf das Serum zugesetzt, die Probe 1 Stunde im Brutschrank (37°) gehalten.

Die klinischen Erfahrungen über die serodiagnostische Probe bei Staphylokokkensepsis sind sehr gering. Auch normales Serum des Menschen agglutiniert zumeist in wenigen Stunden noch in hundertfacher Verdünnung (Kraus und Löw). Der Befund Silvestrinis bezieht sich auf 2 Fälle, die positives Resultat ergaben.

Im allgemeinen fassen Bruck, Michaelis und Schulze ihr Urteil über den Wert der Agglutinationsprobe bei Staphylokkokenerkrankungen dahin zusammen, daß er sehr gering ist. Mehr Gewicht legen sie auf die Bestimmung des Maximalantilysinwertes. Bei Gesunden fanden sie diesen stets unter 5, unter 25 Staphylokokkenerkrankungen 19mal über 100.

Meningokokkeninfektionen.

Die Beobachtung der letzten großen Genickstarreepidemien hat fast allen Forschern das Resultat ergeben, daß die Agglutinationsprobe klinisch verwertbar ist. Zunächst seien die Berichte der hygienischen Station in Beuthen erwähnt. Benützt wurde zunächst eine Aufschwemmung lebender Bakterien, später eine 1000fache Verdünnung mit Formalinzusatz. Auch hier gibt es schwer und leicht agglutinable Stämme. Als

positiver Ausfall wurde bezeichnet, wenn innerhalb einiger Stunden Agglutination bei einer 10fachen Serumverdünnung auftrat. Das Blut Gesunder agglutinierte niemals hoch, eine Beobachtung, die bei der Genickstarreepidemie beim Badischen Pionierbataillon Nr. 14 im Jahre 1903/04 bestätigt wurde. Manchmal trat die Reaktion am ersten Tage, manchmal erst in der 1.—2. Woche auf, verschwand bisweilen schnell und kehrte in einigen Fällen verstärkt wieder, erhielt sich oft bis weit in die Rekonvaleszenz, ja bis zu einem Jahre nach der Genesung. Von 420 Fällen fand sich die Reaktion positiv

146 mal bei der Verdünnung 1:10
86 „ „ „ „ 1:25
30 „ „ „ „ 1:50
8 „ „ „ „ 1:100
1 „ „ „ „ 1:200

Selbst der Titer 400 wurde beobachtet.

Auch Spangenberg, Rautenberg, Reinhart bestätigen die klinische Verwertbarkeit der Probe. Davis berichtet, er habe jedesmal, und zwar in Verdünnungen 1:50, Agglutination gefunden. Es sei hier noch die Beobachtung Fischers angeführt, daß auch Strepto- und Staphylokokkenserum den Meningokokkus agglutinieren können. So agglutinierte ein Streptokokkenserum mit dem Titer 1000 den Meningokokkus bis zum Titer 100, ein Staphylokokkenserum mit dem gleichen Titer bis 50.

Pneumokokkeninfektionen.

Die Untersuchungen über die Verwertbarkeit der Gruber-Widalschen Reaktion bei Diplokokkeninfektionen sind nicht abgeschlossen. Wenn auch die meisten Autoren seit den Befunden von Besancon und Griffon das fast konstante Vorkommen positiver Befunde bei Pneumoniekranken anerkennen, so halten andererseits Gargano und Fattorie, die 63 Fälle untersuchten, die Probe klinisch für belanglos. Die Reaktion ist oft schon am zweiten Tage ausgesprochen, erreicht rasch ihr Maximum und fällt gegen die Krisis langsam ab. 48 Stunden nach dieser ist die Kurve bedeutend gesunken, in 4—10 Tagen gleich 0. Die Art des zur Agglutination zu verwendenden Stammes ist wohl in Betracht zu ziehen. Neufeld fand, daß avirulente Stämme nicht beeinflußt werden. Homologe Stämme werden deutlich agglutiniert. Vorhandensein von Diplokokken im Blut stört die Reaktion nicht. Auch über die Höhe des erreichten Titers differieren die Angaben sehr bedeutend. Gargano beobachtete als höchsten Titer 1:10, gewöhnlich nicht mehr als 1:1, Jehle Werte bis 320, Neufeld kaum mehr als 50.

Maltafieber.

Bei diesem spielt die Serodiagnostik eine große Rolle. Seit den Untersuchungen von Wright und den Beobachtungen von Neusser, Kretz, Kaller, Kronrich, Brunner u. a. ist die Konstanz der Probe sichergestellt. Für die Spezifität spricht auch die Untersuchung von Horrok und Kennedy, die nur bei positivem Ausfall Micr. Melittensis nachweisen konnten (bei Ziegen). Allerdings erfährt der Wert der Reaktion eine Einschränkung durch zwei Momente. Zunächst dadurch, daß auch normal menschliche Sera bisweilen agglutinieren. So beobachtete Kretz positive Resultate bei gesunden Menschen bis zu einer 30fachen Serumverdünnung; dann aber auch dadurch, daß die Agglutinabilität der ein-

zelnen Stämme bedeutend different ist. Ein Versagen der Reaktion kommt in seltenen Fällen vor. So berichtet Ramon y Cayal über zwei Fälle mit negativer Probe, bei denen die Diagnose Mittelmeerfieber aufrecht erhalten werden mußte. Dagegen fand Kallen die Reaktion in allen 9 Fällen positiv. Ebenso Wright bei 9 Fällen nur einmal Versagen der Probe bei einem Falle, dessen Infektion 5 Jahre zurücklag. Dieser Autor beobachtete die höchsten Titers bei den akutesten Fällen (1 : 100). Curry berichtet über einen Fall, in dem Micr. Melittensis bei einer Verdünnung 1:50, Bac. typhi bei 1 : 40 agglutiniert wurde. Der Patient hatte zwei Jahre vorher Typhus. Basset nimmt an, daß ein Titerwert 30 (nach Critier sogar 10) für bestehendes oder überstandenes Maltafieber spricht. Weder bei Tuberkulose noch bei anderen Krankheiten erreicht das Serum diesen Agglutinationstiter gegenüber Micr. Melittensis.

Übrigens macht die Agglutinationshöhe im Verlaufe der Krankheit große Schwankungen durch, ein Moment, das eine Hauptstütze für den serodiagnostischen Versuch insofern bieten kann, als Zu- und Abnahme des Titers bei wiederholter Untersuchung für die Infektion mit Micr. Melittensis spricht.

Cholera asiatica.

Die größten Schwierigkeiten zur Herstellung eines geeigneten Testobjektes macht die Pseudoagglutination. Friedberger und Luerssen zeigten, daß die jungen Schrägagarkulturen beim Aufschwemmen in physiologischer Kochsalzlösung sofort und hochgradig ausflocken. Nach 18—24stündigem Wachstum der Kultur, sowie bei wiederholt umgezüchteten Stämmen ist diese Erscheinung viel geringer.

Seit den Befunden von Achard und Bensaud haben die Untersuchungen über den Wert der Gruber-Widalschen Reaktion bei Cholera asiatica nichts Wesentliches gebracht. Diese Autoren fanden stets positiven Befund bei 20facher Verdünnung, bei normalem Serum stets negativ. Dieser Angabe ist von Kolle und Pfeiffer widersprochen worden.

Im allgemeinen kann man sagen, daß, klinisch-diagnostisch genommen, der Pfeiffersche Versuch und die bakteriologische Untersuchung des Stuhles, letztere eventuell mit Zuhilfenahme eines Immunserums, der Agglutinationsprobe weitaus vorzuziehen ist.

Febris recurrens.

Die Methode zur Agglutinationsprobe bei Febris recurrens ist die von Gabritschewsky angegebene. Man entnimmt, und zwar nicht zu kurz vor dem Anfall, dem zu Untersuchenden das Blut und bringt einen Tropfen des Serums mit dem spirillenhaltigen Bluttropfen eines eben im Anfall befindlichen Patienten zusammen, mischt, verschließt die Ränder des Deckglases mit Wachs und bringt die Probe in den Brutschrank (37°). Hödlmoser, der eine größere Versuchsreihe anführt, bestätigt die Beobachtungen Löwenthals. Die Spirillen bewegen sich langsamer und stehen ganz still. Sie haben ihre gewöhnliche Form eingebüßt und erscheinen als ausgezogene, langgestreckte, aufgequollene Faden. Sie liegen dicht zusammengeballt. Diese Knäuelbildung ist auch bei Zusatz von normalen Sera zu beobachten. Das Wesentliche liegt nicht so sehr in der agglutinierenden als in der spirolytischen Wirkung des Serums. Über den Wert der Probe sei der Befund Hödlmosers angeführt, der unter 39 Fällen 30 positive Proben erhielt.

Literatur.

Aaser, P., Widals Reaktion ohne Mikroskop und Brutschrank. Tidskrift for norsk Lageforening 1904, Nr. 1. Ref.: Münchener med. Wochenschr., Nr. 30.

Ders., Über die makroskopische Agglutinationsprobe bei Typhoidfieber. Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 10.

Achard und Bensaude, Sérodiagnostic du Cholera asiatique chez l'homme. Presse méd. 1896, pag. 504.

Ders., Sérodiagnostic du Cholera. Soc. med. des hôsp. 1897, Avril 23.

Arloing, S. und Courmont, P., Internat. Tub.-Congr. Paris 1905. Ref.: Münchener med. Wochenschr. 1905.

Ders., Les sérums aggl. le bacille d'Eberth ont ils la même action sur le bacille de Koch. Journ. de phys. et de path. gén. T. V. 1903, pag. 701—704. Ref.: Centralbl. für Bakt., Bd. XXXV, pag. 123.

Dies, Agglut. de la bacille de la tub. vrai. Congr. de méd. int. Montpellier 1898.

Bacynsky, Untersuchungen über die Ätiologie der Dysenterie in Berücksichtigung zweier Epidemien in Galizien im Jahre 1903. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 33.

Ballner und v. Sagassen, Über die Bildung von homologem und heterologem Agglutinin im Tierkörper. Arch. für Hygiene, Bd. LI, Heft 3.

Barlocco, Sierodiagnosi de tifo c. un nuovo metodo. Cronica della clin. med. di Genova 1904, Nr. 10 und 12. Ref.: Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVII, pag. 510.

Basser, P. W., Agglutination bei Maltafieber. Journ. of trop. med. 1906, Nr. 10. Ref.: Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 24.

Bensaude, Le phénomen de l'Agglutination des microbes. Thèse pour le doct. en med. Paris 1897.

Bericht der deutschen Pestkommission. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. XVI.

Bericht der russischen Pestkommission in Bombay. Ann. de l'Inst. Pasteur 1897, Nr. 7.

Bericht über die Genickstarreepidemie beim badischen Pionierbataillon Nr. 14 (Krehl) im Jahre 1904. Münchener med. Wochenschr. 1904.

Besserer und Jaffé, Über Typhuskulturen, die sich der Immunreaktion gegenüber atypisch verhalten. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 51.

Blasi und Berardini, Richerche sulla agglutinine del tifo. Annali di Ygiene sperim. 1903, Fasc. XIII.

Blum, Zur Serodiagnostik des Typhus abd. mittels des Fickerschen Typhusdiagnostikums. Münchener med. Wochenschr. 1904.

Blumenthal, Über das Vorkommen von Typhus- und Paratyphusbazillen bei Erkrankungen der Gallenwege. Münchener med. Wochenschr. 1904.

Bonome, Über die diagnostische und therapeutische Wirkung der Stoffwechselprodukte des Rotzbazillus bei der Rotzinfektion der Menschen und Tiere. Münchener med. Wochenschr. 1904.

Borden, The Widal test for practic. physiolans. Proceedings of the New York Path. Soc. 1904, Vol. IV. Ref.: Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVI.

Brion, Beitrag zur Paratyphuslehre. Unterelsäß. Ärzteverein 1904.

Brion und Kayser, Neuere klinische bakteriologische Erfahrungen bei Typhus und Paratyphus. Deutsches Arch. für klin. Medizin, Bd. LXXXV, Heft 5 und 6.

Browne und Crompton, Note on the persist. of the Gruber-Widal reaction in convalesc. from thyph. fever. The Lancet 1900, Juny 27.

Bruck, Michaelis und Schulze, Beiträge zur Serodiagnostik der Staphylokokkenerkrankung bei Menschen. Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankh. 1903, Bd. L, Heft 1.

Brünning, Über infektiös-fieberhaften Ikterus (M. Weilii) im Kindesalter, zugleich ein Beitrag zur Pathogenese des Bac. fluor. prot. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 36.

Brunner, Über Maltafieber. Wiener klin. Wochenschr. 1900.

Ceritto, Intorno alla tecn. della sierodiagn. del. tifo. Anneli d'Hyg. sperm. 1904, Vol. XIV, pag. 411.

Christian, Boston med. Journ. 1907, April 25. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 35.

Clamann, Zur Technik der sero-diagnostischen Reaktion mittels des Fickerschen Typhusdiagnostikums. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 28.

Clemens, Über den Paratyphus. Deutsche med. Wochenschr. 1904.
Cole, J., Über die Agglutination verschiedener Typhusstämme. Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankh. 1904, Bd. XLVI.
Conradi, Über die Züchtung von Typhusbazillen aus dem Blut mittels Gallenkultur. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 34.
Ders, Über Mischinfektion durch Typhusbazillen und Paratyphusbazillen. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 32.
Critien, A., Tuberkulose und Maltafieber. Journ. of trop. med. 1907, Nr. 11.
Czaplewsky, Bluttupferröhrchen zur Erleichterung der Gruber-Widalschen Reaktion. Münchener med. Wochenschr. 1906.
Davis, J. D., Studies in Meningoc. Infekt. Ref.: Fol. haemat., Vol. V, Nr. 6.
Detot, Recherches sur l'Agglutination des Streptocoques. Comptes rend de la Soc. de Biol. 1904, Nr. 24.
Detot und Bourcart, Untersuchungen über die Agglutination der Streptokokken bei Scharlach. Rev. mens. des mal. de l'enfance 1905, February. Ref.: Münchener med. Wochenschr. 1905.
Doenitz. Über die Quelle der Ansteckung mit Typhus, Festschrift für Koch.
Ebstein, Wissenschaftlicher Verein der Ärzte zu Stettin. Sitzung vom 5. März 1907.
Ehrsam, Über das Fickersche Typhusdiagnostikum. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 15.
Eisenberg, Über die Anpassung der Bakterien an die Abwehrkräfte des infizierten Organismus. Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV.
Eisenberg und Keller, Über die Spezifität der Serodiagnose der Tuberkulose. Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIII.
Ellermann, Paratyphus. Hospital stid. 1906, Nr. 40. Ref.: Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 5.
Erne. Ein Fall von Paratyphus. Münchener med. Wochenschr. 1904.
Escherich, Pyocyaneusinfektion bei Säuglingen. Centralbl. für Bakt. 1899, Bd. XXV.
Ders., Die Bedeutung der Bakterien in der Ätiologie der Magendarmerkrankungen der Säuglinge. Deutsche med. Wochenschr. 1898.
Ders, Zur Kenntnis der Darmkolibazillen. Verhandlungen des 17. Kongresses für innere Medizin 1899.
Ders., Über Colitis contagiosa. Centralbl. für Bakt. 1899, Bd. XXVI.
Eyre, Asyl. dysent. in relat. to Bac. dysent. Brit. med. Journ. 1904.
Falta und Noegerath, Rassenunterschiede von Typhusstämmen und über Hemmungskörper im Serum in ihrer Bedeutung für die Gruber-Widalsche Reaktion. Deutsches Arch. für klin. Medizin 1905, Bd. LXXXIII, Heft 1.
Fichterer, Demonstr. der Medizin. Gesellschaft zu Leipzig vom 17. Mai 1904.
Ficker, Über ein Typhusdiagnostikum. Berliner klin. Wochenschr. 1903, Heft 33.
Fischer, Eine Saugpipette zur Abmessung von Serummengen bei der Widalschen Reaktion. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 5.
Flexner, Comparat. study of dysent. bacills. Centralbl. für Bakt. 1901, Bd. XXX.
Forster, Unterelsäß. Ärzteverein zu Straßburg. Sitzung vom 24. November 1906.
Forment, Internat. Tuberkulose-Kongreß, Paris 1905.
Friedberger und Luerssen, Zur bakt. Choleradiagnose. Deutsche med. Wochenschrift 1905, Nr. 40.
Gabritschewsky, Grundlage der Serotherapie bei der Febris recurrens. Arch. für Path., klin. Med. und Bakt. 1896, Bd. II, Heft 1.
Gaehtgens, Über einen Fall von Mischinfektion von Typhus und Paratyphus. Centralbl. für Bakt., Bd. XL.
Gargano und Fattori, Sulla aggl. del diplococco. Riv. di clin. med. 1903. — Ref.: Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXV.
Giani, Sulla agglut. de la Staphyloc. pyog. aur. della osteomyel. Gion. della Royal Acad. di med. di Torino 1902. Ref.: Centralbl. für Bakt. 1903, pag. 740.
Gossner, Zur bakt. Diagnose. Münchener med. Wochenschr. 1905, pag. 347.
Gramann, Zur Serodiagnostik des Typhus abdom. mittels des Fickerschen Typhusdiagnostikums. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 21.
Grassberger, Ein Fall von Gasphlegmone (Streptokokkus und Proteus) Jahrbuch der Wiener Krankenanstalt 1896.
Grisez und Job, Die vorzeitige Diagnose der Tuberkulose in der Armee und die Serumdiagnose von Arloing und Courmont. Revue de méd., Sept. 1906. Ref.: Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 10.
Grünberg und Rolly, Beitrag zur Frage der agglutinierenden Eigenschaften des Serums Typhuskranker auf Paratyphus- und verwandte Bazillen. Münchener med. Wochenschr. 1905.

GUJOT, Di un bac. del tifo inaggl. Clin. med. 1904. Ref. Centralbl. für Bakt.
GUTTLER, Vorteile und Nachteile von FICKERS Diagnostikum. Berliner klin. Wochenschrift 1904.
HAIM, Ein Beitrag zur Pathogenie des Bac. proteus vulgaris. Wiener klin. Wochenschrift 1903, Nr. 20.
HARRISON, Zur Frühdiagnose des Typhus. Journ. of Royal Army Medic. Corps, August 1906. Ref. Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 2.
HASENKNOPF und SALGER, Über Agglutination bei Scharlach. Jahrbuch für Kinderheilkunde 1903, Bd. LVIII.
HELLER, Fleischvergiftungsepidemie. Centralbl. für Bakt., Bd. XLIII, Heft 2.
HERZ, Beeinflussung der GRUBER-WIDALschen Reaktion durch sekundäre Erysipelinfektion. Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 42.
HIRSCHBRUCH, Die experimentelle Herabsetzung der Agglutinierbarkeit bei Typhusbazillen. Arch. für Hygiene 1906, Bd. LVI.
HIRSCHFELD, Komplementableitung zur Typhusdiagnose. Zeitschr. für innere Med., Bd. LXI, Heft 33.
HÖDLMOSER, Die Serodiagnose bei Rückfalltyphus. Zeitschr. für Heilkunde 1905.
HOESSLIN, Klinische und experimentelle Untersuchungen über die Ausscheidung von Agglutinin durch den Harn Typhuskranker. Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 18.
HOKE, Centralbl. für innere Med. 1907, Nr. 15.
HOLMAARES, FICKERS Typhusdiagnostikum. Hygiea 1905, Nr. 1. Ref. Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 8.
HORROKS und KENNEDY, Reports of the Commission for the Invest. of Meditars. fever, Febr. 1906, Part. IV. Ref. Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 11.
IVERSEN, Über Schwankungen des Agglutinationsvermögens des Serums im Verlaufe des Typhus abd. Zeitschr. für Hygiene und Infektionskr., Bd. XLIX, Heft 1.
JAEGER, Das Agglutinoskop. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXV.
JEHLE, Über Pneumokokkenagglutination mit dem Blutserum pneumoniekranker Kinder. Wiener klin. Wochenschr. 1903.
JESSEN, Agglutination bei Tuberc. pulm. Brauers Beiträge zur Klinik der Tuberkulose, Bd. VI, Heft 2.
JOACHIM, Zur Frage der GRUBER-WIDALschen Reaktion bei Ikterus. Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 35.
JOCHMANN, Über Bakteriämie und die Bedeutung der bakteriologischen Blutuntersuchungen für die Klinik. Medizinische Sektion der Schles-Gesellschaft für vaterl. Kultur. Sitzungen vom 10. und 17. Mai 1904. Ref. Centralbl. für Bakt. 1907, pag. 376.
Ders., Mischinfektion des Blutes mit Proteusbazillen und Streptokokken usw. Zeitschr. für klinische Med., Bd. LVII, Heft 1.
JOGICHES, Zur Frage über die Agglutination der Streptokokken durch das Serum Scharlachkranker. Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVI.
JÜRGENS, Zur ätiologischen Diagnose des Abdominaltyphus. Deutsche med. Wochenschrift 1904, Nr. 34.
Ders., Beobachtung über die WIDALsche Reaktion und die Mitagglutination der Typhusbazillen. Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLIII.
KAFKA, Leistungsfähigkeit der verschiedenen Methoden der Agglutinationstechnik. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XL.
KALLER, Das Maltafieber in Smyrna. Zeitschr. für Heilkunde 1905, Bd. XXVI.
KAMMERER, Über die Agglutination von Typhusbazillen bei Ikterus und Leberkrankheiten. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 26.
KAYSER, Die GRUBER-WIDALsche Probe bei Mischinfektion durch Typhusbazillen und Streptokokken. Arch. für Hygiene 1904, Bd. XLVIII, Heft 4.
Ders., Über die einfache Gallenröhre als Anreicherungsmittel und die Bakterien bei Typhus und Paratyphus. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 17.
Ders., Die Bakterien des Paratyphus. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXV, Heft 2.
Ders., Bakteriologischer Befund bei einem weiteren Falle von Paratyphus des BRION-KAYSERschen Typus A. Centralbl. für Bakt., Bd. XL., pag. 20.
KIRSTEIN, Zur Beeinflussung der Agglutinierbarkeit von Bakterien, insbesondere von Typhusbazillen. Zeitschr. für Hygiene u. Infektionskrankh., Bd. XLVI, pag. 226.
KLIENEBERG, Pyocyaneusinfektion der Harnwege mit hoher Agglutination für Piocyaneus und Mitagglutination von Typhusbazillen. Münchener med. Wochenschrift 1907, Nr. 27.
Ders., Studien über die Koliagglutination unter besonderer Berücksichtigung der klinischen Verwertung von Koliagglutinin. Deutsches Arch. für klinische Med., Bd. XC, Heft 3 und 4.

Koch, Über die Agglutination der Tuberkelbazillen und über die Verwertung zur Agglutination. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 48.

Königstein, Über die agglutinierenden Eigenschaften der Galle und des Serums bei Ikterischen. Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 35.

Kolle, Über Paratyphus und den Wert der Immunitätsreaktion für die Erkennung der Paratyphusbazillen. Zeitschr. für Hygiene 1906, Bd. LII.

Kolle und Martini, Über Pest. Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 1—4.

Konrich, Untersuchungen über die Agglutination des Micr. melittensis. Zeitschr. für Hygiene, Bd. XLVI.

Korentschewsky, Zur Frage der mandschurischen Dysenterie. Russki Wratsch 1904. Ref. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVII, pag. 193.

Korte und Steinberg, Über die agglutinierende Wirkung des Serums Typhuskranker auf Paratyphusbazillen nebst Bemerkungen über makroskopische und mikroskopische Serodiagnostik. Münchener med. Wochenschr. 1905, pag. 985.

Kraus, Über Fadenbildung. Wiener klin. Wochenschr. 1899, Nr. 2.

Kraus und Löw, Über Agglutinine. Wiener klin. Wochenschr. 1899, Nr. 5.

Kreissl, Klinische Erfahrungen über die Gruber-Widalsche Reaktion. Wiener klin. Wochenschr. 1904.

Kretz, Beiträge zur Kenntnis der Agglutination der Bakt. Jahrbuch der Wiener Krankenanstalten 1897.

Kruse, Weitere Untersuchungen über die Ruhr und Ruhrbazillen. Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 23 und 24.

Kühn, Einige Bemerkungen zur Typhusdiagnose. Rostocker Ärzteverein, Sitzung vom 9. Januar 1904.

Kündig, Über die Agglutination von Typhusbazillen durch das Blutserum Ikterischer. Centralbl. für innere Med. 1904.

Laubenheimer, Über die diagnostische Bedeutung der bakteriziden Eigenschaft des Blutserums Typhuskranker. Zeitschr. für klinische Med. 1905, Bd. LVI, pag. 170.

Leiner, Über bazilläre Dysenterie im Kindesalter. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 26.

Lenz, Kasuistischer Beitrag zur Pathologie des Typhus. Klinische Jahrbücher, Bd. XIV, Heft 5.

Leo, Über Paratyphus. Rhein.-westf. Gesellschaft für innere Medizin in Bonn. Sitzung vom 3. Juli 1904.

Leuchs, Über die diagnostische Zuverlässigkeit und die Spezifizierung der Komplementbindungsmethode bei Typhus und Paratyphus. Berliner klin. Wochenschrift 1907, Nr. 3 und 4.

Liefmann, H., Fleischvergiftung und Widalreaktion. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 4.

Lingelsheim, Bericht über die in der hygienischen Station zu Beuthen vorgenommenen bakteriologischen Untersuchungen bei epidemischer Genickstarre. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 4 und 26.

Lion, Die Methoden zur Ausführung der Gruber-Widalschen Reaktion. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 21.

Loghen, G. J. van, Widerspruch zwischen den Resultaten der Bazillenzüchtung und der Widalschen Reaktion bei Typhus und Paratyphus. Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLVI, Heft 2.

Löwenthal, Serodiagnose des F. rec. während der Apyrexie. Deutsche med. Wochenschr. 1897.

Lubowsky und Steinberg, Über die Agglutination von Typhusbazillen bei Proteus- und Streptokokkeninfektion. Deutsches Arch. für klinische Medizin 1904, Bd. LXXIX, Heft 5 und 6.

de Luchi, La sierodiagnose del tifo a mezzo del bazillus formal. La Pediatr. 1904. Ref. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XXXVII.

Lüdke, Agglutination bei Autoinfektion mit besonderer Berücksichtigung des Ikterus. Deutsches Arch. für klinische Med. 1904, Bd. LXXXI.

Ders., Beobachtungen über die bazilläre Dysenterie Barmer. Deutsche med. Wochenschrift 1906.

Manterazzi, Differentialdiagnose, klinische und bakteriologische, zwischen Typhus und Paratyphus. Gaz. degli osped. 1907, Nr. 33. Ref. Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 36.

Manteuffel, Erfahrungen mit der Gruber-Widalschen Reaktion bei Berücksichtigung der Mitagglutination von Paratyphusbazillen. Münchener med. Wochenschrift 1905, pag. 1329.

MARCHETTI und STEFANELLI, Sulla serorreaz. tub. Riv. crit. clin. med. 1903, Heft 42 und 44. Ref. Centralbl. für Bakt. 1903, pag. 732.
MARTINECK, Ein für die Praxis geeignetes Besteck zur Anstellung der GRUBER-WIDALschen Reaktion mit dem FICKERschen Typhusdiagnostikum. Münchener med. Wochenschr. 1905, pag. 701.
MARZAGALLI, Sopra di un nuovo metodo per la sierodiagnosi della tubercul. Annali dell'Inst. Margl. etc. Ref. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XXXVII.
MASUNI, Ein Fall von Typhus abd. mit mang. Agglutininprod. Centralbl. für innere Med. 1906, Nr. 1.
MAYER, Neuere Methoden der Typhusdiagnostik. Gesellschaft der Charité-Ärzte, Sitzung vom 17. Januar 1907.
MAYERSTEIN, Über Typhus. Allgemeiner ärztlicher Verein zu Köln, Sitzung vom 19. Oktober 1906.
MEMMI, Die Typhohaemie. Ref. Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 42.
MEYER, Über FICKERsches Typhusdiagnostikum. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 7.
MITILESKU, Die sicheren diagnostischen Zeichen bei beginnender Lungentuberkulose. Ref. Münchener med. Wochenschr. 1904.
MORGENROTH, Über Ruhruntersuchungen in China usw. Arch. für Schiffs- und Tropenhygiene, Bd. VIII, Heft 1.
MOSER und v. PIRQUET, Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 11 und 12.
MÜLLER, Cholecyst. und cholang. typhos als Ursache positiver GRUBER-WIDALscher Reaktion bei Ikterus. Zeitschr. für Heilkunde 1905, Bd. XXVI, Heft 7.
MÜLLER und GRAEF, Nachweis von Typhusbazillen in eingesandten Blutproben. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr 2.
PAGANELLI und MELCHIORE, Kongreß für innere Medizin Rom. Oktober 1904.
PALTAUF, Die Agglutination. Handb. von Kolle-Wassermann, Bd. IV.
PANE, Sul reperto batteriol. del sangue e sulla siero aggl. del bac. del tifo in un caso di inf. tifos. a decorso longh Riv. med. 1903. Ref. Centralbl. für Bakt. 1903, pag. 469.
PASSINI, Variabilität der Bakterien und Agglutinationsphänomen. Münchener med. Wochenschr. 1904.
PFAUNDLER, Spezielle Immunitätslehre betr. Bac. coli. Handb. von Kolle-Wassermann, Bd. IV.
Ders., Ein automatischer Mischer zur Anstellung der Serumproben. Münchener med. Wochenschr. 1904, pag. 299.
Ders., Zur Serodiagnostik im Kindesalter. Jahrb. für Kinderheilk., Bd. L, pag. 295.
PFEIFFER und KOLLE, Weitere Untersuchungen über die spez. Immunitätsreaktion der Choleravibrionen im Tierkörper und Reagenzglase. Centralbl. für Bakt. 1896, Bd. XX, pag. 129.
PORCILE, Beitrag zur differential-diagnostischen Unterscheidung der Typhus- und typhusähnlichen Bazillen mit Hilfe der Agglutination. Zeitschr. für Hyg. 1905, Bd. L.
POSNER, Über die Leistungsfähigkeit der Komplementablenkungsmethode für die Typhusdiagnose. Wissenschaftliche Gesellsch. der Ärzte in Bremen. Sitzung vom 24. April 1907.
PRÖSCHER, Zur Anstellung der GRUBER-WIDALschen Reaktion. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXI.
RACZYNSKY, Untersuchungen über die Ätiologie der Dysenterie mit Berücksichtung zweier Epidemien in Galizien im Jahre 1903. Wiener klin. Wochenschr. 1904.
ROLLY, Zur Diagnose des Typhus abd. Münchener med. Wochenschr. 1904, p. 1041.
ROMBERG, Zur Serodiagnostik der Tuberkulose. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 18 und 19.
ROOSER-RUNGE, Über zwei Fälle von Maltafieber. Münchener med. Wochenschr. 1905.
ROSENBERGER, Über Agglutination säurefester Bazillen. Centralbl. für innere Med. 1904, No. 26.
ROSSI, Die Zubereitung haltbarer Kulturen für den serodiagnostischen Versuch. Centralbl. für Bakt., Bd. XL, pag. 426.
ROSTOSKY, Die Serumdiagnostik. Würzburger Abhandl. 1902, Bd. IV, Heft 2.
Ders., Über Agglutination bei Autointoxikation mit besonderer Berücksichtigung des Ikterus. Phys.-med. Gesellsch. Würzburg. Sitzung vom 19. Mai 1904.
SABERÉ und SALOMON, Beitrag zum Studium der Bazillotuberkulose. Rev. de méd., Juli 1905.
SADLER, Über den Einfluß des Temperaturopt. von 55° C. auf die Agglutination bei FICKERschem und WIDALschem Versuch. Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 10.

Scheller, Experimentelle Beiträge zur Theorie und Praxis der Gruber-Widalschen Agglutinations-Probe. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVIII.
Schnürer, Zur diagnostischen Bedeutung der Rotzagglutination. Centralbl. für Bakt. Bd. XXXIX, Heft 2.
Schottelius, Bakteriologische Beobachtungen bei einer Paratyphusepidemie. Münch. med. Wochenschr. 1905, pag. 2146.
Schottmüller, Zur Ätiologie der akuten Gastro-Enteritis (Cholera nost.). Münch. med. Wochenschr. 1904.
Sehrwald, Steigerung der Agglutination der Typhusbazillen und ihr Wert für die Typhusdiagnose. Deutsche med. Wochenschr. 1905.
Shiga, Über die Erreger der Dysenterie. Centralbl. für Bakt. 1908, Bd. XXIII und XXIV.
Silvestrini, Rif. med. 1898. 16. Juni.
Skutetzky, Über den Wert des Fickerschen Typhusdiagnostikums im Vergleiche zur ursprünglichen Gruber-Widalschen Reaktion. Zeitschr. für Heilk. 1904 Bd. XXV.
Spät, Die Diagnose der typhoiden Krankheiten des Menschen. Wiener klin. Wochenschrift 1907.
Spangenberg, Rautenberg und Reinhard, Die Genickstarre in dem Badischen Pion.-Bat. Nr. 14 im Jahre 1903/04. Ref. Münchener med. Wochenschr. 1905.
Spilka, Fickerovo typhusdiagn. a Gruber-Widalova reakte. Le Karske Rozhledy 1904. Ref. Centralbl. für Bakt. 1904, pag. 352.
Stäubli, Zur Technik der Gruber-Widalschen Reaktion. Münchener med. Wochenschrift 1904.
Steinberg, Über Agglutination von Typhusbazillen durch das Blusserum Ikterischer. Münchener med. Wochenschr. 1904.
Stern, Die Fehlerquellen der Serodiagnostik. Berliner klin. Wochenschr. 1897, Nr. 11 und 12.
Ders., Über den Wert der Agglutination für die Diagnose des Typhus abd. Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 30 und 31.
Stern und Korte, Über den Nachweis der bakteriologischen Reaktion im Blutserum der Typhuskranken. Sitzung der med. Sektion der schles. Gesellsch. der Ärzte vom 12. Februar 1904. Ref. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXIV, Nr. 20.
Tiling, Zur Serumdiagnose des Typhus abd. mittels des Fickerschen Diagnostikums. Münchener med. Wochenschr. 1904.
Vasilescu, Cultures homogènes du bac. tuberc. Comptes rend. de la Soc. de Biol. 1904, Nr. 10.
Verwoort, Der Wert des Fickerschen Typhusdiagnostikums für die Praxis. Weekbl. hed Nederl. Tydschr. voor Geneeskunde, Nr. 21. Ref. Münchener med. Wochenschrift 1905.
Volk und de Waele, Über Hemmungserscheinungen bei frischen Immunseris. Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 49.
Walter, Zur Typhusdiagnose. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 3.
Weil, Über den Einfluß der Temperatur auf die spezifische und nicht spezifische Agglutination. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVI, Nr. 5.
Ders., Typhoid absc. of the thyreoid gland. Proceeding of the New York Pathol. Soc. 1905, Vol. II. Ref. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXVII, pag. 228.
Wendel, Die Typhuskranken unter den deutschen Truppen in Tientsin im Herbst und Winter 1900/1901. Deutsches Arch. für klinische Med. 1904, Bd. LXXX, Heft 5 und 6.
Wesener, Über Diagnose und Prophylaxe des Typhus abd. Münchener med. Wochenschr. 1904.
Westenrigk, Über einen Fall von Ileotyphus ohne Veränderungen des Darmes. Mikrobiol. Gesellsch. zu St. Petersburg. Sitzung vom 19. Juni 1904. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXV.
Widal, Étude sur la diagnostic de la fièvre typhoid. Ann. de l'Inst. Pasteur 1897, pag. 376.
Ders., Serodiagnostic de fièvre typhoid. Soc. med. des hôsp. 1896. 26. Juin.
Zelensky, Zur Agglutination der Streptokokken. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 15.
Zevi, Über die Gruber-Widalsche Reaktion bei Ikterus. Wiener klin. Wochenschrift 1904, Nr. 31.
Zupnik, Über die differential-diagnostische Bedeutung des Agglutinationstiters für Typhus und Paratyphus. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 44.

XXXII.

Technik und Methodik des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens (Präzipitinmethode) mit besonderer Berücksichtigung der forensischen Blut- und Fleischuntersuchung.

Von

P. Uhlenhuth und **O. Weidanz**

in Berlin.

Übersicht über die Entwicklung und praktische Verwertbarkeit des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens.

Präzipitine sind spezifische Reaktionsprodukte des Tierkörpers, die nach Einspritzung der betreffenden Versuchstiere mit gewissen fremdartigen (tierischen oder pflanzlichen) Eiweißsubstanzen in dem Blutserum der so vorbehandelten Tiere auftreten und welche die Eigenschaft besitzen, beim Zusatz zu den zur Vorbehandlung benutzten Eiweißlösungen (präzipitogene Substanzen) in diesen einen Niederschlag (Präzipitat) zu erzeugen.

Die Entdeckung der Präzipitine, die wir in erster Linie R. Kraus (1897) verdanken, basiert auf den Forschungen über die künstliche Immunität.

Durch die Untersuchungen von v. Behring und seinen Mitarbeitern aus dem Jahre 1890 war festgestellt, daß in dem Blutserum von mit Diphtheriegift vorbehandelten Tieren spezifische antitoxische Stoffe auftreten, die imstande sind, das zur Einspritzung benutzte Gift im Tierkörper und im Reagenzglase zu neutralisieren. In ähnlicher Weise gelang es dann auch Antitoxine gegen eine Reihe anderer Bakteriengifte (Tetanus-, Botulismus-, Pyocyaneustoxin), gegen Pflanzengifte (Ricin, Abrin, Crotin, Robin usw.), gegen tierische Gifte (Schlangengift, Aalgift, Krötengift, Spinnengift) herzustellen (v. Behring, Brieger, Kemperer, A. Wassermann, Ehrlich, Phisalix u. Bertrand, Camus u. Gley, H. Kossel).

Im Jahre 1894 konnte dann R. Pfeiffer nachweisen, daß in dem Blutserum von Tieren, die mit Cholera- oder Typhusbakterien eingespritzt

waren, ebenfalls spezifische Immunkörper („Antikörper") auftreten, welche die betreffenden Bakterien in bestimmter Weise beeinflussen, indem sie dieselben in der Bauchhöhle des Meerschweinchens zur Auflösung bringen.

Die Wirkung dieser sogenannten bakteriolytischen Stoffe tritt in sinnfälliger Weise in die Erscheinung, wenn man das Immunserum mit den betreffenden Bakterien, z. B. Cholerabazillen vermischt und Meerschweinchen in die Bauchhöhle einspritzt. Man kann dann in dem mittels Kapillaren entnommenen Peritonealexsudat eine Aufquellung sowie eine Auflösung der betreffenden Bakterien beobachten und zwar werden nur diejenigen Bakterien aufgelöst, welche die Antikörperbildung veranlaßt haben.

Zwei Jahre später haben dann Gruber und Durham noch weitere spezifische Stoffe in dem genannten Serum nachweisen können, nämlich Stoffe, welche Cholera- bzw. Typhusbakterien in Aufschwemmungen ihrer Kultur zusammenballen (Agglutinine). Ein solches hochwertiges Cholera- oder Typhusserum agglutiniert in bestimmten Verdünnungen nur Cholera- bzw. Typhusbazillen, nicht aber andere Bakterien. Mit Hilfe dieser spezifischen Reaktion war man daher imstande, die betreffenden Bakterien von anderen verwandten zu unterscheiden. Es lag nun nach diesen Befunden der Gedanke nahe, daß auch in den aus Bakterienleibern hergestellten Extrakten mit spezifischem Serum ähnliche Reaktionen auftreten würden, wie in den Kulturen selbst; war doch von Widal, Levy und Bruns bereits festgestellt, daß man mit keimfreien Filtraten aus Typhus- und Cholerabouillonkulturen immunisieren und so ein Serum mit denselben agglutinierenden Eigenschaften gewinnen kann wie jenes, welches durch Einspritzung von Reinkulturen selbst erzeugt worden war.

Rudolf Kraus, der diesen Weg weiter verfolgte, erbrachte dann auch im Jahre 1897 den Nachweis, daß Immunserum in Filtraten der Bakterienkulturen spezifische Niederschläge erzeugte, und zwar traten diese Niederschläge nur dann auf, wenn ein Immunserum mit dem Filtrate der zugehörigen Bakterienkultur zusammengebracht wurde. So konnten beispielsweise mit Choleraimmunserum in Cholerakulturfiltraten, mit Typhusserum in Filtraten aus Typhuskulturen usw. Niederschläge hervorgerufen werden.

Diese Untersuchungen von Kraus wurden bald bestätigt durch Nicolle, welcher weiterhin zeigte, daß die keimfreien Filtrate von Bakterium coli und Vibrio Massauah durch homologes Serum ebenfalls spezifisch ausgefällt werden.

Ähnliche Resultate konnte Marmorek für das Streptokokkenserum feststellen. Auf Grund der nachgewiesenen Spezifität dieser Präzipitinreaktion mußte man annehmen, daß ihr eine ebenso wichtige diagnostische Bedeutung zukommen müsse, wie z. B. der Agglutination und dem Pfeifferschen Phänomen.

Wladimiroff war dann der erste, welcher die Bakterienpräzipitine zu diagnostischen Zwecken benutzte, und zwar fand er, daß das Serum eines rotzkranken Pferdes, zu dem Filtrat einer Rotzkultur hinzugefügt, in dieser einen Niederschlag erzeugte. In ähnlicher Weise zeigte Markl, daß die spezifischen Niederschläge bei der Diagnose der Pestbazillen verwertet werden können. Weitere eingehende Untersuchungen über diese Fragen verdanken wir dann Kraus selbst, welcher die von ihm gefundenen Bakterienpräzipitine zur Differenzierung artver-

wandter Mikroorganismen in ausgiebigster Weise verwendete. Von den neueren diesbezüglichen Untersuchungen seien erwähnt die Arbeiten von Fornet, Bonome, v. Eisler, Porges und Heyrowsky, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden kann (siehe v. Eisler: Bakterienpräzitine ds. Handb.).

Eine allgemeine Geltung haben dieser Reaktion erst Tchistovitch und Bordet (1899) verschafft, indem sie zeigten, daß nicht nur die pflanzlichen, sondern auch die tierischen Eiweißkörper Präzipitine zu bilden imstande sind.

So beobachtete Tchistovitch, daß das Serum von Kaninchen, die mit Pferde- oder Aalserum vorbehandelt waren, in dem Pferde- oder Aalserum eine Ausfällung der Eiweißstoffe hervorrief. Bordet bestätigte diese Untersuchungen von Tchistovitch unmittelbar darauf mit dem Serum eines mit defibriniertem Hühnerblut vorbehandelten Kaninchens.

Man erinnerte sich nunmehr an die Kraussche Entdeckung und konnte im Hinblick auf die von diesem Forscher festgestellte Lehre von der Spezifität der Bakterienpräzipitine auch bei den Blutpräzipitinen eine solche Spezifität nachweisen.

Bordet hatte bereits vorher die wichtige Beobachtung gemacht, daß nach Einspritzung von defibriniertem Blute in dem Serum der so vorbehandelten Tiere Stoffe auftreten, welche die betreffenden Blutkörperchen des zur Vorbehandlung benutzten Blutes aufzulösen und zusammenzuballen imstande sind.

Somit war die sehr interessante Tatsache festgestellt, daß ebenso wie nach Einverleibung von Bakterienkulturen auch nach Einspritzung von Blut spezifische, auflösende (hämolytische), agglutinierende und präzipitierende Substanzen im Tierkörper gebildet werden. Bordet fand dann weiterhin, daß sich auch nach Einspritzung von Kuhmilch in dem Blutserum von Kaninchen Präzipitine bilden, welche das Kasein der Kuhmilch zur Ausfällung bringen. Diese Versuche von Bordet mit dem von ihm so benannten Laktoserum wurden dann in ähnlicher Weise wiederholt von Fish, der die Spezifität dieser Laktoserumreaktion zum ersten Male nachwies (Februar 1900), indem er fand, daß ein Kuhlaktoserum nur in Kuhmilch, nicht aber in Menschen- oder Ziegenmilch einen Niederschlag hervorruft. Gleiche Versuche, über welche Ehrlich in der Croonian lecture (22. März 1900) berichtet, stellte Morgenroth an und kam zu demselben Resultat wie Fish. Auch die von Wassermann und Schütze zu derselben Zeit unabhängig von diesen Forschern unternommenen Untersuchungen führten zu demselben Ergebnis und bewiesen zugleich die Möglichkeit, die verschiedenen Milcharten biologisch voneinander zu unterscheiden.

Mit dem Nachweis der Spezifität dieser Reaktionen war begreiflicherweise ihre praktische Verwertbarkeit auf eine sichere wissenschaftliche Grundlage gestellt.

Ehrlich, Myers und Uhlenhuth stellten weiterhin fest, daß nach Einspritzung von Hühnereiereiweiß in kristallinischem oder nativem Zustande in dem Serum der hiermit behandelten Kaninchen spezifische Präzipitine für Eiereiweiß auftreten. Uhlenhuth studierte die Frage, ob es nicht möglich sei, mit Hilfe dieser spezifischen Reaktionen die Eiweißstoffe verschiedener Vogeleier zu unterscheiden. Diese Untersuchungen, die er auf Hühner-, Gänse-, Enten-,

Puten-, Perlhuhn-, Tauben-, Möven- und Kibitzeier ausdehnte, führten zu positivem Ergebnis, denn es gelang in der Tat, die Eiweißstoffe dieser Eier, abgesehen von den nahe verwandten Vögeln, auf diesem biologischen Wege zu differenzieren. Alle diese Beobachtungen beanspruchten ein umso größeres Interesse, als es auf chemischem Wege bisher nicht gelungen war, diese Eiweißkörper voneinander zu unterscheiden.

Ganz besonders wichtig war die von Uhlenhuth festgestellte Tatsache, daß die Reaktion außerordentlich fein und empfindlich ist, so daß der spezifische Nachweis von Eiweiß noch möglich war bei Verdünnungen von 1:100000, während die gebräuchlichen chemischen Eiweißreaktionen schon bei Verdünnungen über 1:1000 versagten.

Gelegentlich seiner Studien über die Unterscheidung der Eiweißstoffe der verschiedenen Vogeleier suchte dann Uhlenhuth der interessanten Frage näher zu treten, ob es nicht möglich sei, mit Hilfe dieser sehr feinen biologischen Methode Unterschiede nachzuweisen zwischen den Eiweißkörpern des Hühnereies und des Hühnerblutes. Um diese Frage zu entscheiden, wurden Kaninchen mit defibriniertem Hühnerblut eingespritzt. Es zeigte sich, daß das Serum der so vorbehandelten Kaninchen in einer stark verdünnten Hühnereiereiweißlösung erst nach längerer Zeit einen schwachen Niederschlag erzeugte, während in einer ebenso stark verdünnten lackfarbenen Hühnerblutlösung eine momentane starke Fällung zu beobachten war. Es war hiermit auf biologischem Wege bewiesen, daß eine gewisse Differenz zwischen den Eiweißkörpern des Hühnereies und des Hühnerblutes bestehen müsse. Die Beobachtung, daß in der Hühnerblutlösung bei Zusatz des spezifischen Serums ein starker Niederschlag auftrat, während alle anderen zur Kontrolle herangezogenen, stark verdünnten Blutlösungen der verschiedensten Tiere bei Zusatz dieses Serums absolut klar blieben, gab Uhlenhuth die Anregung zu der Ausarbeitung einer Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Blutarten. Eine solche Methode fehlte bisher in der gerichtlichen Medizin. Schon bei frischem Blut war der Nachweis der Herkunft außerordentlich unsicher und bei angetrocknetem Blut überhaupt nicht möglich.

Auf Grund der modernen Immunitätsforschung hatte bereits L. Deutsch eine Methode zur Unterscheidung von Menschen- und Tierblut ausgearbeitet, indem er die spezifischen, auf die erhaltenen roten Blutkörperchen wirkenden, von Bordet entdeckten Hämolysine als Reagens benutzte. So lieferten Kaninchen, die mit menschlichen Blutkörperchen vorbehandelt waren, Sera, die nur menschliche Blutkörperchen auflösten. Da diese Methode aber nur bei intakten roten Blutkörperchen gelingen kann, eine Voraussetzung, die in gerichtlichen Fällen meist nicht erfüllt ist, so hat sie eine praktische Bedeutung nicht erlangt.

Später haben Marx und Ehrnrooth die Tatsache, daß Blutkörperchen durch ein heterologes Serum zusammengeballt (agglutiniert) werden, für die forensische Praxis zu verwerten gesucht. Das Verfahren kann aber ebenfalls als eine zuverlässige Methode zur Unterscheidung von Menschen- und Tierblut, wie unten näher ausgeführt wird, nicht in Betracht kommen.

Das zuerst von Uhlenhuth und bald darauf auch von Wassermann und Schütze angegebene Verfahren hat dann die Frage der Blutdifferenzierung vom gerichtsärztlichen Standpunkte aus

endgültig gelöst; denn es zeigte sich, daß das Serum von Kaninchen, die mit Menschen- oder Tierblut wiederholt eingespritzt waren, nur in Lösungen der zur Vorbehandlung benutzten Blutarten, auch wenn das Blut lange Zeit angetrocknet gewesen war, einen Niederschlag erzeugte. Dieser von den genannten Autoren in die Praxis eingeführte forensische Blutnachweis ist dann besonders von Uhlenhuth weiter ausgestaltet und ausgebaut worden; Uhlenhuth konnte die verschiedensten Antisera erzeugen, um jederzeit in forensischen Fällen, wie sie ihm vorkamen, nicht nur Menschenblut, sondern auch andere Blutarten, die sich an irgend welchen Gegenständen fanden, zu erkennen.

Es gelang ihm auch zuerst, außer getrocknetem Blut, gefaultes, gefroren gewesenes und mit verschiedenen Chemikalien versetztes Blut, unter den verschiedensten Bedingungen der Praxis in Sand, Erde usw. nachzuweisen. Diese Methode, die berufen war, eine wichtige Lücke in der gerichtlichen Medizin auszufüllen, wurde durch zahlreiche Forscher bezüglich ihrer praktischen Brauchbarkeit nachgeprüft und in allen Einzelheiten anerkannt. Die Zahl der einschlägigen Arbeiten ist zu einer umfangreichen Literatur angewachsen. Sie sind unten ausführlich zusammengestellt und werden bei der folgenden ausführlichen Besprechung der forensischen Methoden eingehende Berücksichtigung finden. Besonders erwähnt seien die schönen Untersuchungen von Binda, Biondi, Dieudonné, Stern, Ziemke, Mertens, Minovici, Ogier, Stockis, Commentz, Nuttall, Graham-Smith, Sanger, Leblanc, Kister, Wolff usw.

Der beste, einwandfreiste Beweis für die praktische Brauchbarkeit des Verfahrens wurde von Uhlenhuth selbst dadurch erbracht, daß er zahlreiche ihm vom preußischen Justizminister zur Verfügung gestellte Asservate von abgelaufenen Kriminalfällen untersuchte, ohne vorher die Herkunft der an diesen befindlichen Blutflecken zu kennen. Nach Untersuchung dieser Gegenstände wurde das von ihm abgegebene Gutachten mit den bezüglichen Aktenangaben verglichen; in jedem einzelnen Falle konnte die richtige Diagnose gestellt werden, mochte es sich nun um Menschenblut oder um das Blut von Tieren handeln. Die Methode hat in zahlreichen Prozessen der Justiz bereits wichtige Dienste geleistet. In Preußen, Baden, Württemberg, Bayern, Elsaß-Lothringen und Österreich ist sie durch justizministerielle Verfügung offiziell in die gerichtsärztliche Praxis eingeführt und wird auch im Auslande ausgiebigst angewandt.

Forensisch wichtig und zugleich naturwissenschaftlich hochinteressant ist die Beobachtung, daß bei dieser biologischen Reaktion die verwandtschaftlichen Beziehungen unter den Tieren zum sichtbaren Ausdruck gelangen. So gibt z. B. ein Menschenblutantiserum eine deutliche Reaktion auch im Affenblut (Uhlenhuth, Wassermann, Stern). Dieser biologische Beweis für die Blutsverwandtschaft zwischen Menschen- und Affengeschlecht ist allen übrigen, die aus der Paläontologie, vergleichenden Anatomie und Entwicklungsgeschichte sich ergeben, würdig an die Seite zu stellen.

So findet die Deszendenzlehre, wie sie von Lamarck, Darwin und Haeckel begründet und aufgebaut ist, in dieser biologischen Reaktion eine sichtbare und feste Stütze.

Ähnliche Verwandtschaftsreaktionen bestehen bei Huhn und Taube (Bordet, Uhlenhuth), Pferd, Esel und Tapir (Uhlenhuth, Dürck), Fuchs und Hund, Ziege, Schaf und Rind (Uhlenhuth), Schwein und

Wildschwein (Uhlenhuth), sowie auch unter den Verwandten aus der Gruppe der Krustazeen (v. Dungern). Von besonderem Interesse sind in dieser Hinsicht die umfangreichen Untersuchungen von Nuttall, welcher an 900 verschiedenen Blutsorten mit 30 verschiedenen Antiseris 16000 Reaktionen angestellt und so die verwandtschaftlichen Beziehungen in der Tierreihe eingehend studiert hat. Aus diesen Untersuchungen seien besonders hervorgehoben die Beobachtungen, die er an 46 Affenblutsorten angestellt hat mit dem Ergebnis, daß ein Menschenblutpräzipitinserum das Blut der Affen der alten Welt stärker ausfällt als das Blut der Affen der neuen Welt. Zu denselben Ergebnissen gelangte Uhlenhuth, der die verwandtschaftlichen Beziehungen sogar bis zu den Halbaffen (Lemuren) verfolgen konnte. Diese Forscher hatten somit auf biologischem Wege die Annahme bestätigt, daß die Affen der alten Welt dem Menschen näher verwandt sind als die Affen der neuen Welt. Je weiter also die Tiere phylogenetisch auseinander stehen, um so schwächer wird die Reaktion.

Auf die neueren Arbeiten über die Differenzierung der verwandten Blutarten von Uhlenhuth, Hamburger, Weichardt, Friedenthal a. u. wird unten in einem besonderen Abschnitt näher eingegangen werden.

Die Untersuchungen von Uhlenhuth, Wassermann und Schütze hatten gezeigt, daß ein mit Menschenblut vorbehandeltes Kaninchen ein Serum liefert, das auch in allen möglichen eiweißhaltigen Organsäften des Menschen eine Präzipitinreaktion hervorruft. Es war das ja auch von vornherein anzunehmen, da in diesen Substraten Bluteiweiß vorhanden ist. Nun schien es aber doch geboten, einmal näher zu prüfen, ob nicht doch gewisse Differenzen zwischen dem Bluteiweiß und dem Eiweiß verschiedener Organe beständen. Daß eine Differenzierung verschiedener Eiweißstoffe einer Spezies bis zu einem gewissen Grade überhaupt möglich war, hatten schon die oben erwähnten Versuche von Uhlenhuth bewiesen, nach denen es gelang, die Eiweißkörper des Hühnereies und des Hühnerblutes zu unterscheiden. Uhlenhuth ist dann dieser Frage der Eiweißdifferenzierung bei ein und demselben Tiere in weiteren Untersuchungen noch etwas näher getreten. Es veranlaßte ihn hierzu auch die interessante Angabe von Hamburger bezüglich der Eiweißkörper der Kuhmilch. Dieser Autor filtrierte Milch durch Tonfilter und trennte mit Hilfe dieser von Schlossmann angegebenen Methode das Albumin von dem Kasein, indem nur das erstere den Filter passiert. Mit beiden auf diese Weise getrennten Eiweißlösungen immunisierte er Kaninchen und erhielt so ein albumin- und ein kaseinpräzipitierendes Serum, welches jedes für sich nur die zugehörige Eiweißlösung ausfällte. Für die Eiweißkörper der Kuhmilch waren diese Sera also streng spezifisch, sodaß sich mit demselben Kasein und Albumin desselben Substrates eines und desselben Tieres differenzieren ließen. Jedoch gaben beide Sera auch eine Reaktion in Rinderblutlösung; eine Tatsache, die besonders auffallend sein mußte, da ja nach unseren bisherigen Kenntnissen im Blute Kasein nicht vorkommt.

Umgekehrt konnte Meyer feststellen, daß durch Injektion von Rinderblutserum gewonnene Antisera in Kuhmilch keine Fällung hervorriefen. Nach Uhlenhuths Untersuchungen geben sehr hochwertige Blutantisera allerdings doch eine leichte Reaktion in der Milch, doch ist dieselbe nur äußerst schwach und mit der spezifischen Fällung nicht im entferntesten zu verwechseln.

Auch die übrigen Tier- und Menschenblutantisera geben, wie bereits oben erwähnt, in anderen zugehörigen Sekreten und Organsäften eine deutliche Reaktion, die um so stärker ist, je mehr Serumeiweiß oder diesem nahestehende Eiweißkörper in ihnen vorhanden sind. Es dürfte z. B. nicht möglich sein, durch ein Blutantiserum Blut von Aszitesflüssigkeit zu unterscheiden. Auch die Unterscheidung von Blut- und Spermaeiweiß derselben Species dürfte mit Hilfe der biologischen Methode nach unseren bisherigen Kenntnissen nicht gelingen.

Man versuchte nun weiterhin festzustellen, ob eine biologische Differenzierung der durch fraktionierte Ausfällung gewonnenen, chemisch reinen differenten Eiweißkörper möglich sei.

Leblanc und Ide glaubten experimentell erwiesen zu haben, daß durch Vorbehandlung mit Euglobulin, Pseudoglobulin und Albumin des Rinderblutserums streng spezifische nur auf die entsprechenden Eiweißkörper wirkende Präzipitine entstehen. Nach den Untersuchungen von Obermeyer und Pick, Rostoski und Umber, Oppenheimer, L. Michaelis, Landsteiner und Calvo gelingt es jedoch nicht, derartige spezifische Antikörper zu erzeugen; so war es ihnen nicht möglich, die chemisch rein dargestellten differenten Eiweißkörper des Hühnereies von einander zu unterscheiden, ebensowenig die aus Pferdeblutserum dargestellten chemisch reinen Eiweißkörper. Nach Ansicht von Uhlenhuth sind diese Ergebnisse darauf zurückzuführen, daß die chemischen Methoden der Reindarstellung der Eiweißkörper bisher noch nicht als vollkommen einwandfrei anzusehen sind. Denn es ist ohne weiteres klar, daß man nur dann völlig einwandfreie Resultate erzielen kann, wenn man sicher ist, daß die zur Vorbehandlung der Versuchstiere benutzten Eiweißkörper auch wirklich absolut reine Eiweißkörper darstellen.

Ascoli, der sich ebenfalls mit dieser wichtigen Frage beschäftigte, wandte zu ihrer Entscheidung die sogenannte Absättigungsmethode an, auf die unten näher eingegangen werden soll. Mit Hilfe dieser Methode wies er nach, daß die durch verschiedene Eiweißfraktionen einer Serumart gewonnenen Immunsera durch Zusatz der spezifischen Fraktion vollkommen „abgesättigt“ oder „erschöpft“ werden, daß aber der Zusatz einer anderen Fraktion nur eine teilweise Absättigung hervorzurufen imstande ist. Über ganz ähnliche Erfahrungen berichtet Michaelis. Zu entgegengesetzten Resultaten sind jedoch Obermeyer und Pick gelangt, so daß man heute die Frage, ob es mit Hilfe der Präzipitinmethode auf dem Wege der elektiven Absättigung gelingt, die chemisch differenten Eiweißkörper einer Serumart voneinander zu differenzieren, als noch nicht entschieden betrachten muß.

Ist eine einwandfreie biologische Differenzierung der chemisch isolierbaren Eiweißkörper bisher nicht gelungen, so ist eine solche aber nach den übereinstimmenden Angaben der Autoren bei gewissen Organeiweißsubstanzen eines und desselben Individuums wohl möglich.

Voraussetzung bei diesen Untersuchungen ist aber, daß man, um mit reinem Organeiweiß arbeiten zu können, vorher die Gewebe oder Zellen der in Frage kommenden Organe von den anhaftenden Bestandteilen des Serums befreit. Eine solche Trennung ist nur auf mechanische Weise möglich und kann daher nicht immer genau sein. Uhlenhuth bediente sich der Eiweißkörper des Hühnereies, denn hier lassen sich

die beiden spezifischen Eiweißsubstanzen, das Eiklar und das Eidotter, leicht und sicher voneinander trennen. Uhlenhuth ließ zu diesem Zweck das Eigelb nach Abgießen des Eiklars in einem mit flüssiger Gelatine gefüllten Wasserglase erstarren und konnte so nach Entfernen der obersten Gelatineschicht das Dotter mit einer Pipette völlig isoliert gewinnen. Mit einem durch Einspritzung solchen Hühnerdotters hergestellten Antiserum gelang es ihm leicht, den Dotter vom Eiklar biologisch zu unterscheiden. Ein ausgezeichnetes Untersuchungsmaterial für die Entscheidung der vorliegenden Frage schien Uhlenhuth in den Eiweißkörpern der Linse tierischer Augen gegeben zu sein. Zur Untersuchung dieser Eiweißkörper wurde Uhlenhuth angeregt durch die von ihm festgestellte Tatsache, daß die Kristallinse der einzige tierische Eiweißkörper ist, welcher mit dem zugehörigen Blutantiserum nicht reagiert. Während, wie bereits erwähnt, ein Menschenblutantiserum mit allen vom Menschen stammenden Organsäften einen Niederschlag hervorruft, bleibt eine Lösung von Kristallinseneiweiß des Menschen beim Zusatz dieses Serums vollkommen klar. Umgekehrt gab nun ein durch Einspritzungen von Linseneiweiß erzeugtes Antiserum nur in Linseneiweiß eine Reaktion, nicht aber in den zugehörigen Blutlösungen, auch nicht in Lösungen von Glaskörper und Kammerwasser. Damit war die interessante Tatsache festgestellt, daß zwei Eiweißkörper desselben Organismus — Blut- und Linseneiweiß — sich mit Sicherheit voneinander unterscheiden lassen. Diese Untersuchungen, die neuerdings von Roemer bestätigt sind, führten dann weiterhin zu der naturwissenschaftlich sehr interessanten Erkenntnis, daß die Kristallinsen aller Tiere bis herab zu den Fischen ein biologisch gleichartiges Eiweiß besitzen*). Kaninchen, die z. B. mit Rinderlinseneiweiß vorbehandelt sind, liefern ein Serum, das in gleicher Weise einen Niederschlag in dem Linseneiweiß des Schweines, Menschen, Huhnes, Frosches u. a., ja, der eigenen Linse (des serumliefernden Kaninchens) hervorruft, so daß hier das Gesetz der Artspezifität der biologischen Methode durchbrochen zu sein scheint. Wenn wir nach einer Erklärung für die Beobachtung suchen, so müssen wir berücksichtigen, daß die Linse ein rein epitheliales selbständiges Organ ist, welches der Zufuhr des für die betreffende Tierart spezifischen Bluteiweißes vollkommen entbehrt. Auch wäre es möglich, daß die Gleichmäßigkeit der Zusammensetzung durch die feine optische Funktion der Linse bedingt ist. Die Linse ist also gleichsam als artfremder Eiweißkörper des tierischen Organismus anzusehen.

Unter Berücksichtigung dieser Befunde versuchte Uhlenhuth durch Linseneinspritzungen bei Kaninchen Katarakt zu erzeugen, jedoch vergeblich. Es sei auch an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß Roemer diese Tatsache für eine neue Theorie der Entstehung, sowie auch für die Therapie des Kataraktes verwertet hat.

Bei Organen, bei denen sich eine so scharfe Trennung ihrer Eiweißsubstanzen von vornherein nicht durchführen ließ, wurde die Beobachtung gemacht, daß die entsprechenden Antisera massige Niederschläge gaben in den zur Vorbehandlung verwendeten Organextrakten, daß aber die Reaktion in den Lösungen anderer Organe schwächer und langsamer eintrat.

---

*) Auch mit der anaphylaktischen Reaktion konnte diese Tatsache bestätigt werden (Kraus und Doerr, Uhlenhuth und Andrejew).

Mit Hilfe der elektiven Absättigung war es dann auch möglich, Antisera zu gewinnen, die nur mit den homologen, nicht aber mit den Zellextrakten anderer Organe desselben Individuums Präzipitate lieferten. Auf diese Weise gelang es WEICHARDT und LIEPMANN, von einem Kaninchen, welches mit menschlichem Synzytialzelleneiweiß vorbehandelt war, ein Serum zu gewinnen, das nach Absättigung mit menschlichem Blut nur in Synzytialzelleneiweiß einen Niederschlag hervorrief.

FORSSNER ist es dann auf demselben Wege gelungen, Nieren- und Milzeiweiß vom Bluteiweiß des Meerschweinchens zu unterscheiden.

GRUND teilt ebenfalls mit, daß er Blut- und Organeiweiß mit Sicherheit von einander habe trennen können.

Vom forensischen Standpunkte besonders wichtig sind die Untersuchungen von A. KLEIN und H. PFEIFFER.

KLEIN fand, daß ein durch Hämoglobinlösungen erzieltes Antiserum ausschließlich bluthaltiges, artgleiches Material präzipitierte und daher eine Unterscheidung von Blut gegenüber allen anderen Eiweißkörpern ermöglichte. Diese Methode bedarf weiterer Nachprüfungen. Es ist allerdings noch ein ungelöstes Problem, Hämoglobin wirklich frei von allen fremden Eiweißsubstanzen völlig rein darzustellen.

H. PFEIFFER behandelte Kaninchen mit gewaschenen Samenzellen des Rindes und erhielt auf diese Weise Präzipitine, die nicht absolut spezifisch für die Zellgattung waren, wohl aber durch elektive Absättigung spezifisch gemacht werden konnten; jedoch ist es bisher nicht gelungen, hochwertige Sera für die Praxis herzustellen.

In jüngster Zeit will es C. BRUCK unter Verwendung schwacher zellspezifischer Immunsera mit Hilfe der Komplementbindungsmethode gelungen sein, selbst bei angetrockneten Flecken die verschiedenen Eiweißkörper (Blut, Eiter, Sperma) eines Individuums zu differenzieren.

Fassen wir die übereinstimmenden Angaben der letzterwähnten Arbeiten zusammen, so läßt sich sagen, daß eine biologische Differenzierung wenigstens gewisser Eiweißsubstanzen, besonders von Bluteiweiß eines und desselben Individuums unter gewissen Einschränkungen wohl möglich ist.

MARAGLIANO war der erste, der den Versuch gemacht hat, die Präzipitinreaktion für die Pathologie der Geschwülste zu benutzen. Er immunisierte Kaninchen mit Karzinomsaft und will ein Serum erhalten haben, mit welchem er Karzinomeiweiß mit Sicherheit habe nachweisen können.

KELLING will dann beobachtet haben, daß ein Extrakt aus menschlichem Magenkrebs mit einem Hühnereiereiweißantiserum einen spezifischen Niederschlag hervorruft. Er schloß hieraus, daß die Krebszellen nicht aus dem Organismus des Menschen, sondern aus dem des Huhnes ihre Herkunft ableiten. In anderen Fällen will KELLING eine Präzipitinreaktion des menschlichen Krebsgewebes mit Schweinepräzipitin erhalten haben. Außerdem berichtet er, daß krebskranke Menschen, infolge der Anwesenheit eines fremden Eiweißkörpers in ihrem Blutserum ein Präzipitin für dieses fremde Eiweiß enthalten, und zwar in einigen Fällen für Hühnereiweiß, in anderen für Schweineeiweiß. v. DUNGERN wies durch eine größere Versuchsreihe nach, daß sowohl in der Technik wie in den Voraussetzungen KELLINGS Irrtümer bestehen, und daß er weder praktisch noch theoretisch den KELLINGschen Anschauungen beipflichten könne.

In der menschlichen Pathologie dürften die Präzipitine in Anwendung zu ziehen sein für den Nachweis von Eiweißspuren im Urin, da, wie bereits oben erwähnt, die biologische Reaktion alle chemischen Proben an Feinheit übertrifft. Derartige Untersuchungen sind angestellt von Leclainche und Vallée, Mertens und Zülzer, welche nach Injektion von eiweißhaltigem Urin spezifische präzipitinhaltige Antisera erzeugten und zum Nachweis von Eiweiß benutzten.

Auch in der Sachverständigenpraxis hat die Differenzierung von Eiweißsubstanzen im Urin bereits Verwendung gefunden. So teilte Wegner einen Fall mit, in dem ein Mann, um eine Rente zu beziehen, seinen Urin mit Hühnereiweiß versetzt hatte, wie auf biologischem Wege festgestellt werden konnte.

Bei der außerordentlichen Feinheit und der Spezifität der biologischen Blutdifferenzierungsmethode lag es von vornherein nahe, diese Methode auch für die Fleischbeschau nutzbar zu machen.

Durch umfangreiche Untersuchungen hatte Uhlenhuth festgestellt, daß auch bei den verschiedensten jahrelang angetrocknet gewesenen Organen von Schweinen (Milz, Leber, Herz, Muskeln) die Reaktion noch positiv ausfiel, und daß somit die Herkunft dieser Organe noch genau ermittelt werden konnte. Diese Tatsache war für ihn der Ausgangspunkt zur Ausarbeitung einer Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Fleischsorten, wie sie für die Fleischbeschau von praktischer Bedeutung geworden ist.

Durch zahlreiche Versuche konnte gezeigt werden, daß das Serum eines mit Schweineblut vorbehandelten Kaninchens nur in einem Schweinefleischauszuge, eines mit Katzenfleisch vorbehandelten Kaninchens nur in einem Auszuge von Katzenfleisch usw. einen Niederschlag erzeugte. Es wurden dann weiterhin spezifische Sera für den Hammel- und Pferdefleischnachweis angegeben, indem gleichzeitig auf die eventuellen Verwandtschaftsreaktionen zwischen Pferde- und Eselfleisch, sowie zwischen Hammel-, Ziegen- und Rindfleich hingewiesen wurde. Die Wichtigkeit dieser Methode für die Untersuchung von Hackfleisch auf Beimengungen von Pferde-, Hunde- und Katzenfleisch ergibt sich danach von selbst. Es wurde ferner von Uhlenhuth die für die Fleischbeschau hochwichtige Tatsache festgestellt, daß der spezifische Nachweis auch noch in Räucherwaren gelingt; so konnte selbst an Jahre alten geräucherten Pferde- und Schweineschinken die Herkunft mit Sicherheit ermittelt werden. Ebenso gelang es durch die spezifische Reaktion die Herkunft von Pferde- und sonstigen Mettwürsten festzustellen, falls nicht die reaktionsfähigen Eiweißkörper, wie bei der Leberwurst, durch Kochen zerstört waren. Die Methode der Fleischuntersuchung, wie sie von Uhlenhuth und Jess angegeben und ausgearbeitet worden ist, fand durch weitere Arbeiten von Piorkowski, Nötel, Miessner und Herbst, von Riegler, Groening, Ruppin, W. A. Schmidt, Schütze, Weidanz, Wedemann, Borchmann, Fiehe u. a. volle Anerkennung und Bestätigung. Da es mit Hilfe der bisher gebräuchlichen chemischen und physikalischen Methoden nicht gelingen dürfte, Pferdefleisch geschweige denn Fleisch irgend eines Tieres mit Sicherheit nachzuweisen, besonders wenn es sich um Wurst und sonstige Fleischgemische handelt, — wie ad hoc von Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann angestellte Untersuchungen ergeben haben, — so steht zu erwarten, daß die biologische Methode in Zukunft noch mehr als

bisher für die praktische Fleischbeschau an Bedeutung gewinnen wird. Für die Auslandsfleischbeschau ist das biologische Verfahren zum Nachweis von Pferdefleisch seit dem 1. April 1908 gesetzlich vorgeschrieben (Centralbl. f. d. Deutsche Reich 1908, pag. 59).

Um zu prüfen, ob das Alter des Untersuchungsmaterials auf den Ausfall der biologischen Reaktion einen Einfluß ausübt, wurden zuerst von Uhlenhuth an ca. 40 Jahre alten mumifizierten Organen von Tieren und Menschen Untersuchungen angestellt. In diesen Fällen konnte er mit Hilfe des biologischen Verfahrens ihre Herkunft noch mit Sicherheit bestimmen. Da hiernach das Alter bei der Untersuchung derartigen Materials eine wesentliche Rolle nicht zu spielen schien, lag es nahe, auch die ältesten uns zur Verfügung stehenden Organe zum Gegenstand eingehender Untersuchungen zu machen. Es sind das bekanntlich die Mumien. So hat Uhlenhuth denn zuerst in Gemeinschaft mit Beumer eine mehrtausendjährige, ägyptische Mumie mit Hilfe der biologischen Reaktion untersucht, jedoch mit durchaus negativem Ergebnis.

v. Hansemann und Meyer behaupten dagegen, daß es ihnen gelungen sei, bei den von ihnen untersuchten, 3000—5000 Jahre alten Mumien auf biologischem Wege ihre Herkunft zu bestimmen; sie kommen auf Grund ihrer Resultate zu dem Schluß, „daß die Präzipitinreaktion selbst für mehrtausendjähriges Material nicht an Wirksamkeit verliert und daß sich durch die biologische Methode der menschliche Ursprung von Mumienmaterial nachweisen läßt".

Auf Grund dieser Behauptung wurden von Uhlenhuth die früheren Untersuchungen in dieser Richtung an 27 ägyptischen und peruanischen Mumien wieder aufgenommen, aber in keinem Falle, auch bei Anwendung der allerhochwertigsten Sera, erhielt er ein positives Resultat.

Selbst bei einer nur 300 Jahre alten Mumie erzielte Uhlenhuth ein negatives Ergebnis.

Ebenso ließ sich nach dem Vorgange von Beumer — der die Herkunft von Menschen- und Tierknochen, falls an ihnen noch lösliches Eiweiß vorhanden war, mittels der biologischen Methode bestimmen konnte — aus den alten Mumienknochen reaktionsfähiges Material nicht mehr extrahieren. Aus diesen Untersuchungen schloß Uhlenhuth, daß es im allgemeinen nicht gelingt, derartige mehrtausendjährige Mumien und prähistorische Knochenreste ihrer Herkunft nach zu bestimmen. Ob der negative Ausfall der Reaktion dadurch bedingt ist, daß die Eiweißsubstanzen infolge der Jahrtausende hindurch wirkenden äußeren Einflüsse erhebliche Schädigungen erlitten haben, oder daß die Eiweißkörper durch das sogenannte „Balsamieren" unlöslich geworden sind, entzieht sich bis jetzt noch unserer Beurteilung.

Die Ergebnisse Uhlenhuths sind neuerdings durch die ausgezeichneten Untersuchungen von W. A. Schmidt-Kairo bestätigt worden. Diesem Forscher gelang es in zahlreichen bis zu 6000 Jahre alten Mumien mit Hilfe der Biuretreaktion chemisch Eiweiß nachzuweisen; trotzdem erhielt er mit diesem keine Präzipitinreaktion, selbst wenn er ein nach seinem Verfahren hergestelltes menschliches Muskeleiweißantiserum benutzte. Er erklärt die auffallende Tatsache durch die Feststellung, daß

diese von ihm nachgewiesenen Eiweißstoffe albumosenartige Körper seien, und daß von echten koagulierbaren Eiweißstoffen nur Spuren darin vorhanden sind*). Er glaubt mit aus Mumienextrakten selbst hergestellten Antiseris vielleicht zum Ziele zu kommen. Nach seinen Angaben kann von „Balsamieren“ bei den prähistorischen Mumien keine Rede sein, da man ein derartiges Verfahren damals noch nicht kannte.

Eine weitere praktische Verwendung hat sodann die biologische Methode nach der von Wassermann und Schütze angegebenen Anweisung zur Unterscheidung der verschiedenen Milcharten gefunden, indem es nicht nur gelingt, die verschiedenen Milchsorten selbst in gekochtem Zustande (Schütze, Uhlenhuth) zu differenzieren, sondern auch, wie die Untersuchungen von Sion und Laptes beweisen, verschiedene Käsesorten ihrer Herkunft nach zu bestimmen. Weiter hat man dann spezifische Antisera gegen Peptone und Albumosen hergestellt (Myers, Pick, Spiro, Rostoki). Kowarski benutzte spezifische Sera, um die Albumosen der verschiedenen Mehlsorten zu unterscheiden. Er konnte feststellen, daß ein Immunserum für die Albumosen aus Roggen- und Gerstenmehl einen schwachen Niederschlag erzeugte, während in solchen aus Erbsenmehl keine Reaktion auftrat.

Schütze versuchte die verschiedenen Hefearten auf biologischem Wege zu unterscheiden, kam jedoch zu dem Resultat, daß die in der obergärigen, untergärigen, in der Getreide- und Kartoffelhefe enthaltenen Eiweißstoffe ihrer Natur nach gleichartig seien oder wenigstens einander außerordentlich nahestehen müssen. Gasis konnte die verschiedensten Pflanzeneiweißarten mit Hilfe spezifischer Sera unterscheiden. Schütze und Kowarski haben auf diesem biologischen Wege die Verschiedenheit von tierischem und pflanzlichem Eiweiß nachgewiesen. So hatte ein durch Injektion von Roboraten erzeugtes Antiserum eine präzipitierende Wirkung auf diese Roborate, gegen Muskeleiweiß war es wirkungslos. Piorkowski zeigte dann, daß das auf chemischem Wege nach der von Blumenthal angegebenen Methode hergestellte Muskeleiweiß des Pferdefleisches sich mit Hilfe eines spezifischen Serums von dem auf die gleiche Weise aus Rind- oder Hammelfleisch hergestellten Muskeleiweiß unterscheiden ließ. Es mag weiterhin noch hervorgehoben werden, daß v. Riegler ein spezifisches Serum zum Nachweis von Honig erzeugte; doch ist dabei zu betonen, daß ein solches Serum nicht durch Einspritzung von Honig an sich erzeugt werden kann, sondern durch die eventuell in ihm vorhandenen Eiweißkörper. Denn es ist experimentell festgestellt, daß Zucker, Stärke, Glykogen usw. zur Produktion von Präzipitinen nicht befähigt sind (Klein, v. Riegler, Uhlenhuth).

Auch für die Untersuchung von Nährpräparaten läßt sich das biologische Verfahren ausgezeichnet verwenden, so wiesen Uhlenhuth und Weidanz nach, daß Hämatogen (Hommel) und Hämoglobin Rindereiweiß enthält. Ebenso wie Gruber und Horiuchi (s. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 17) konnten auch sie feststellen, daß in dem Fleischsaft „Puro“, der aus Preßsaft von frischem Ochsenfleisch hergestellt sein soll, kein lösliches Rindereiweiß enthalten ist, sondern daß das chemisch nachweisbare Eiweiß aus Hühnereiweiß besteht. Zu denselben Ergebnissen kam unabhängig von den genannten Autoren W. A. Schmidt. Auch für die Untersuchung von fetthaltigem Gewebe

*) Auch mit Hilfe der Komplementbindungsmethode erzielten wir negative Resultate.

(Knochenmark, Butter, Margarine, Schmalz usw.), sofern in ihnen noch lösliches Eiweiß vorhanden ist, läßt sich das biologische Verfahren mit Vorteil verwenden (Uhlenhuth, Beumer, Weidanz, Schütze, Hüne).

Aus allen bisherigen Untersuchungen, die an dieser Stelle nur kurz skizziert werden konnten, geht hervor, daß wir erst im Beginn der biologischen Forschungen stehen und daß, obwohl sie bereits eine hohe Bedeutung für die Praxis gewonnen haben, doch noch viele Fragen zu lösen sind. Die Zukunft wird lehren, welchen praktischen Wert die Präzipitine in der Physiologie, Pathologie, der forensischen Medizin und der Nahrungsmittelchemie weiterhin erlangen werden.

Was die Natur und den Bau der bei der Reaktion beteiligten Körper, die quantitativen Verhältnisse, Hemmungen der Reaktion usw. anbetrifft, so sei besonders auf die Arbeit von R. Kraus „Über spezifische Niederschläge" (Präzipitine) in Kolle-Wassermanns Handbuch der pathogenen Mikroorganismen verwiesen.

Praktische Anwendung des biologischen Verfahrens.

Die praktische Anwendung des biologischen Verfahrens erstreckt sich in erster Linie

A. Auf die Erkennung und die Unterscheidung der verschiedenen Blutarten;

B. Auf den Nachweis verschiedener Fleischarten (Pferdefleisch usw.).

Es erscheint daher geboten, auf die Technik und Methodik in ausführlicher Weise einzugehen.

A. Technik und Methodik des biologischen Verfahrens zur Unterscheidung verschiedener Blutarten:

Da die biologische Methode nicht eine spezifische Blutprobe, sondern eine spezifische Eiweißreaktion ist, so ergibt sich die notwendige Konsequenz, daß zunächst der Nachweis von Blut als solchem erbracht sein muß.

Eine exakte forensische Blutuntersuchung zerfällt daher in zwei Teile:

1. den Nachweis von Blut,
2. die Bestimmung der Herkunft des Blutes.

Wenn es auch eigentlich über den Rahmen dieser Abhandlung hinausgeht, die chemisch-physikalischen Methoden für den Nachweis von Blut als solchem hier genau zu besprechen, so dürfte eine etwas ausführlichere Darlegung in diesem Zusammenhange dem Fachmanne doch erwünscht sein, da in der forensischen Praxis der chemisch-physikalische Blutnachweis von der biologischen Bestimmung der Art des Blutes nicht getrennt werden kann und in den meisten Lehrbüchern eine zusammenhängende Darstellung über den Gang beider Verfahren noch fehlt.

1. Der Nachweis des Blutes.

Allgemeines.

Die Untersuchung auf Blut beginnt mit der genauen Besichtigung der auf Blut verdächtigen Gegenstände. Hauptsächlich sind es Kleidungs- und Wäschestücke des mutmaßlichen Täters, sowie Werkzeuge, Äxte, Messer, Hämmer, Stöcke usw., seltener Möbelstücke, Wände, Tapeten, Türen, Fußböden, auch Bäume, Pflanzen, Erde, Steine, Schnee und Wasser, die der sachverständigen Prüfung zu unterziehen sind.

Die Farbe der Blutflecke ist bei ganz frischem Material gewöhnlich rot, bei älteren Flecken mehr braunrot; auch eine braune, braungrüne, olivengrüne, graue oder schwarze Farbe wird bei älteren Flecken beobachtet. Bei mit Wasser behandelten Blutflecken ist von einer Färbung makroskopisch häufig überhaupt nichts zu sehen.

Weit wichtiger noch wie die Farbe ist für die praktische gerichtliche Medizin die Form der Blutflecke, da sie in kriminalistischen Fällen wichtige Fingerzeige abgeben kann.

Um festzustellen, ob überhaupt auf Blut verdächtige Flecken vorhanden sind, empfiehlt es sich, die betreffenden Gegenstände im direkten auffallenden Sonnenlicht, oder, wenn dieses nicht vorhanden ist, in der Nähe des freien Lichtbogens einer elektrischen Bogenlampe (Kockel) zu betrachten. Etwaige Blutflecke erkennt man dann an einer matten rotbräunlichen Färbung. Durch Aufkratzen mit einer Nadel wird der bräunlichrote Farbenton noch deutlicher.

Wird dem Sachverständigen außer den schon erwähnten Gegenständen die ganze Garderobe eines Angeklagten mit dem Auftrage übergeben, nach Blutflecken zu suchen, dann muß alles eventuell unter Zuhilfenahme einer Lupe bei guter Beleuchtung sorgfältig durchsucht und jeder nur einigermaßen verdächtige Fleck auf Blut geprüft werden. Besonderer Aufmerksamkeit bedürfen dabei die Gegend der Knöpfe und Knopflöcher, sowie das Innere der Taschen. Die Kleidungsstücke sind an verdächtigen Stellen auseinanderzutrennen, dabei sind die Nähte, das Futter und das Zwischenfutter, sowie die hier oft anzutreffenden filzartigen Einlagen auf das Genaueste zu untersuchen. Bei kleinen Blutflecken, die besonders an der Wäsche deutlich wahrzunehmen sind, hat man daran zu denken, daß sie auch von Ungezieferexkrementen, in denen auch Menschenblut vorhanden sein kann, oder von Insektenstichen herrühren können. Bei größeren Blutflecken wird dies natürlich nie in Frage kommen.

Verdächtige Flecken an Messern, Beilen, Handwerkszeugen usw. werden nach genauer Besichtigung vorsichtig mit einem feinen Messer abgehoben oder abgeschabt; Blutkrusten blättern von Metall, wenn sie nicht angerostet sind, leicht ab. Obwohl die Instrumente nach der Tat meist sorgfältig gereinigt werden, bis äußerlich nichts Verdächtiges mehr zu bemerken ist, finden sich doch in der Regel noch Blutspuren in den Ritzen, Spalten und Fugen, z. B. in der Scharniergegend eines Messers oder zwischen Holzgriff und Eisen eines Hammers. Es müssen daher solche Instrumente vollständig auseinander genommen werden. Schießwaffen sind in ihre einzelnen Teile zu zerlegen. Von Stöcken ist die Zwinge abzunehmen, bei Hämmern, Hacken und Beilen ist der Stiel aus dem Öhr herauszuschlagen. Um bierbei die etwa abfallenden und abstäubenden Partikelchen zu sammeln, wird man solche Instrumente vorsichtig über einem Bogen weißen Papiers auseinander nehmen.

Zum Aufsuchen von Blutflecken, besonders auf dunklen und braunroten Stoffen und sonstigen Gegenständen, läßt sich die von Richter empfohlene Wasserstoffsuperoxydprobe mit Vorteil verwenden. Sie beruht auf der Tatsache, daß bei der Berührung dieses Reagens mit Blut eine weiße Schaumbildung — Katalyse (Entwicklung von O) — auftritt.

Tropft man einige Tropfen einer reinen Wasserstoffsuperoxydlösung (3 %) auf die verdächtige Stelle und tritt darnach keine Schaumbildung

auf, so gilt das als Beweis dafür, daß kein Blut vorhanden ist. Ist die Probe positiv, so kann der Fleck aus Blut bestehen. Da aber auch viele andere Substanzen — verschiedene Eiweißkörper, Eisenfeilspäne, organisches pflanzliches Material (UHLENHUTH) usw. — ebenfalls Katalyse hervorrufen, so muß zu weiteren Proben geschritten werden.

Bei genügend vorhandenem Material kann man noch als zweite Vorprobe die Guajak- oder Ozonprobe von VAN DEEN ansetzen. Sie beruht auf der Eigenschaft des Hämoglobins einem ozonisierenden Körper, wie altem sauerstoffreichen Terpentinöl den Sauerstoff zu entziehen, um ihn auf Guajaktinktur zu übertragen, worauf sich dieselbe bläut. Zur Ausführung der Reaktion kratzt man ein paar Körnchen von dem Blut ab. Ist das nicht möglich, z. B. bei Stoffen und Geweben, so genügt auch eine Stoff- oder Gewebsfaser; das so gewonnene Untersuchungsmaterial wird auf reines Fließpapier gelegt, mit Wasser befeuchtet und mit einem Glasstab gepreßt, bis sich auf dem Papier eine rötliche oder gelbe Färbung zeigt. Auf die verfärbte Stelle tropft man einige Tropfen Guajaktinktur*); fügt man weiterhin einen Tropfen alten sauerstoffreichen Terpentinöls hinzu, so wird bei Gegenwart von Blut eine intensive Bläuung des Fleckens auftreten. Eine Kontrolle empfiehlt sich mit dem Fließpapier allein, denn Fließpapier zeigt bisweilen an sich schon eine Bläuung bei Auftropfen der genannten Reagentien.

Die VAN DEENsche Reaktion ist sehr empfindlich, ist aber auch keineswegs dem Blute allein eigentümlich. Kleber, Kasein, Speichel, Milch, wässerige Pflanzenextrakte bläuen ebenfalls Guajaktinktur bei Terpentinölzusatz, ebenso Substanzen wie Eisenchlorid, Rost, Eisenvitriol, Kaliumpermanganat, Jodkali.

Ein weiterer Mangel der Guajakprobe besteht nach PUPPE darin, daß altes und unlösliches Blut die Reaktion nur gibt, wenn man es vorher in Eisessig gelöst hat. Außerdem sollen Temperaturen von 133° C dem Blut definitiv die Fähigkeit, das Ozon des Terpentinöls zu übertragen, nehmen; weiterhin gelingt die Reaktion bei alkalischen Hämatinlösungen nicht, wohl aber bei sauren. Die geringe Spezifität der Reaktion hatten schon LIMAN veranlaßt, sich dahin auszusprechen, daß der positive Ausfall der Terpentinguajakprobe nicht unter allen Umständen beweisend für das Vorhandensein von Blut sei, daß aber ihr negativer Ausfall die Anwesenheit von Blut ausschließe.

Nach dem positiven Ausfall dieser Vorproben empfiehlt es sich, die mikroskopische Untersuchung auf die charakteristischen Formelemente des Blutes vorzunehmen. Nur wenn es sich um alte Flecke handelt und sehr wenig Material vorhanden ist, auch nach den vorliegenden Akten Vogel- oder Fischblut nicht in Frage kommt, kann davon Abstand genommen werden.

Hat man eine frische Blutlösung vor sich, so ist der mikroskopische Blutnachweis leicht zu erbringen. Die Herstellung des Präparats erfolgt dabei so, daß man einen sehr winzigen Tropfen auf einen Objektträger bringt da sonst, die Schicht zu dick wird, und die Blutkörperchen so dicht aneinander gedrängt werden, daß die feinen Einzelheiten verschwinden.

*) Die Tinktur wird wie folgt hergestellt: 1 Teil frisches Guajakharz wird in 5 Teilen 90%igem Alkohol gelöst und nach einigen Tagen klar filtriert. Die Lösung ist vor Licht geschützt aufzubewahren. STRYZOWSKI stellt sich die Guajaktinktur aus fein zerteiltem Guajakholz, das mit 70%igem Alkohol übergossen wird und dann einige Tage dem Licht ausgesetzt wird, her.

Das Deckgläschen muß dann schnell und vorsichtig, ohne es hin und her zu schieben und ohne starken Druck auf den Objektträger gelegt werden. Handelt es sich um einen noch feuchten oder eben erst angetrockneten Fleck, so wird derselbe zweckmäßig mit physiologischer Kochsalzlösung (0,85 %ig) aufgeweicht. Betrachtet man das fertige Präparat unter dem Mikroskop, so läßt sich meist leicht feststellen, ob die Blutkörperchen rund oder oval sind, ob sie einen Kern haben oder nicht, selbst dann, wenn sie z. T. schon durch Verdunstung der Flüssigkeit zackige Ränder erhalten oder Maulbeerform angenommen haben. Im ersteren Falle handelt es sich um Säugetierblut, im letzteren um das Blut von Vögeln, Amphibien, Reptilien oder Fischen.

Schwieriger werden aber die Verhältnisse, sobald das Blut eintrocknet oder auch in durchlässiges Gewebe eingesogen ist. Hier müssen dann erst die geschrumpften und oft fest miteinander zu braunen, klumpigen Schollen verklebten Blutkörperchen wieder zur Quellung gebracht und möglichst von einander isoliert werden. Dies wird durch mehr oder weniger brauchbare Zusatzflüssigkeiten erreicht. Unter diesen ist nach unseren Erfahrungen als die brauchbarste die 32 %ige Kalilauge (Virchow) zu bezeichnen, ferner sind zu nennen die Roussinsche Flüssigkeit (Schwefelsäure 1,0, Glyzerin 3,0, destilliertes Wasser bis zum spezifischen Gewicht von 1,028), Hofmann-Pacinische Flüssigkeit (1 Teil Sublimat, 2 Teile Kochsalz, 100 Teile Glyzerin und 300 Teile Wasser), Puppesche Flüssigkeit (offizinelle Kalilauge und Formaldehyd zu gleichen Teilen), Marxsche Flüssigkeit (33 %ige Kalilauge und Chininum hydrochloricum zu gleichen Teilen) usw.

Zur Untersuchung bringt man auf den Objektträger etwas von der vorsichtig mit einem Messer oder einer Nadel abgeschabten Substanz des Fleckens, so daß das Deckgläschen eben etwas klafft, und läßt dann die Zusatzflüssigkeit zufließen.

Marx empfiehlt ganz besonders die 32 %ige Kalilauge, mit der er das Präparat versetzt und mehrere Stunden im Brutschrank bei 37 ° einwirken läßt. Er gibt an, daß es ihm auf diese Weise gelungen sei, aus 30—40 Jahre altem Blut noch vollkommen isolierte und wohl erhaltene Blutkörperchen darzustellen.

Bei auf Kleidungsstücken eingetrocknetem Blut empfiehlt es sich nach Schmorl, ein Stückchen des verdächtigen Fleckens herauszuschneiden, in Wasser aufzuweichen und dann in Hämatoxylin zu färben. Das gut differenzierte (1 % Salzsäurealkohol) mit Eosin (1 pro Mille) nachgefärbte Präparat wird 3—6 Stunden in Wasser ausgewaschen und nach vorheriger halbstündiger Härtung in Alkohol in Wasser zerzupft. Die isolierten Fäserchen werden in Glyzerin untersucht. Nach Schmorl ist das Verfahren besonders zur Differenzierung von Säugetier- und Vogelblut geeignet.

Weiter hat man versucht, Stückchen der blutbefleckten Kleidung, ähnlich wie Organstücke, in Paraffin (Däubler) oder Celloidin einzubetten und so gefärbte Schnittpräparate herzustellen. Diese Methode hat den Vorteil, daß sie etwaige zellige Beimischungen zum Blute leicht erkennen läßt; so ist es z. B. Kockel gelungen, in Schnitten durch Hemdenstoff, der mit Menstrualblut getränkt war, Blut, Plattenepithelien, Eiterkörperchen und Bakterien nachzuweisen. Kockel hält auch diese Methode für die Darstellung von Fibrin in Blutflecken für geeignet. Praktisch wäre das insofern wichtig, als das Menstrualblut stets sehr fibrinarm ist, eine Tatsache, die bei Fehlen der sonstigen Beimengungen des Menstrualbluts

(Platten- und Zylinderepithelien, Schleim) eine wichtige Stütze für die Annahme abgeben kann, daß die untersuchte Blutspur tatsächlich von Menstrualblut herrührt (RICHTER).

In den meisten Fällen wird man aber mit der mikroskopischen Untersuchung nicht mehr zum Ziele kommen. In alten Blutflecken sind die Blutkörperchen meist so deformiert, daß sie nichts charakteristisches mehr zeigen, sie können dann leicht zu Verwechslungen mit Schimmelpilzsporen, Hefezellen und besonders mit den so weit verbreiteten Weizenstärkemehlkörnern führen. Deshalb ist nach RICHTER und KOCKEL Voraussetzung für die Verwertung der mikroskopischen Befunde der Nachweis des Blutfarbstoffes, der durch die spektroskopische Untersuchung oder durch die Darstellung von Häminkristallen zu erbringen ist.

Stehen dem Sachverständigen geringe Mengen von Untersuchungsmaterial zur Verfügung, so wird man sich auf die TEICHMANNsche Häminprobe beschränken können, da für diese Reaktion die kleinsten Mengen genügen und die Reaktion bei positivem Ausfall den sicheren Nachweis von Blut liefert. Man verfährt hierbei folgendermaßen: Ein kleines Partikelchen der verdächtigen Substanz wird möglichst rein von der Unterlage losgelöst. Ist das beispielsweise bei eingetrocknetem Blut nicht möglich, so muß man das Material ausziehen. Soll der Auszug gleichzeitig für die biologische Reaktion mit verwandt werden, so kommen als Extraktionsmittel nur solche in Frage, die den Ausfall dieser Reaktion in keiner Weise zu schädigen oder auch nur zu hemmen imstande sind, das ist die 0,85 $^0/_0$ige Kochsalzlösung. Ein Tropfen der so erhaltenen Lösung wird auf einem Objektträger vorsichtig eingedampft. Der getrocknete Rückstand wird, ebenso wie das direkt durch Abkratzen erhaltene trockene Material, mit annähernd der gleichen Menge Kochsalz — ein zu reichlicher Kochsalzzusatz stört das mikroskopische Bild durch ein überreiches Aufschießen von Kochsalzkristallen — oder Jodnatrium innig gemischt und soweit zerdrückt, daß das aufgelegte Deckglas um Haaresbreite klafft. Aus einer Kapillarpipette läßt man von der Seite so viel Eisessig — derselbe muß durchaus wasserfrei sein, d. h. am Glasstabe brennen — zufließen, daß der Raum zwischen Deckglas und Objektträger ganz damit ausgefüllt ist. Man erwärmt, indem man entweder den Objektträger zwischen Zeigefinger und Daumen faßt und über die Sparflamme eines Bunsenbrenners hält, bis kleine Bläschen aufsteigen, oder indem man mit einem erhitzten Glasstab, den man unter dem Objektträger hin- und herführt, die Erwärmung vornimmt. Jede Überhitzung ist zu vermeiden, weil sonst das Deckgläschen mit der Substanz explosionsartig fortgeschleudert wird. Sobald die Bläschen entstehen, hält man den Objektträger etwas höher über die Flamme und läßt so die Flüssigkeit bis auf einen ganz schmalen Streifen allmählich verdunsten, fügt abermals Eisessig hinzu, läßt wieder möglichst langsam verdunsten und wiederholt dieses Verfahren mehrere Male, weil man auf diese Weise die Kristalle am schönsten zur Darstellung bringen kann. Beim letzten Eindampfen ist es vorteilhaft, die Flüssigkeit bis auf einen kleinen Rest vollständig zu vertreiben. Dieser verhindert das Abgleiten des Deckgläschens und bewirkt bei seinem ganz allmählichen Verdunsten die Bildung großer und gut ausgebildeter Kristalle. Die so erhaltenen Häminkristalle sind mahagonirot und rhombisch und zeigen eine tafel- oder stäbchenartige Gestalt. Neben großen Kristallen finden sich oft winzig kleine, die über das ganze Präparat ungleichmäßig verteilt sind, sie sind dort am meisten angehäuft, wo die letzte Flüssigkeit verdampfte, also gewöhnlich am Rande des Deckgläschens.

Den Teichmannschen sehr ähnliche Kristalle erhält man, wenn man das Kochsalz durch Brom- oder Jodkalium ersetzt. Die Jodhäminkristalle sind dunkler gefärbt, treten aber sonst in derselben Form auf. Strzyzowki hat folgende Vorschrift angegeben, wonach sich diese leicht und schnell erhalten lassen.

Ein Gemisch von je 1 ccm Eisessig, Wasser und Alkohol wird kurz vor dem Gebrauche mit 3—5 Tropfen reiner Jodwasserstoffsäure versetzt. Man bringt die verdächtige Substanz trocken auf einen Objektträger, bedeckt sie mit dem Deckgläschen, setzt die Lösung hinzu und kocht sie zweimal je 10 Sekunden auf. Selbst bei den geringsten Spuren, bis 0,025 mg Blut, können noch Jodhäminkristalle erhalten werden. Bei wasserlöslichen Blutspuren wird man einen Tropfen der filtrierten Lösung auf dem Objektträger eindampfen und dann den Rückstand wie oben beschrieben behandeln. Die Strzyzowskischen Jodhäminkristalle bilden sich leichter und schöner und sind nach Angabe von Dennstedt und Voigtländer besonders für die photographische Aufnahme geeignet.

Da die Häminreaktion aber öfters versagt, so ist ihr negativer Ausfall noch kein vollgültiger Beweis für die Abwesenheit von Blut. Während nach Kockel das Alter, sowie etwaige Fäulnis der Blutspuren ohne Einfluß auf den Ausfall der Häminprobe sind, so erhält man dagegen aus Blut, welches eine Stunde lang auf 140° C und darüber erhitzt worden war, keine Häminkristalle (Katagama, Hammerl). Nach v. Hoffmann soll die Reaktion durch die Anwesenheit von Fett, Seife und Rost ungünstig beeinfußt werden; nach Levin und Rosenheim wird dagegen die Kristallbildung durch Seife nicht beeinflußt, wohl aber durch längere und innige Berührung des Blutes mit oxydierendem Eisen. Nach den Untersuchungen von Max Richter ist die Schwierigkeit des Häminnachweises im wesentlichen bedingt durch die erschwerte Löslichkeit, welche auf Umwandlung des Hämoglobins in Hämatin basiert. Für derartige Fälle empfiehlt der Autor die blutverdächtige Substanz 12—14 Stunden mit Eisessig zu behandeln und dann erst die entstandene Lösung zur Vornahme der Häminprobe zu benutzen.

Die spektroskopische Untersuchung verdächtiger Flecke ist nach dem gegenwärtigen Stand der Wissenschaft für den Blutnachweis das wichtigste Hilfsmittel. Denn nach den umfangreichen Untersuchungen von Hammerl und Kockel läßt sich mit dem Spektralapparat nicht nur frisches, sondern auch altes, gefaultes, ausgewittertes und durch hohe Temperaturen verändertes Blut feststellen, selbst wenn sämtliche anderen Methoden im Stiche lassen. Jedoch ist wohl zu bemerken, daß die Blutlösung nicht zu stark verdünnt sein darf; es ist also eine immerhin größere Menge Blut zur Herstellung der zu untersuchenden Lösungen notwendig. Die Methode beruht bekanntlich auf der Eigenschaft des Blutes, in dünnen Lösungen von einem Spektralpparat gebracht, in dem entworfenen Spektrum charakteristische dunkle Linien, die sogenannten Absorptionsstreifen, hervorzurufen. Sie weisen je nach der Veränderung, die das Blut erlitten hat, gewisse Verschiedenheiten auf.

Was die erforderlichen Apparate anbelangt, so ist der beste Spektralapparat der von Steinheil modifizierte, von Bunsen und Kirchhoff angegebene, dreiarmige Apparat; für forensische Zwecke reicht jedoch auch ein anderer Apparat, das Spektroskop von Browning, vollkommen aus; seine Anwendung ist besonders dann zu empfehlen, wenn man mit dem Untersuchungsmaterial nicht zu sparen braucht. Handelt es sich um sehr dünne Lösungen, so empfiehlt

es sich, das BROWNINGsche Spektroskop in das von der Firma Schmidt & Hänsch angegebene Universalstativ einzuspannen und, ähnlich wie beim Mikroskop, die in einem Glaszylinder befindliche Lösung in möglichst dicker Schicht zu betrachten.

Um auch die winzigsten Blutspuren auf spektroskopischem Wege nachweisen zu können, wurde von ABBÉ ein Mikrospektroskop konstruiert, über dessen Brauchbarkeit die Meinungen der einzelnen Autoren sehr geteilt sind.

Die mit Hilfe des Spektroskops zu untersuchenden Lösungen müssen vollkommen klar sein; ist das einmal nicht der Fall, so müssen sie durch ein dichtes Filter oder mittels einer BERKEFELDschen Filterkerze klar filtriert werden. Bezüglich der Handhabung der einzelnen Spektralapparate sowie der Beurteilung des spektroskopischen Befundes sei verwiesen auf BAUMERTS Lehrbuch der gerichtlichen Chemie, II. Bd., auf das Handbuch der gerichtlichen Medizin von SCHMIDTMANN und auf das Praktikum der gerichtlichen Medizin von H. MARX.

Sowohl die Häminprobe wie die spektroskopische Prüfung sind jede für sich, wenn sie positiv ausfallen, als für die Gegenwart von Blut durchaus beweisend anzusehen.

Leider sind nun in der gerichtsärztlichen Praxis die Fälle nicht selten, in denen wegen der Winzigkeit der Spuren oder schädlicher Einflüsse (s. diese bei den einzelnen Methoden) der bestimmte Nachweis von Blut mit den angegebenen Methoden nicht geführt werden kann, trotzdem es sich nach dem ganzen Aussehen der Flecke, sowie der ganzen Sachlage des Falles nur um Blutflecken handeln kann. Gerade bei der Winzigkeit der Spuren tritt die biologische Methode mit ihren großen Vorzügen, der Sicherheit des Nachweises in völlig farblosen Lösungen, in denen mittelst der gebräuchlichen chemischen Methoden nicht die geringsten Spuren von Eiweiß und Blutfarbstoff mehr nachweisbar sind, besonders in ihr Recht, unter der Voraussetzung, daß hochwertige Antisera zur Verfügung stehen. Wenn auch hier betont werden muß, daß in diesen Fällen nur der Nachweis des in Frage kommenden Eiweiß geliefert ist, so wäre es bei dem Aussehen der Flecken, sowie den evtl. von dem Gericht bekannt gegebenen Vorgängen zu skrupulös gehandelt, wenn diese Flecke nicht mit der größten Wahrscheinlichkeit als Blutflecke bezeichnet würden.

2. Bestimmung der Art des Blutes.

Schon von Alters her hat man nach einer Methode zur Unterscheidung von Menschen- und Tierblut gesucht.

Bereits 1829 hatte BARUEL diesbezügliche Untersuchungen angestellt und gefunden, daß ein mit Schwefelsäure behandeltes Blut einen dem betreffenden Tiere eigentümlichen Geruch, ähnlich dem Schweißgeruch entwickelt. Da aber die Zuverlässigkeit dieser Methode allein von dem mehr oder weniger ausgebildeten Geruchsorgan des Sachverständigen abhängig ist und sich über den Geruch ebenso wie über den Geschmack bekanntlich streiten läßt, so hat dieses Verfahren begreiflicherweise eine praktische Bedeutung nicht erlangt.

Man hat dann versucht, auf Grund der mikroskopischen Beschaffenheit der roten Blutkörperchen, eine Differenzierung der einzelnen Blutarten zu ermöglichen. Bei Untersuchungen von frischen Blutsorten hat man auf diese Weise gefunden, daß bezüglich der Form und Größe der Blutkörperchen mehr oder weniger große Unterschiede

bestehen. So unterscheidet sich Menschen- und Säugetierblut von dem Blute anderer Wirbeltierklassen dadurch, daß ihre roten Blutkörperchen nicht elliptische, kernhaltige Gebilde darstellen, sondern runde, bikonkave, kernlose Scheiben. Die Blutkörperchen des Menschen übertreffen wieder die der anderen Säugetiere durch ihre Größe, obwohl die Differenz gegenüber einzelnen Säugetierarten nur eine geringe ist, sie beträgt z. B. zwischen Mensch und Hund noch weniger als den tausendsten Teil eines Millimeters.

Übersicht über die Größe der Blutkörperchen (nach Landois Lehrbuch der Physiologie, 10. Aufl., 1900, pag. 27).

Münzenförmige Blutkörperchen		Elliptische Blutkörperchen			
		kleiner Durchmesser		großer Durchmesser	
Elephant	9,4 μ	Lama	4,2 μ	Lama	7,5 μ
Mensch	7,5 μ	Taube	6,5 μ	Taube	14,7 μ
Hund	7,2 μ	Frosch	16,3 μ	Frosch	23,0 μ
Kaninchen	7,16 μ	Triton	19,5 μ	Triton	29,3 μ
Katze	6,2 μ	Proteus	35,6 μ	Proteus	58,2 μ
Schaf	5,0 μ				
Ziege	4,25 μ				
Moschustier	2,5 μ				

Bei der Untersuchung ganz frischer Blutflecken, die dem Gerichtsarzt naturgemäß sehr selten zur Begutachtung vorgelegt werden, ist immerhin noch eine gewisse vorsichtige Beurteilung möglich, wenn sehr zahlreiche Messungen an den in ihren Größenverhältnissen verschiedenen Blutkörperchen vorgenommen werden. Es gelingt z. B. nach einiger Übung, bei frischem Blut die zur Bestimmung vorgelegten Blutarten des Menschen und Schafes bezüglich ihrer Herkunft zu bestimmen. Ganz unsicher aber werden die Bestimmungen, wenn es sich um Blutsorten handelt, die bezüglich der Größe ihrer Blutkörperchen denen des Menschen sich nähern, wie z. B. des Kaninchens und Hundes.

Nun handelt es sich aber in der gerichtsärztlichen Praxis fast ausnahmslos um angetrocknetes Blut. Wie oft ist da schon wegen der Vergänglichkeit der roten Blutkörperchen die Frage nicht zu entscheiden, ob überhaupt ein Blutfleck vorliegt; ob diese Blutkörperchen aber von einem Menschen oder Tier herstammen, diese Frage läßt sich selbst nach Anwendung der bekannten Zusatzflüssigkeiten nicht entscheiden, denn es ist nicht möglich, den Grad der Schrumpfung und der Aufquellung durch die Lösungsmittel sicher zu berechnen, handelt es sich doch hier um Verschiedenheiten in der Größe der Blutkörperchen, die, wie wir gesehen, nur wenige Mikromillimeter betragen.

Auch hat man versucht, die Form der Hämoglobinkristalle als ein weiteres differentielles Merkmal für die Erkennung der einzelnen Blutarten zu verwerten. von Dvornitschenko sowie Moser — die neuerdings die alten Versuche von Hüffner, Misuracas, Moncton-Copemans usw. wieder aufgenommen haben — wird angegeben, daß die Hämoglobinkristalle des Menschen ziemlich groß sind und meist in rechtwinkligen, breiten Platten auftreten, während die Hämoglobinkristalle verschiedener Tierblutsorten mehr nadelförmige Gebilde darstellen, die oft in Büschelform angeordnet sind. Was die Kritik dieser Methode anbe-

trifft, so ist es nach KOCKEL wohl möglich, daß auf diesem Wege gelegentlich einmal ermittelt werden kann, ob Menschen- oder Tierblut vorliegt; da aber die zur forensischen Blutuntersuchung kommenden Blutspuren oft sehr klein, häufig verwittert, durch Wasser zerstört oder sonst wesentlich verändert sind, so werden sich der Darstellung der Hämoglobinkristalle meist unüberwindliche Hindernisse entgegenstellen. Es wird daher dieses Verfahren für die forensische Blutuntersuchung kaum in Frage kommen.

Größere Beachtung verdienen die Untersuchungen, die MAGNANIMI sowie ZIEMKE auf Grund älterer Beobachtungen von KÖRBER und KRÜGER ausgeführt haben. Die genannten Forscher haben festgestellt, daß das Oxyhämoglobin des Menschen unter Einwirkung von Kalilauge sich wesentlich später zersetzt als das Oxyhämoglobin zahlreicher anderer Säugetiere. ZIEMKE hat diese Eigenschaft des Blutes zuerst praktisch verwandt, indem er zu zwei kolorimetrisch gleichwässerigen Lösungen von Menschen- und Tierblut verdünnte Kalilauge zusetzte und diese dann spektroskopisch beobachtete.

Neuerdings hat VAN ITALLIE eine weitere Differenzierungsmethode zwischen Menschen- und Tierblut angegeben. Sie beruht auf der Beobachtung, daß durch Erhitzen des Blutes bei bestimmten Temperaturen die bekannte katalytische Wirkung auf Wasserstoffsuperoyd vernichtet werden soll.

Er fand, daß das Blut von Menschen und Affen nach halbstündiger Erhitzung auf 63 ⁰ noch Katalyse hervorrief, während das bei Blut von Pferden, Rindern, Schweinen, Ziegen, Schafen, Kaninchen, Ratten, Hasen, Hühnern, Tauben, Fischen bei gleicher Behandlung nicht der Fall war. Die gleichen Resultate erzielte er bei Untersuchung von alten auf Leinewand angetrockneten Blutflecken. Die zuerst von UHLENHUTH*) und dann auf seine Anregung von DASKE weiter fortgeführten Untersuchungen haben, ebenso wie diejenigen von FRAENKEL und PFEIFFER, die Angaben VAN ITALLIEs nicht bestätigt. Bei einer ganzen Anzahl von angetrockneten Tierblutproben hatte das H_2O_2 zersetzende Blut nach halbstündiger Erhitzung auf 63 ⁰ noch eine erhebliche katalytische Kraft; so besonders das Blut von Schwein, Wildschwein, Hirsch, Iltis, Ratte, Eule, Gans, Taube (DASKE), andererseits hatte auch Menschenblut bisweilen seine katalytische Kraft verloren.

Aus diesen Befunden ergibt sich znr Genüge, daß die Methode VAN ITALLIEs für die forensische Differenzierung von Menschen- und Tierblut nicht ernstlich in Frage kommen dürfte.

Wie bereits oben erwähnt verfuhr L. DEUTSCH bei der Unterscheidung von Menschen- und Tierblut in der Weise, daß er Kaninchen mit menschlichen Blutkörperchen vorbehandelte und die auf diese Weise gewonnenen hämolytischen Sera auf das zu untersuchende Blut einwirken ließ. Handelte es sich um Menschenblut, so wurden die roten Blutkörperchen aufgelöst. Da diese Methode aber nur bei intakten roten Blutkörperchen gelingen kann, eine Voraussetzung, die in gerichtlichen Fällen wohl nie erfüllt ist, so hat sie eine praktische Bedeutung nicht erlangt.

Weiterhin haben MARX und EHRNROOTH die Tatsache, daß Blutkörperchen durch ein heterologes Serum agglutiniert werden, für die

*) XV. Intern. med. Kongreß zu Lissabon, April 1906.

Unterscheidung von Menschen- und Tierblut zu verwerten gesucht. Sie verfahren folgendermaßen:

„Von dem Untersuchungsmaterial wird durch Zusatz einiger Tropfen 0,6 %iger Kochsalzlösung eine möglichst konzentrierte Lösung hergestellt. Die Extraktion muß lange genug, oft 24—72 Stunden, erfolgen, um eine genügend konzentrierte Lösung zu erhalten. Ein der eigenen Fingerkuppe entnommener Tropfen Blut wird etwa 5—6 Sekunden mit der Untersuchungslösung auf dem Objektträger gemischt und dann mit einem Deckglas bedeckt. Ist nun in der zu prüfenden Lösung Menschenblut oder Affenblut, so tritt keine Veränderung der Blutkörperchen ein, handelt es sich dagegen um Tierblut, so klumpen sich die Blutkörperchen schnell zu kleinen Häufchen zusammen."

Wie die Autoren ausdrücklich angeben, ist der positive Ausfall der Reaktion an eine konzentrierte Blutlösung gebunden. Abgesehen davon, daß es in der Praxis, besonders bei älteren Blutflecken, sehr häufig nicht gelingt eine genügend konzentrierte Blutlösung zu erhalten, so haben auch die Untersuchungen Uhlenhuths bei mehreren 2—3 Jahre alten Rinderblutproben Mißerfolge zu verzeichnen gehabt. Seine weiteren orientierenden Versuche mit frischem Rinderserum zeigten dann auch, daß einzelne dieser Sera nur bis zu einer Verdünnung von 1:20 und erst nach einer Stunde eine Agglutination hervorriefen; ähnliche Beobachtungen machte Uhlenhuth auch bei Pferdeserum. Andererseits erwiesen sich mehrere 6—7 Jahre steril aufbewahrte Pferdesera noch gut wirksam. Martin hat dann diese Untersuchungen an alten von Uhlenhuth aufbewahrten Blutproben fortgesetzt und weiterhin bestätigen können, daß angetrocknete Tierblutproben schon nach verhältnismäßig kurzer Zeit ihre agglutinierenden Eigenschaften verlieren können. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Agglutinine variable Faktoren sind, die bald stärker, bald schwächer wirken und die auch im angetrockneten Blute im Laufe der Zeit zugrunde gehen können.

Außerdem kommt es auch nicht selten vor, daß das menschliche Blutserum auch Blutkörperchen anderer Individuen agglutiniert (Ascoli, Landsteiner und Richter). Diese sogenannten Isoagglutinine, auf die mit Rücksicht auf die Marx-Ehrnroothsche Methode Martin und Galli-Valerio u. a. aufmerksam gemacht haben, sollen nach den Angaben von Marx sich im günstigsten Falle ca. 2—4 Wochen im angetrockneten Blute halten. Martin hat sie jedoch in einem Falle noch nach mehreren Jahren nachweisen können. Die genannten Tatsachen, die zu Täuschungen Veranlassung geben können, sind sehr wohl zu beachten.

Das Marx-Ehrnroothsche Verfahren kann also als ein zuverlässiges Verfahren zur Unterscheidung von Menschen- und Tierblut nicht in Betracht kommen; als orientierende Vorprobe kann es jedoch immerhin herangezogen werden.

Eine sichere Unterscheidung von Menschen- und Tierblut, überhaupt die Feststellung einer bestimmten Blutart, ist erst durch die von Uhlenhuth für forensische Zwecke ausgearbeitete Methode ermöglicht, wie sie im folgenden ausführlich beschrieben werden soll.

Gang des biologischen Verfahrens*).

a) Vorversuch zur Bestimmung der Wirksamkeit des spezifischen Serums.

Die Verarbeitung des Untersuchungsmaterials für die biologische Methode ist erst dann in Angriff zu nehmen, wenn der Untersucher sicher ist, ein brauchbares spezifisch wirkendes Serum zu besitzen und nachdem er sich in einem Vorversuch von seiner Wirksamkeit überzeugt hat. Die Vorprüfung wird im Gegensatz zur Titerbestimmung (s. pag. 815) nicht mit genau hergestellten Verdünnungen und nicht ausschließlich mit Serum vorgenommen, sondern, um möglichst der Praxis gleiche Verhältnisse zu schaffen, mit angetrocknetem Blut. Zu diesem Zwecke soll sich jeder, der sich mit der Ausführung von Untersuchungen mittels der biologischen Methode beschäftigt, angetrocknetes Blut vorrätig halten. Zur Gewinnung desselben kann man sich der Antrocknungsmethode in Petrischalen (Uhlenhuth), auf Fließpapier, Gaze, Leinewand oder in Sand bedienen. Die Eintrocknung auf Fließpapier oder Gaze hat den Vorzug, daß eine schnellere Auslaugung stattfindet, und daß die so gewonnenen Lösungen immer klar sind (Nuttall). Ferner wird man zur Vermeidung großer Altersunterschiede gut tun, wenigstens bei den leicht zu beschaffenden und für forensische Fälle vorzugsweise in Frage kommenden Blutsorten, wie Menschen-, Rind-, Pferde-, Schweine-, Hammel-, Reh-, Hasen-, Ziegen-, Hunde- und Kaninchenblut, von Zeit zu Zeit (alle 4—6 Wochen) frisches Blut in der oben geschilderten Weise zu konservieren. Diejenige Blutart, auf welche das Untersuchungsmaterial geprüft werden soll, wird dann zur Vorprüfung benutzt. Zur Herstellung der genügenden Bluteiweißlösung wird eine geringe Menge des angetrockneten Test-Blutmaterials in ein gewöhnliches Reagenzglas gebracht und hierzu etwa 5 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung gesetzt. Ohne zu schütteln bleibt das Gemisch so lange stehen bis eine genügende Menge Eiweiß in Lösung übergegangen ist. Man erkennt das daran, daß beim Schütteln eines vorsichtig in ein zweites Reagenzglas übergegossenen Probequantums (2 ccm) eine längere Zeit stehenbleibende Schaumbildung auftritt. Ist das der Fall, so wird auch der Rest der Lösung in das zweite Röhrchen gegossen; beim Übergießen hat man, besonders wenn man angetrocknetes Blut benutzt hat, zu vermeiden den noch nicht ganz aufgelösten Bodensatz aufzurühren. Die so gewonnene Lösung ist dann auf ihre Klarheit zu prüfen. Sollte sie nicht ganz klar sein, so muß sie filtriert werden und zwar genügt hier in fast jedem Falle ein Papierfilter.

Da für die biologische Reaktion eine Verdünnung des Untersuchungsmaterials von etwa 1:1000 verlangt wird, so hat man natürlich auch bei der Vorprobe diesen Konzentrationsgrad herzustellen. Man erkennt die geforderte Verdünnung, abgesehen von der beim Schütteln entstehenden Schaumbildung, an dem Ausfall der mit einer kleinen Menge von etwa 1 ccm unter Zusatz eines

---

*) Wir halten uns im allgemeinen an die von Uhlenhuth und Beumer gegebenen Vorschriften.

Tropfens 25 %iger Salpetersäure angestellten Kochprobe. Es entsteht nämlich bei dieser Reaktion in einer Verdünnung von 1:1000 eine leicht opaleszierende Eiweißtrübung. Da nun die ausgelaugte Bluteiweißlösung im allgemeinen konzentrierter ist, so muß sie so lange mit steriler 0,85 %iger Kochsalzlösung verdünnt werden, bis die Salpetersäurekochprobe den richtigen Grad der Verdünnung von annähernd 1:1000 angibt.

Für die Ausführung der Serumprüfung, wie überhaupt der biologischen Reaktion, benutzt man zweckmäßig das von Uhlenhuth und Beumer angegebene Reagenzglasgestell (Fig. 1). Es ist so eingerichtet, daß es für 12 kleine Reagenzröhrchen von je 11 cm Länge und 0,9 cm

Fig. 1. Reagensglasgestell nach Uhlenhuth und Beumer.

Durchmesser Platz hat. An ihren offenen Enden haben die Röhrchen nach außen umgebogene Ränder, so daß man sie in den Löchern des Gestells pfeifenartig aufhängen kann. Der Übersichtlichkeit halber sind die Löcher, in welche die Röhrchen hineingehängt werden, mit Nummern von 1—12 versehen. Das Aufhängen der Röhrchen hat den Vorteil, daß man die am Boden des Röhrchens auftretende Präzipitinreaktion gut beobachten kann.

W. A. Schmidt benutzt für die Ausführung der biologischen Reaktion ein ähnliches kleines Gestell (Fig. 2), nur hängen hier die einzelnen Röhrchen nicht, sondern werden in Vertiefungen der unteren Querplatte gestellt. Um die am Boden der Röhrchen auftretende Trübung gut zu erkennen, sind die Röhrchen mit verdickten Kuppen von 1—2 cm Höhe versehen. Die untere Querplatte des Gestells trägt eine Klammer, um ein Blatt Papier zum Aufschreiben der Befunde zu fixieren.

Für die Serumprüfung werden 3 gleichmäßig dicke und absolut saubere Reagenzröhrchen ausgesucht und in das Gestell hineingehängt. Im durchfallenden Licht, indem zwischen Lichtquelle und Reagenzglasgestell ein schwarzes Brettchen oder dgl. gehalten wird, sind die leeren Röhrchen vor Ansetzen jeder biologischen Reaktion nochmals auf ihre Sauberkeit zu prüfen. Denn nicht selten kann man gerade bei ganz neuen Röhrchen beim Übergang in die Kuppe einen horizontalen grauweißen Ring, der bei nicht sorgfältiger Herstellung der Gläschen entstehen soll, beobachten. Dieser kann dann leicht eine schwache spezifische Reaktion vortäuschen.

Mit einer sterilen Pipette wird in Röhrchen 1 und 2 je 1 ccm der verdünnten Blutlösung gebracht, während Röhrchen 3 mit demselben Quantum steriler Kochsalzlösung (0,85 %) beschickt wird. Mit einer sterilen graduierten Pipette (1 ccm mit 100 Teilstrichen) werden zu Röhrchen 1 und 3 je 0,1 ccm des zu prüfenden absolut klaren Antiserums gesetzt, während in Röhrchen 2 0,1 ccm normales, ebenfalls vollständig klares Kaninchenserum gegeben wird. Ohne zu schütteln wird die Reaktion im durchfallenden Lichte betrachtet. Tritt nun in Röhrchen 1 sofort oder spätestens nach fünf Minuten eine hauchartige, in der Regel am Boden beginnende Trübung auf, die sich nach weiteren fünf Minuten

Fig. 2. Reagensglasgestell nach W. A. Schmidt.

in eine wolkige umwandelt und sich weiterhin als Bodensatz absetzt, während die Lösungen in den beiden übrigen Röhrchen völlig klar bleiben, so ist das Serum brauchbar. Die bei Zimmertemperatur ausgeführte Reaktion soll spätestens nach 20 Minuten abgeschlossen sein (s. pag. 749).

b) Behandlung des Untersuchungsmaterials zwecks Prüfung mittels der biologischen Methode.

Die auf fester Unterlage eingetrockneten Blutflecke werden mit einem reinen sterilen Instrument abgekratzt, indem man zweckmäßig einen großen Bogen weißen Schreibpapiers als Unterlage benutzt. Die pulverisierte Masse wird vorsichtig in ein steriles Reagenzröhrchen geschüttet und mit 0,85 %iger Kochsalzlösung zur Auflösung gebracht. Hat man nur ganz geringe Spuren von Material, so kann man auch Wachs um den Fleck her-

umlegen und in der so gebildeten Mulde den Fleck mit Hilfe von Kochsalzlösung auflösen. Andere Lösungsmittel wie 0,85 %ige Kochsalzlösung sind nicht zu verwenden.

Von vielen Autoren sind eine ganze Reihe anderer Lösungsmittel empfohlen worden. Uhlenhuth und Beumer haben fast alle vorgeschlagenen Flüssigkeiten einer sorgfältigen Prüfung unterzogen. Bei diesen Untersuchungen zeigte es sich, daß beliebiges Blutserum zu Leitungswasser getropft, sofort eine Trübung, bisweilen sogar einen Niederschlag hervorrief. Diese Trübung, die die Autoren auf Ausfällung von Globulinen zurückführten, war bei den verschiedenen Serumsorten verschieden stark. Ganz besonders eklatant war sie bei Zusatz von Pferde-, Schaf- und Rinderserum. Auch Kaninchenserum erzeugte in Leitungswasser eine, wenn auch schwächere, so doch deutliche Trübung. Ganz ähnlich wie Leitungswasser verhielt sich das destillierte Wasser und $^1/_{10}$ physiologische Kochsalzlösung (Strube), wenn auch die Trübung geringer war, wenigstens bei Zusatz von normalem Kaninchenserum. Auch 0,1 %ige Natr. bicarbon.-Lösungen (Kratter) geben mit Serum vom Pferd und Rind versetzt leichte Trübungen; bei Kaninchenserum wurden diese nicht beobachtet. 1 bis 2 %ige Natr. bicarbon. Lösungen, 2 %ige Boraxlösungen sowie 0,1 % ige Sodalösung (Ziemke), konzentrierte Cyankalilösung blieben ebenso wie die physiologische (0,8 %ige) und doppeltphysiologische (1,6 %ige) Kochsalzlösung klar. Es zeigte sich ferner, daß in den Borax-, Natr. bicarbon.- und Sodalösungen, sowie in den Cyankaliumlösungen beim Kochen eine Ausfällung der Eiweißkörper des zugesetzten Serums nicht stattfand; etwas vermindert war dieselbe auch in Aqua destillata. Diese Verhältnisse entsprechen völlig dem chemischen Gesetz, daß die Ausfällung der Eiweißkörper an einen bestimmten Salzgehalt und bestimmte Reaktion gebunden ist. Ähnliche Verhältnisse bestehen auch, wenn angetrocknetes Blut in solcher Flüssigkeit aufgelöst wird. Eine Lösung von Blut in 0,1 %iger Soda- sowie Boraxlösung gerinnt beim Kochen nicht. Was nun aber von geradezu ausschlaggebender Bedeutung ist, das ist die Beobachtung, daß auch in Soda- und Boraxlösung die biologische Reaktion bei Zusatz des Antiserums zwar eintritt, daß sie aber ganz wesentlich bezüglich der Intensität und Schnelligkeit des Auftretens beeinträchtigt wird, eine Tatsache, die vollkommen mit der Beobachtung übereinstimmt, daß die Präzipitine sich in Alkalien auflösen (Tchistowitch). Aus allen diesen Erfahrungen geht hervor, daß diese Flüssigkeiten für die Auflösung von Blutflecken unter allen Umständen verworfen werden müssen.

Handelt es sich dagegen um Material, welches in die Unterlage eingesogen ist, wie in Kleidungsstücke, Leinewand usw., so wird der Fleck herausgeschnitten, mit der Schere möglichst fein zerkleinert, mit Nadeln zerzupft und in einem kleinen Schälchen oder im Reagenzglase möglichst mit geringer Menge physiologischer 0,85 %iger steriler Kochsalzlösung übergossen. Bei diesem Verfahren gewinnt man gewöhnlich bereits nach einer Stunde eine vollständige Auflösung der eingetrockneten Eiweißkörper. Handelt es sich um altes Material, so dauert die Auslaugung erheblich länger, bisweilen bis zu 24 Stunden. Es ist dann, um Bakterienwachstum möglichst zu verhindern, nötig, die auszulaugende Flüssigkeit in den Eisschrank zu stellen.

Die genügend ausgelaugte Flüssigkeit wird dann filtriert. Die Filtration erfolgt zunächst mit gehärteten Papierfiltern (Schleicher und Schüll, Nr. 575, 603 oder 605) und wenn erfolglos durch Berke-

FELDsche Kieselgur-Filter (siehe unten). Bei geringen Mengen von Untersuchungsflüssigkeit verwendet man vorteilhaft die von uns empfohlenen Mikrofiltrierabfüllapparate (Fig. 3 u. 4). Man gebraucht dabei die von SILBERSCHMIDT angegebenen Kerzen aus Kieselgur. Die engporigen Porzellanfilter sind weniger zu empfehlen, denn sie haben den Nachteil, daß ein Quantum des präzipitabelen Eiweißes zurückgehalten, und daher die Niederschlagbildung eine geringere wird.

Der Apparat besteht aus der Kerze (*a*), die mittels einer Gummikappe mit der Saugflasche (*b*) in Verbindung steht; das seitliche Ansatzrohr (*c*) sowie die Absaugevorrichtung entspricht genau den weiter unten bei der Filtration beschriebenen Angaben. Das untere zu einem Röhrchen ausgezogene Ende des Sauggefäßes ist genau graduiert, so daß die Flüssigkeit hier direkt gemessen und steril entnommen werden kann. Will man den mit umgeschmolzener Hülle versehenen Abfüllhahn (*d*) vermeiden, so braucht man den Apparat nur in der Weise zu modifizieren (Fig. 4), daß man das graduierte Röhrchen mittels Druckschlauchs und Schraubenquetschhahn (*d*) mit dem Abflußrohr (*g* bzw. *e*) verbindet.

Fig. 3. Mikrofiltrierabfüllapparat nach UHLENHUTH und WEIDANZ.

Fig. 4. Modifizierter Mikrofiltrierabfüll-Apparat nach UHLENHUTH und WEIDANZ.

Auftretende Schaumbildung beim Schütteln ist das Zeichen einer für die Reaktion brauchbaren Lösung. Nicht immer gelingt es, diese Schaumbildung hervorzurufen, besonders, wenn der Fleck längere Zeit Sonne und Staub ausgesetzt gewesen, auf fettiger Unterlage angetrocknet oder auch an Eisen angerostet war. Es kann die mangelnde Schaumbildung darauf beruhen, daß nicht genügend Eiweißstoffe in Lösung übergegangen sind, oder daß in derselben außerdem noch Stoffe vorhanden sind, die eine Schaumbildung verhindern wie z. B. Fett. Auch in den ersteren Fällen ist die Reaktion nicht aussichtslos, wenn wir ein hochwertiges Serum benutzen, denn ein den von UHLENHUTH gestellten Anforderungen genügendes Serum ist imstande, selbst noch in Verdünnungen von 1 : 20 000 nach 5 Minuten eine deutliche Reaktion auszulösen (siehe Anhang).

In ganz analoger Weise wie bei der Vorprobe wird auch von der zu untersuchenden Auslaugungsflüssigkeit eine Eiweißverdünnung von etwa 1 : 1000 hergestellt. Ist das geschehen, so muß möglichst bald die biologische Prüfung vorgenommen werden, denn die Aufbewahrung des Extraktes etwa bis zum nächsten Tage ist nicht angängig wegen des die Flüssigkeit trübenden Bakterienwachstums. Die von LOELE empfohlene Konservierung der Blutauszüge mit einer Formalinkalklösung, ist auf Grund der Nachprüfungen von MERKEL nicht zu empfehlen.

Zugleich mit der Vorbereitung des Untersuchungsmaterials werden aus Partikelchen von an- resp. eingetrocknetem Blute die Kontrollösungen

in derselben Weise hergestellt, und zwar wählt man hierzu Blutlösungen irgendwelcher Haustiere. Handelt es sich bei der Untersuchung um einen auf einem Stoff eingetrockneten Blutfleck, so hat man noch eine weitere Kontrollösung nur aus dem in Frage kommenden Stoff herzustellen.

Vor dem Ansetzen des Versuches sind die einzelnen Lösungen auf ihre Reaktion gegen Lackmuspapier zu prüfen. Die Lösungen sollen neutral reagieren. Stark sauere oder stark alkalische Lösungen sind zu verwerfen, kommen praktisch auch wohl bei der starken Verdünnung der Untersuchungsflüssigkeit kaum vor. Reagieren sie ausnahmsweise sauer, so werden sie mit 0,1 % Sodalösung neutralisiert. W. A. Schmidt wendet als Neutralisationsmittel für die Untersuchungslösung Magnesiumoxyd an.

Nachdem sämtliche Lösungen hergestellt sind, kann zur Ausführung der biologischen Reaktion geschritten werden. Als allgemeiner Arbeitsgrundsatz ist zu beachten, daß alle Gefäße und Instrumente peinlich sauber und steril, und daß sämtliche Flüssigkeiten, die bei der Ausführung der Methode benutzt werden, absolut klar sind. Die Sterilität der Gefäße und Instrumente ist notwendig, um eventuell anhaftende fremde Eiweißsubstanzen durch die Hitze zu zerstören. Es ist zu beachten, daß die Röhrchen infolge häufiger Sterilisation in trockener Hitze zahlreiche außerordentlich feine Unebenheiten aufweisen können, die falls sie sich in größerer Menge an der Kuppe des Glases befinden, eine beginnende spezifische Trübung vortäuschen können.

Fig. 5. Kapillarpipette.

c) Ausführung der biologischen Reaktion.

Behufs Ausführung der biologischen Reaktion werden in das kleine Reagenzglasgestell (pag. 744, Fig. 1) sechs bzw. sieben möglichst gleich dicke und gleich lange Röhrchen gehängt; sie sind auf dem Holzgestell mit Nummern eins bis sieben bezeichnet.

In Röhrchen I und II werden mit einer Pipette je 1 ccm der zu untersuchenden Blutlösung gebracht. Röhrchen III und IV werden mit je 1 ccm der Kontrollblutlösungen beschickt. In Röhrchen V wird 1 ccm steriler 0,85 %iger Kochsalzlösung gegossen. Zur Herstellung der letzten Kontrolle wird in Röhrchen VI 1 ccm der beim Vorversuch gewonnenen Blutlösung gegeben, d. h. einer dem zugehörigen Antiserum entsprechenden Blutlösung. Als weitere Kontrolle würde in einzelnen Fällen dann noch Röhrchen VII mit einem Auszuge des in Frage kommenden Stoffes beschickt werden.

Zu den einzelnen mit je 1 ccm Lösung gefüllten Röhrchen, wird mit Ausnahme von Röhrchen II je 0,1 ccm von dem im Vorversuch geprüften Antiserum mit einer graduierten Pipette (1 ccm mit 100 Teilstrichen) zugesetzt, während in Röhrchen II 0,1 ccm normales vollständig klares Kaninchenserum gegeben wird.

Zeigt das Antiserum in den Aufbewahrungsröhrchen einen Bodensatz, so läßt sich dasselbe mit dieser Pipette nicht entnehmen, ohne den Bodensatz aufzurühren. Man bedient sich in solchen Fällen zweckmäßig einer Kapillarpipette (Fig. 5), mit der es leicht gelingt, das Serum, ohne den Bodensatz aufzurühren, bis auf den letzten Tropfen aufzusaugen. Diese Pipette stellt man sich durch Ausziehen eines Glasrohres von 5 mm Durchmesser über einer Gebläselampe leicht her. Hat man die Pipette vor

dem Aufziehen des Serums genau kalibriert, so kann man 0,1 ccm desselben direkt in die einzelnen mit Untersuchungs- und Kontrollflüssigkeiten beschickten Röhrchen abtropfen lassen. Das Kalibrieren der Pipetten geschieht in der Weise, daß man vorher mit einer dünnen genau graduierten Pipette 0,1 ccm Kochsalzlösung in ein Uhrschälchen oder in einen Färbeklotz bringt, die Flüssigkeit dann mit der Kapillarpipette vollständig aufsaugt, langsam abtropfen läßt und die Tropfen zählt. Die Anzahl der Tropfen (gewöhnlich 6) entspricht dann etwa 0,1 ccm.

Beim Zusetzen des Serums zu den einzelnen Flüssigkeiten hat man darauf zu achten, daß es möglichst an der Wand des Reagenzröhrchens herunterfließt und nicht direkt auf die Flüssigkeit getropft wird. Das zugesetzte Serum sinkt in der Regel als spezifisch schwerer zu Boden. Die Röhrchen dürfen nach dem Serumzusatz nicht geschüttelt werden, weil sonst die beginnende Reaktion nicht so deutlich in die Erscheinung tritt.

Die Reaktion soll bei Zimmertemperatur nicht im Brutschrank vor sich gehen. Zu einer Untersuchung soll stets nur der Inhalt eines Röhrchens, nicht dagegen eine Mischung des Inhaltes mehrerer Röhrchen verwandt werden. Man hat nämlich wiederholt beobachtet, daß Menschenantisera, die von verschiedenen Kaninchen stammten, zusammengemischt Präzipitate geben (Obermeyer und Pick, W. A. Schmidt u. a.).

Beurteilung des Befundes.

Wenn die Reaktion als positiv gelten soll, so muß sofort oder spätestens nach 2 Minuten die Reaktion als hauchartige Trübung am Boden der Röhrchen I und VI sichtbar sein. — Ist die Schichtung sehr vorsichtig erfolgt, so zeigt sich die Trübung in Form eines deutlich sichtbaren Ringes an der Berührungsschicht zwischen Untersuchungsflüssigkeit und Serum. — Innerhalb der ersten 5 Minuten muß sich die hauchartige Trübung in eine mehr wolkige verwandeln, die sich dann nachweiteren 10 Minuten als flockiger Bodensatz absetzt. Während die angegebene Niederschlagbildung in Röhrchen I und VI erfolgt, müssen die Kontrollröhrchen II, III, IV, V resp. VII im Verlauf der gesamten Untersuchungszeit vollkommen unverändert klar bleiben. Später etwa entstehende Trübungen, die nach 20 Minuten auftreten, dürfen als positive Reaktion nicht aufgefaßt werden. Um die Reaktion in der geschilderten Weise beobachten zu können, dürfen die Röhrchen, wie oben erwähnt, nicht geschüttelt werden. Zur besseren Beobachtung der Trübung werden die Röhrchen bei durchfallendem Tages- oder künstlichem Licht betrachtet, indem zwischen Lichtquelle und Reagenzglas ein schwarzes Brettchen oder desgl. gehalten wird.

Neuerdings ist von Dürck ein Apparat angegeben, der eine bessere Beobachtung schwacher Trübungen ermöglicht.

„Die Vorrichtung beruht im wesentlichen auf der vollständigen Auslöschung aller Reflexe an den Wandungen der runden Uhlenhuthschen Röhrchen durch Eintauchen derselben in Zedernholzöl. Da das Zedernöl bekanntlich den gleichen Brechungsindex hat wie Glas, so ist ein mit Zedernöl gefülltes Röhrchen, welches man in ein weiteres Zedernöl enthaltendes Glasgefäß taucht, überhaupt nicht mehr sichtbar. Befindet sich in dem Röhrchen irgend eine andere Flüssigkeit, so werden allerkleinste Trübungen oder in dieser suspendierte Teilchen mit großer Deutlichkeit

sichtbar, weil der Lichtreflex an den äußeren Wandungen des Röhrchens ausgelöscht ist. Auf dem gleichen Prinzip beruht bekanntlich unsere homogene Ölimmersion, nämlich auf einer Vermeidung des Lichtverlustes an der Trennungsfläche verschieden lichtbrechender Medien. Bei dem in Rede stehenden Apparat wird das Zedernöl in ein langes Glaswännchen eingefüllt, welches aus gut verkitteten Spiegelglastafeln besteht. Die hintere, die beiden seitlichen und die untere Glastafel sind außen geschwärzt zur Vermeidung störender Reflexe, nur die vordere ist durchsichtig. Dieses Wännchen paßt genau in ein Reagenzglasgestell für 12 Uhlenhuthsche hängende Reagenzröhrchen. Das Gestell ist derartig eingerichtet, daß der Boden, auf welchem das Wännchen zu stehen kommt, durch eine einfache Triebvorrichtung in die Höhe gehoben und in jeder Höhe fixiert werden kann. Ist der Doppelboden, auf welchem das Wännchen zu stehen kommt, nach abwärts gestellt, so hängen die Röhrchen frei in der Luft und ihr Inhalt kann im durchfallenden Licht beurteilt werden. Stellt man den Doppelboden und dadurch das Wännchen mit Hilfe des Triebes nach oben, so tauchen alle 12 Röhrchen auf einmal in das Zedernöl ein, jedoch so, daß sie auch bei allerhöchster Stellung den Boden des Wännchens nicht berühren. Um nun auch noch das von oben her in das Zedernholzöl einfallende Licht möglichst auszuschalten, ist das Wännchen oben mit einem Metalldeckel bedeckt, welcher genau den herabhängenden Röhrchen entsprechende und entsprechend weite Öffnungen trägt. Diese sind zum weiteren Lichtschutze nach oben mit einer Art von Trichter versehen, so daß bei dem Emporsteigen des Wännchens jedes Röhrchen genau durch den Trichter und durch die Öffnung in dem geschwärzten Metalldeckel in das Zedernöl hineingeleitet wird.

Die Anwendung des Apparates geschieht in der Weise, daß man nach Füllung des Wännchens mit Zedernöl, Beschickung der Röhrchen und Ausführung der Reaktion das Wännchen hoch stellt und dann das volle Licht von einem gut beleuchteten Fenster durch die Spiegelglasplatte hindurchfallen läßt. Man stellt sich also mit dem Rücken gegen die Lichtquelle und beobachtet im auffallenden Lichte.

Der kleine Apparat wird vielleicht auch für die Ausführung von spezifischen Agglutinationsproben sowie für die Beobachtung feiner chemischer auf der Bildung von Niederschlägen beruhender Reaktionen gute Dienste leisten können."

Der Apparat wird von der Firma Winkel in Göttingen angefertigt.

Um alle Fehlerquellen bei dem biologischen Verfahren sicher auszuschließen, sind, wie aus der obigen Anweisung hervorgeht, unbedingt 5 resp. 6 Kontrollen notwendig.

Die Kontrolle, Röhrchen II — Zusatz von normalem Kaninchenserum zu der Untersuchungslösung — die absolut klar bleiben muß, hat den Zweck, nachzuweisen, daß die in Röhrchen I etwa beginnende Trübung nicht auf allgemein physikalische Einwirkung infolge von Kaninchenserumzusatz zu beziehen ist.

Die Kontrollen, Röhrchen III und IV, in denen kein Niederschlag entstehen darf, beweisen, daß die in dem Untersuchungsröhrchen sich etwa bildende Präzipitation durch eine spezifische Wirkung des zugesetzten Serums hervorgerufen wird.

Eine der wichtigsten Kontrollen ist die Kontrolle mit der zur Verdünnung der einzelnen Lösungen gebrauchten physiologischen Kochsalzlösung, Röhrchen V; ihr Klarbleiben nach dem Zusatz des in Frage kommenden Antiserums beweist, daß einmal

das zur Verwendung gekommene spezifische Serum vollkommen klar ist und nicht opalesziert und daß außerdem die 0,85 %ige Kochsalzlösung nicht schon an und für sich beim Zusatz des spezifischen Serums Trübungen bildet, wie das z. B. beim Leitungswasser der Fall sein würde.

Die Kontrolle, Röhrchen VI — Zusatz von spezifischem Serum zur der homologen Blutlösung — dient nur zum Vergleich mit Röhrchen I und gibt nochmals über die Wirksamkeit des Antiserums Aufschluß.

Die Kontrolle, Röhrchen VII liefert uns endlich den Beweis, daß der Stoff, in dem das Blut eingesogen ist, nicht bereits für sich allein bei Zusatz des Antiserums eine Trübung hervorruft.

Um die Reaktion in der angegebenen Weise ausführen zu können, ist es nötig, mindestens 2 ccm der zu untersuchenden Lösung herzustellen, nämlich je 1 ccm für Röhrchen I und II. Das Verhältnis zwischen den Flüssigkeiten und dem zuzusetzenden Antiserum, welches etwa 1 : 10 beträgt, hat sich nicht als unbedingt notwendig, wohl aber als praktisch erwiesen. 1 ccm von den zu untersuchenden Lösungen zu verwenden ist insofern vorteilhaft, als man schon bei dieser Menge die allmählich vom Boden des Röhrchens aufsteigende Trübung gut beobachten kann.

Stehen ganz kleine Mengen von Untersuchungsmaterial zur Verfügung, so bedient man sich mit großem Vorteil der Kapillarmethode.

Für diese Methode genügen die kleinsten Mengen der zu prüfenden Blutlösung und zwar bereits die Bruchteile eines Tropfens. Die Methode wird nach Hauser in der Weise ausgeführt, daß man zuerst eine entsprechende Anzahl von Kapillarröhrchen sorgfältig reinigt, indem man sie mit destilliertem Wasser füllt und über einer kleinen Flamme auskocht. Fast alle Kapillarröhrchen zeigen an der Innenwand zahlreiche weißliche kristallinische Ausscheidungen, welche auf diese Weise, namentlich durch die beim Kochen auftretende Explosionen, am besten beseitigt werden. Nur völlig gereinigte, auch bei Lupenbetrachtung klare Kapillarröhrchen sind für den Versuch zu verwenden.

Die genau bezeichneten Kapillarröhrchen werden durch Kapillarattraktion mit den zu untersuchenden Lösungen bis zu einer beliebigen Höhe von etwa 2—5 cm gefüllt; an der Flüssigkeitsgrenze werden die Röhrchen mit einer Marke (Fettstift) versehen. Die so gefüllten Kapillaren werden, nachdem das untere Ende sorgfältig mit Seidenpapier abgetrocknet worden ist, einstweilen horizontal so auf ein Glasbänkchen gelegt, daß das gefüllte Ende frei über dessen Rand herausragt. Hierauf bringt man mit einem sterilisierten Kapillarröhrchen ein kleines Tröpfchen des spezifischen Serums auf einen gereinigten Objektträger und saugt (durch Kapillarattraktion) davon, indem man das Serum durch Neigen des Objektträgers an den Rand laufen läßt, derartig eine kleine Menge in eines der zu beschickenden Röhrchen an, daß das Serum ohne Dazwischentreten einer Luftblase und ohne sich mit der in dem Röhrchen befindlichen Lösung zu vermengen, mit dieser in unmittelbare Berührung kommt. Man muß deshalb auch vermeiden, daß von der Lösung etwas aus dem Röhrchen ausfließt und sich mit dem Serum auf dem Objektträger vermengt. Das gelingt sehr leicht, wenn man bei starker Neigung des Objektträgers das Kapillarröhrchen fast bis in die Horizontale bringt; geht man unter diese

herunter, so fließt das spezifisch schwerere Serum, sich mit der Lösung vermengend, zu weit in das Kapillarröhrchen hinein. Wurde richtig verfahren, so bleibt das Serum am Grunde des Röhrchens und nimmt hier genau so viel Raum ein, als durch das Ansaugen des Serums die Flüssigkeit in dem Röhrchen über die Marke gestiegen ist. Nach Ansaugen des Serums wird das untere Ende des Kapillarröhrchens wieder sorgfältig von dem außen etwa noch anhaftenden Serum gereinigt, das Röhrchen dann sogleich wieder steil gehalten, unten durch Anpressen eines Wachskügelchens verschlossen und in ein kleines, mit einer Watteschicht ausgelegtes Bechergläschen gestellt. In dieser Weise werden sämtliche mit dem Serum zu versetzenden Röhrchen behandelt, wobei für jedes Röhrchen stets wieder ein frisches Tröpfchen Serum auf einen neuen Objektträger gebracht wird. An der Berührungsstelle von spezifischem Serum und Blutlösung bildet sich bei positivem Ausfall der Reaktion oft schon nach mehreren Sekunden bei Zimmertemperatur in der Blutlösung an der Grenze zwischen der Lösung und Serum eine ringförmige, grauweiße, weithin sichtbare Trübung, die allmählich immer intensiver wird und sich dabei mehrere Millimeter nach oben in die Blutlösung herein fortsetzt und schließlich zu dem gleichen flockigen Niederschlag führt, wie er bei der ersten Methode beobachtet ist..

Fig. 6. Reagenzglasgestell nach Carnwath.

Neuerdings ist von Carnwath unter Uhlenhuths Leitung diese Methode etwas modifiziert worden. Das Verfahren ist folgendes:

Die winzigen Blutspuren werden mit etwa 0,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung in der oben angegebenen Weise extrahiert. Ob die für die biologische Reaktion genügende Menge Eiweiß in Lösung übergegangen ist, kann man daran erkennen, daß die durch das Hineinblasen von Luft in die Untersuchungsflüssigkeit entstehenden Blasen etwa $^1/_2$ Minute stehen bleiben. Die hieran jetzt anzuschließende Salpetersäurekochprobe wird so ausgeführt, daß man in einem sterilen Kapillarröhrchen etwas Untersuchungsflüssigkeit bis zur Höhe von etwa 2 cm aufzieht, dann das Röhrchen, nachdem die Flüssigkeit einige Zentimeter höher aufgezogen, an dem unteren Ende zu schmilzt. Durch Hineintauchen der Kapillare in kochendes Wasser wird nunmehr die Untersuchungsflüssigkeit ebenfalls zum Sieden gebracht. Nunmehr wird das zugeschmolzene Ende abgebrochen und die erhitze Eiweißlösung auf einem reinen Objektträger mit etwa dem vierten Teil 25 $^0/_0$ iger Salpetersäure zusammengebracht und gut gemischt. Tritt hierbei eine leicht opaleszierende Trübung auf, so ist die für die Reaktion vorschriftsmäßige Verdünnung erhalten.

Zur Ausführung der Reaktion benutzt man ein kleines Metallgestell, welches für 10 Röhrchen von 2 mm Durchmesser und 6 cm Länge Platz hat (Fig. 6). Die Röhrchen stellt man sich jedesmal vor Ansetzen der Reaktion aus einem gereinigten Glasrohr selbst her. In die

einzelnen Röhrchen werden bis zu einer Höhe von etwa 3 mm zuerst die in Frage kommenden Sera zugesetzt. Man bedient sich hierzu zweckmäßig der oben beschriebenen Kapillarpipette (s. Fig. 5). Dann überschichtet man die einzelnen Sera vorsichtig mit der Untersuchungsflüssigkeit und den einzelnen Kontrolllösungen ebenfalls bis zu einer Höhe von 3 mm. Bei positivem Ausfall der Reaktion tritt dann genau wie bei der HAUSERschen Methode an der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeiten ein deutlicher Ring auf, der sich nach oben immer mehr verbreitert, um sich später als flockiger Niederschlag in der Kuppe des Röhrchens anzusammeln. Bei dieser Methode kann man bequem mit 0,1 ccm Untersuchungsflüssigkeit auskommen.

Trotz der außerordentlichen Feinheit der angeführten biologischen Methoden kann es doch einmal vorkommen, daß es bei einem Blutfleck, der als solcher diagnostiziert ist, nicht gelingt, die für die biologische Reaktion notwendige Eiweißmenge auszulaugen. Es wird das besonders dann der Fall sein, wenn die löslichen Eiweißkörper des Untersuchungsmaterials durch hohe Temperaturen in unlösliche Modifikationen übergeführt oder durch Fäulnis oder stark wirkende Substanzen zerstört sind. Sind in einem solchen Material aber nur noch die geringsten Mengen löslicher unveränderter Eiweißkörper vorhanden, so ist die biologische Methode noch nicht aussichtslos. Konnten doch UHLENHUTH und BEUMER selbst bei stinkenden Blutproben, welche 2 Jahre im Reagenzglase der Fäulnis überlassen waren, in den meisten Fällen noch positive Resultate erzielen.

Was den Einfluß des Alters des Blutes auf dèn Ausfall der biologischen Reaktion betrifft, so haben die Untersuchungen ergeben, daß selbst bei über 50 Jahre alten Blutflecken noch mit Sicherheit die Herkunft festgestellt werden konnte.

Bei gleichzeitigem Vorhandensein mehrerer Blutarten ist selbstredend die Anwendung der verschiedenen Antisera notwendig. Die Diagnose ist auch bei Gegenwart mehrerer Blutarten möglich und zwar kann aus der Mischung mehrerer Blutarten jede einzelne für sich in dieser Mischung erkannt werden.

Nach SACHS und BAUER soll für die Differenzierung von Blut in Eiweißgemischen die Methode der Komplementablenkung (s. später) besonders geeignet sein.

Wie verhält es sich nun mit der Leistungsfähigkeit der Präzipitinmethode in der forensischen Praxis? Ist vor allem die Methode so zuverlässig, daß man von ihrem Ausfall Leben und Tod eines Menschen abhängig machen kann?

Diese Frage ist absolut zu bejahen. Die Einwände, die anfangs von einigen Autoren (KISTER und WOLFF, STRUBE, KRATTER) erhoben wurden, daß auch in „heterologen" Blutlösungen Trübungen durch Zusatz des Antiserums entstehen könnten, die immerhin wenigstens den Unerfahrenen zu irrtümlichen Deutungen Veranlassung geben könnten, haben UHLENHUTH und BEUMER zu zahlreichen Nachprüfungen veranlaßt. Ihr Urteil über heterologe Trübungen ist folgendes:

1. Wird die Untersuchung in der von ihnen angegebenen Weise angestellt, so entstehen keine heterologen Trübungen.

2. Heterologe Trübungen sind hervorzurufen, wenn konzentrierte Blutlösungen bei erheblichem Zusatz hochwertigen Antiserums verwendet werden.

3. Die in starken Blutlösungen nach längerem Stehen selten auftretenden Trübungen können keinen Zweifel bezüg-

lich der Sicherheit der Untersuchungsmethode aufkommen lassen, da sie bezüglich der Intensität und Schnelligkeit des Auftretens mit spezifischen Trübungen nicht im entferntesten zu verwechseln sind.

Im übrigen sind sie auch nach Ansicht aller Autoren leicht zu vermeiden, indem man entweder eine konzentriertere Blutlösung und ein schwach wirkendes Antiserum (1:100) wählt, wie das von Kister und Wolff und Strube bereits festgelegt ist, oder aber, was rationeller ist, indem man eine schwache Blutlösung nimmt und ein hochwertiges Antiserum (Uhlenhuth). Die letzte Methode ist entschieden der ersten vorzuziehen und zwar deshalb, weil sie den praktischen Verhältnissen viel mehr entspricht, denn erfahrungsgemäß handelt es sich sehr häufig nur um winzige Blutspuren, aus denen nur eine sehr schwache Eiweißlösung zu gewinnen ist. Die Voraussetzung ist aber bei der letzten Methode ein hochwertiges Serum. Nuttall hat bei 16000 auf diese Weise ausgeführten biologischen Reaktionen niemals heterologe Trübungen gesehen, die zu Verwechslungen hätten Anlaß geben können. Da Kister und Weichardt sehr starke Lösungen zur Reaktion benutzten, wodurch der Abstand der Reaktionsgrenzen für das homologe und heterologe Blut möglichst klein wurde, so suchten sie nach einer Methode, die mit Sicherheit die Ausschaltung heterologer Trübungen ermöglichte. Dieses gelang ihnen mit Hilfe der „spezifischen Absättigung".

Sie nahmen ihre Versuche mit Menschen- und Pferdeblut vor und führten sie in folgender Weise aus:

Um aus dem Menschenblut diejenigen Bestandteile zu entfernen, die beim Zusatz von Pferdeantiserum eine Trübung hervorzurufen vermögen, setzten sie zu 5 ccm Menschenblutserumlösung von 1:200 ein Pferdeantiserum im Verhältnis von 1:10 (0,5 ccm) zu.

Nach eingetretener Reaktion wurde das Präzipitat durch Zentrifugieren abgeschieden und die überstehende klare Flüssigkeit abgegossen. Sodann wurde der klaren Flüssigkeit abermals Pferdeantiserum und zwar 0,1 ccm zugesetzt. Die dadurch von neuem sich trübende Flüssigkeit wurde wieder durch Zentrifugieren geklärt, vom Bodensatz abgegossen und zum dritten Male 0,1 ccm Pferdeantiserum zugefügt. Diesen Vorgang wiederholten sie solange, bis sie in der klaren Flüssigkeit durch Pferdeantiserumzusatz keine Trübung mehr hervorrufen konnten. Nach fünfmaligem Antiserumzusatz war solches erreicht. Waren nun alle auf Pferdeantiserum reagierenden Serumbestandteile allein aus dem Menschenblut entfernt, so mußten jetzt die auf Menschenblutserum wirkenden spezifischen Stoffe noch in der Flüssigkeit vorhanden sein. Um diese nachzuweisen, fügten sie 0,1 ccm Menschenantiserum hinzu und beobachteten dann eine sofort auftretende deutliche Trübung in der Blutlösung.

In einem zweiten analogen Versuch setzten sie, um aus Pferdeblut die darin enthaltenen, auf Menschenantiserum reagierenden Bestandteile zu entfernen, zu 5 ccm Pferdeblutserumlösung von 1:200 ein Menschenantiserum im Verhältnis 1:10 (0,5 ccm), dann fügten sie nach Zentrifugieren und Abgießen der Flüssigkeit vom abgeschiedenen Bodensatz wieder 0,1 ccm solange zu, bis das Menschenantiserum keine Trübung mehr bewirkte. Jetzt wurde 0,1 ccm Pferdeantiserum zugefügt und es trat dann sofort Trübung auf.

Durch diese beiden Versuche zeigten die Autoren, daß man aus Menschen- und Pferdeblut die auf die heterologen Anti-

sera reagierenden Serumbestandteile zu entfernen imstande ist, so daß man eine Blutlösung erhalten kann, die nur auf homologes Antiserum reagiert.

Die Methode der Absättigung ist, wie ersichtlich, sehr umständlich und hat ein mehr theoretisches Interesse. Für die forensische Praxis kommt sie nicht in Betracht, da, wie wir gesehen haben, durch genaues quantitatives Arbeiten störende heterologe Trübungen vollkommen auszuschließen sind.

Hat die biologische Methode nach den Ergebnissen der Arbeiten von Uhlenhuth, Nuttall, Kister und Weichardt durch die heterologen Trübungen nichts an Wert verloren, so erfährt sie eine gewisse Einschränkung durch die

Verwandtschaftsreaktionen,

wie sie zwischen ganz nahe verwandten Blutarten z. B. Pferde- und Eselblut, Hammel- und Ziegenblut, Hund- und Fuchsblut, Menschen- und Affenblut usw. auftreten.

Hat man frisches flüssiges Blut zur Verfügung, z. B. Pferde- und Eselblut, so ist die Unterscheidung allenfalls noch möglich. Man wird sich dann Blutlösungen ganz bestimmter Konzentration herstellen, z. B. 1:100, 1:1000, 1:10000 und 1:20000, und nunmehr die gleichen Mengen, z. B. 0,1 ccm von Blutserum eines mit Pferdeblut vorbehandelten Kaninchens hinzusetzen. Während bei den stärkeren Lösungen (1:100) von Pferde- und Eselblut die Reaktion ziemlich gleich intensiv und schnell verlaufen wird, zeigt sich in den schwachen Lösungen 1:10000 bis 1:20000 meist ein gewisser Unterschied in der Intensität und Schnelligkeit des Auftretens der Reaktion, d. h. in der Pferdeblutlösung wird in diesem Falle die Trübung stärker und schneller auftreten wie im Eselblut. Man kann also in solchen Fällen noch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit Pferde- und Eselblut unterscheiden.

Anders liegen die Verhältnisse bei angetrocknetem Blut, wie es in der forensischen Praxis ja fast ausschließlich vorkommt. Da ist es nicht möglich, genau quantitativ zu arbeiten; infolgedessen kann man es erleben, daß bei vermeintlich gleichstarken Lösungen von Pferde- und Eselblut bei Anwendung von Pferde-Antiserum im Eselblut eine stärkere Reaktion auftritt wie im Pferdeblut. Vom forensischen Standpunkte aus ist daher auf diesem Wege eine sichere Unterscheidung von so nahe verwandten Blutarten wie denen des Pferdes und des Esels nicht möglich.

Hamburger gibt an, daß ihm die Differenzierung zwischen Hammel- und Ziegenblut sowie Rinderblut auch in angetrocknetem Zustande gelungen sei. Er fand, daß die spezifische Reaktion jedesmal in der Blutlösung am stärksten auftrat, die mit dem zugehörigen Antiserum beschickt war. Er führte seine Untersuchung in folgender Weise aus:

„Nachdem vom Blutfleck ein klarer Auszug mit 0,9 %iger Kochsalzlösung angefertigt war, wurden von demselben drei gleiche Portionen in kleine Reagenzröhrchen gebracht und mit gleichem Volumina von Ziegen-, Schaf- und Rinder-Antiserum versetzt. Stammte nun der inkriminierte Fleck wirklich von der Ziege, so mußte die Reaktion mit Ziegenantiserum am kräftigsten sein, stammte er vom Schaf, so mußte die Reaktion mit Schafserum am intensivsten ausfallen, und stammte er endlich vom Rind, so war zu erwarten, daß die Trübung mit Rinderantiserum am

ausgiebigsten ausfiel. Stets war die Reaktion mit Ziegenantiserum am kräftigsten, der Fleck stammte also zweifellos von einer Ziege."

Bei diesen Versuchen ist aber Voraussetzung, daß die drei Antisera ungefähr die gleiche Wertigkeit besitzen. Um das zu erreichen. injizierte Hamburger drei Serien von je drei Kaninchen mit gleichen Quantitäten Ziegen-, Schaf- und Rinderserum in gleichen Intervallen, nach der fünften oder sechsten Injektion bekam er dann gewöhnlich eine Serie von Ziegen-, Schaf- und Rinderantiseris, die untereinander etwa gleichwertig waren, d. h. gleiche Mengen dieser Sera gaben mit gleich stark verdünnten Ziegen-, Schaf- und Rinderserum eine Fällung von ungefähr gleicher Intensität. Mit dieser Methode glaubte Hamburger in einwandfreier Weise die Herkunft verwandter Tierspezies feststellen zu können.

Uhlenhuth, der ähnliche Untersuchungen angestellt hat, fand, daß man mit dieser Methode bei frischem flüssigen Blut vielleicht zum Ziele kommen kann, daß aber die Methode bei angetrocknetem Blute ganz unzuverlässig ist.

Interessant ist die neuerdings von Uhlenhuth und Weidanz*) festgestellte Tatsache, daß Ratten- und Mäuseblut, die man eigentlich für sehr wahr verwandt halten sollte, selbst im eingetrockneten Zustande sich ohne weiteres unterscheiden lassen. Ein Ratten-Antiserum gibt einen starken Niederschlag im Rattenblut; Mäuseblut wird fast gar nicht beeinflußt. Es geht aus diesen Untersuchungen hervor, daß die Verwandschaft zwischen Ratte und Maus gar nicht so nahe ist, wie man bisher angenommen hat. Daraus erklärt sich u. a. auch die mangelnde Empfänglichkeit der Ratten für den Mäusekrebs.

Auch die Weichardtsche Absättigungsmethode hat für die Unterscheidung verwandter Blutarten bisher keine praktische Bedeutung erlangt.

Um Menschen- und Affenblut zu unterscheiden, bediente sich Weichardt des Serums eines mit Menschenblut vorbehandelten Kaninchens. Diesem Serum setzte er etwa den zehnten Teil Affenserum zu und filtrierte den so entstandenen Niederschlag mittels eines kleinen Tonfilters ab. Dieses Verfahren setzte er so lange fort, bis das spezifische Serum nur noch auf Menschenblut reagierte.

Die Herstellung derartiger einwandfreier Diagnosensera ist aber eine äußerst diffizile und stößt selbst in der Hand des Geübten oft auf unüberwindliche Schwierigkeiten.

In einfacherer Weise hat dann Uhlenhuth die Unterscheidung nahe verwandter Blutarten versucht. Den Anlaß zu diesen Untersuchungen gab ihm ein Gutachten, welches er für die Staatsanwaltschaft in St. zu erstatten beauftragt war

Es wurde ihm ein blutbefleckter Spazierstock mit dem Ersuchen übersandt, die Herkunft dieser Blutflecken festzustellen.

Der Mann, bei dem der Stock gelegentlich einer Haussuchung gefunden wurde, stand im Verdacht, ein Reh und ein kleineres Stück Wild, Hase, Fuchs oder dergl., erlegt und auf dem Stocke fortgetragen zu haben. Der Mann behauptete aber, die Blutflecken rührten von Gänseblut her, seine Mutter habe Gänse geschlachtet und aufgehängt, der Stock habe unter diesen Gänsen gestanden, und das Blut sei an dem Stocke herunter gelaufen.

Es konnte zunächst festgestellt werden, daß das Serum eines mit Gänseblut vorbehandelten Kaninchens in der Lösung des vom Stocke ab-

*) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. XXX.

gekratzten bluthaltigen Materials einen Niederschlag nicht hervorrief, daß also Gänseblut somit ausgeschlossen war.

Ebenso konnte Uhlenhuth bei Anwendung eines Rehblutantiserums Rehblut mit Sicherheit ausschließen. Um nun weiterhin zu unterscheiden, ob Hasenblut vorlag, versuchte Uhlenhuth, ein Hasenantiserum herzustellen. Zu diesem Zwecke behandelte er Kaninchen mit Hasenblut vor, obwohl sich dagegen gewisse theoretische Bedenken — wegen der nahen Verwandtschaft des Hasen mit dem Kaninchen — geltend machten. Denn es war eine bis dahin allgemein verbreitete Ansicht, daß Tiere auf die Einspritzung einer nahe verwandten Blutart mit der Bildung von Präzipitinen nicht reagieren.

Um nun aber auf jeden Fall ein auf Hasenblut wirksames Antiserum zu erhalten, wurden außer drei Kaninchen gleichzeitig drei Hühner, also dem Hasen nicht verwandte Tiere, mit Hasenblut vorbehandelt. Da frisches Hasenblut damals während der Schonzeit nicht zu bekommen war, so bediente sich Uhlenhuth angetrockneten, vier Jahre alten Hasenbluts, welches er in 0,85 %iger Kochsalzlösung auflöste.

Alle drei Kaninchen lieferten zu Uhlenhuths großer Überraschung brauchbare auf Hasenblut präzipitierende Sera. Auch die drei Hühner lieferten nach 4—5 intramuskulären Einspritzungen von Hasenblut gut wirksame Sera.

Die von den Kaninchen wie von den Hühnern gewonnenen Sera reagierten beide auf Hasenblut, zeigten aber folgende Unterschiede:

Das Serum der mit Hasenblut vorbehandelten Kaninchen zu den verschiedensten Blutlösungen zugesetzt gab nur im Hasenblut eine Reaktion; die Blutlösungen von zahmen und wilden Kaninchen blieben vollkommen klar. Mit dem vom Huhn gewonnenen Hasenantiserum war dagegen eine sichere Unterscheidung von Hasen- und Kaninchenblut nicht möglich, denn es erzeugte einen Niederschlag sowohl in Hasen- wie in Kaninchenblut.

Uhlenhuth schloß aus diesen Untersuchungen:

1. daß der Kaninchenorganismus imstande sei, Präzipitine gegen das Bluteiweiß der ihm nahe verwandten Hasen zu bilden, und

2. daß es auf diese Weise möglich sei, das Blut zweier so verwandter Tiere, wie Hase und Kaninchen, mit Sicherheit von einander zu unterscheiden.

Mit Hilfe des von Kaninchen gewonnenen Hasen-Antiserums führte Uhlenhuth denn auch den sicheren Beweis, daß das an dem Spazierstock des Wilddiebes befindliche Blut aus Hasenblut bestand.

Die von Uhlenhuth gefundene Tatsache, daß der Tierkörper auch auf die Einspritzung einer verwandten Blutart mit der Bildung von Präzipitinen zu reagieren vermag, war neu und stand, wie gesagt, mit den in der Literatur niedergelegten Beobachtungen in gewissem Widerspruch.

So konnte Bordet von Meerschweinchen keine Präzipitine gegen Kaninchenblut erzeugen, ebenso konnte Nolf von der Taube, der er Hühnerblut einspritzte, kein Serum gewinnen, welches Hühnerblut präzipitierte. Biondi spritzte einen Affen mit Menschenblut ein, er lieferte aber kein wirksames Antiserum. Schur konnte durch Einspritzung von Ziegenblut beim Schaf kein Immunserum gewinnen.

Die Gründe für diese Mißerfolge führt Uhlenhuth darauf zurück, daß man bisher vielleicht nur an einer zu kleinen Zahl von Tieren gear-

beitet hat, ohne systematische Untersuchungen an einem größeren Tiermaterial anzustellen. Die vereinzelten negativen Resultate habe man dann verallgemeinert in der vorgefaßten Ansicht, daß die nahe Verwandtschaft ein Hindernis für die Präzipitinbildung darstelle. Man hätte aber die Tatsache berückschtigen müssen, daß oft auch von 6—8 Kaninchen, die mit ganz fremdem Eiweiß vorbehandelt werden, nur zwei brauchbare Sera liefern.

Die in derselben Richtung angestellten Versuche Uhlenhuths an Hühnern und Tauben bewiesen dann weiterhin, daß Hühner- gegen Taubenblut und Tauben- gegen Hühnerblut Präzipitine zu liefern imstande ist, sodaß man mit diesen präzipitierenden Seris in der Lage ist, Tauben- und Hühnerblut mit Sicherheit zu unterscheiden, während das mit den vom Kaninchen gewonnenen Antiseris nicht gelingt.

Von hohem Interesse war es nun für Uhlenhuth, diese Experimente auf die Unterscheidung von Menschen- und Affenblut auszudehnen. Analog den früheren Versuchen hätte er nun Menschen mit Affenblut und Affen mit Menschenblut einspritzen müssen. Da sich die erste Versuchsanordnung von selbst verbot, so behandelte er Affen mit Menschenblut vor. Es wurden mehrere Affen der alten Welt (Cercopithecus fuliginosus und Macacus rhesus) in geeigneten Zwischenräumen (alle 6 Tage) mit 5—10 ccm menschlichen Serums eingespritzt. Diese Tiere lieferten dann Sera, welche in Menschenblutlösungen eine starke Trübung erzeugten. Affenblut zeigte dagegen nicht die geringste Reaktion, und so war es Uhlenhuth ein leichtes, mit diesem von Affen gewonnenen Serum Menschen- und Affenblut zu unterscheiden, während das mit einem von Kaninchen gewonnenen Menschen-Antiserum nicht gelingt. Es muß allerdings hervorgehoben werden, daß diese Antisera nicht sehr hochwertig waren. Es ist aber doch möglich, bei verwandten Tieren wie Huhn und Taube, Hase und Kaninchen, Mensch und Affe durch gegenseitige Einspritzung ihres Blutes praktisch verwertbare Präzipitine zu erzeugen.

Was den Grad der Verwandtschaft dieser Tiere betrifft, so kann man nicht behaupten, daß Huhn und Taube sich zoologisch sehr nahe stehen, wohl aber biologisch, da ein Hühnerblutantiserum im Hühner- und Taubenblut eine starke Reaktion auslöst.

Hase und Kaninchen sind vom zoologischen Standpunkt recht nahe verwandte Tiere, trotzdem sie in ihrem Körperbau und ihrem Naturell bemerkenswerte Unterschiede aufweisen. Es ist sogar behauptet worden, daß eine Kreuzung zwischen Hasen und Kaninchen vorkommen soll, wenigstens sagt Brehm:

„Man hat wiederholt vollkommen fortpflanzungsfähige Bastarde von Hase und Kaninchen erzielt und namentlich in Frankreich weiter gezüchtet, sogenannte Hasenkaninchen oder Leporiden. Sie wurden von Haeckel „Lepus Darwinii“ benannt, scheinen aber noch keine festen Artmerkmale angenommen zu haben.“

Landois hat bereits durch seine Transfusionsversuche die Blutsverwandtschaft zwischen Hasen und Kaninchen zu beweisen gesucht. Er konnte feststellen, daß Hasenblut im Kaninchenorganismus nicht aufgelöst und reaktionslos vertragen wird, während sonst fremdartiges Blut stürmische, durch Blutauflösung bedingte Erscheinungen hervorruft.

Friedenthal hat ähnliche Untersuchungen angestellt und konnte besonders auch die Blutsverwandtschaft zwischen Menschen und Affen durch Transfusionsversuche demonstrieren. Er hat einem Makakus ein

Quantum Menschenserum, welches $^1/_8$ der Blutmenge des Affen betrug, in die Vene eingespritzt. Bis auf eine ganz kurz dauernde unbeträchtliche Hämoglobinurie vertrug er das Menschenblut anstandslos. UHLENHUTH legt allen diesen Transfusionsversuchen als Beweis für eine Blutsverwandtschaft nicht allzugroße Bedeutung bei, da z. B. Kaninchen das artfremde Pferdeserum in großen Dosen (bis zu 100 ccm) von der Blutbahn aus ausgezeichnet vertragen.

Durch die Tatsache, daß so nahe verwandte Tiere wie Hase, Kaninchen usw. auf die Einspritzung ihres Blutes gegenseitig mit der Bildung von Präzipitinen reagieren, wird zur Evidenz erwiesen, daß trotz der so nahen Verwandtschaft doch noch recht bemerkenswerte Unterschiede in der Zusammensetzung des Körpereiweißes vorhanden sein müssen. Eine Kreuzung halten wir daher für ausgeschlossen.

Wir werden durch diese Untersuchungen dazu gedrängt, danach zu forschen, wo denn in der Verwandtschaft der Tiere die Grenze liegt, bei der eine Präzipitinbildung nach Einspritzung einer verwandten Blutart nicht mehr zu konstatieren ist. SCHÜTZE fand, daß ein Kaninchenserum vom Kaninchen, welches mit Kaninchenblut vorbehandelt war, in 2 von 32 untersuchten Kaninchenblutlösungen eine Präzipitinreaktion erzeugte und glaubte eine Isopräzipitinbildung annehmen zu müssen. Solche Isopräzipitine sind aber späterhin weder von UHLENHUTH noch anderen Autoren trotz der umfangreichsten Untersuchungen wieder beobachtet worden. Zahlreiche zahme Kaninchen, welche selbst mit dem hypothetisch doch wohl etwas differenten wilden Kaninchenblut vorbehandelt wurden, zeigten niemals Isopräzipitine in ihrem Serum (UHLENHUTH). Es gelang auch nicht Pferde, die mit großen Dosen Eselserum (bis 500 ccm für jede Injektion) vorbehandelt wurden, zur Produktion von Präzipitinen gegen Eseleiweiß anzuregen; ebenso lieferten Hammel keine Präzipitine gegen Ziegenblut und umgekehrt. Selbst mit Hilfe der noch zu besprechenden sehr empfindlichen Methode der Komplementbindung kann man eine Antikörperbildung nicht nachweisen (UHLENHUTH und WEIDANZ).

Es liegt nahe daran zu denken, daß das Ausbleiben der Präzipitinbildung das feinste Reagens ist für den Nachweis naher Blutverwandtschaft unter den Tieren.

Durch die Anwendung dieser sog. „kreuzweisen Immunisierung" sind wir in der Methodik der Blutdifferenzierung schon einen Schritt weiter gekommen, indem wir wenigstens einzelne sehr nahe verwandte Blutarten mit dieser Methode differenzieren können. Daß jedoch auch diese Methode ihre Grenzen hat, zeigen die negativen Differenzierungsversuche zwischen Pferd und Esel, Hammel und Ziege, ebensowenig ist auf diesem Wege eine Rassendifferenzierung oder eine Differenzierung der verschiedenen Individuen einer Art gelungen. Mit dieser letzten Frage hat sich WEICHARDT eingehend beschäftigt. Mit seiner „Absättigungsmethode", die er, wie wir oben gesehen haben, zur Differenzierung von Menschen- und Affenblut verwandte, hat er auch versucht, das Blut zweier verschiedenen Individuen zu unterscheiden.

Um zwei Blutsorten derselben Spezies z. B. von Mensch A und B voneinander zu unterscheiden, behandelte er Kaninchen mit dem Blut A in der bekannten Weise vor. Das so gewonnene Serum versetzte er mit Blutserum von B, filtrierte dann den entstandenen Niederschlag ab und entfernte auf diese Weise die auf B wirkenden Präzipitine. Das

so für Serum A spezifisch gemachte Serum wirkte dann präzipitierend nur auf Serum A, nicht auf Serum B. Über die Beurteilung dieser sinnreichen, aber äußerst diffizilen Methode haben wir uns bereits oben geäußert.

Landsteiner und Richter haben dann versucht, eine individuelle Blutdiagnose auf der Beobachtung aufzubauen, daß menschliches Serum in den meisten Fällen Isoagglutinine — also Stoffe, welche Blutkörperchen anderer Individuen agglutinieren — enthält, niemals aber Autoagglutinine. Wenn nun die aus der zu untersuchenden Blutspur hergestellte Lösung die Blutkörperchen eines Individuums agglutiniert, so schien der Schluß berechtigt, daß das Blut nicht von diesem Individuum herrührt. Diese isoagglutinierende Wirkung geht aber im angetrockneten Blutserum schnell verloren, wie wir bereits oben gesehen haben, außerdem scheinen Autoagglutinine auch bei krankhaften Prozessen vorzukommen.

Man hat dann auch versucht mit Hilfe der Präzipitinreaktion Geschlechtsdifferenzen im Blutserum nachzuweisen. Uhlenhuth konnte in einem Falle feststellen, daß Serum von mit Hühnereiereiweiß vorbehandelten Kaninchen in dem Blute von geschlechtsreifen Hühnern einen stärkeren Niederschlag erzeugt als in dem von Hähnen. Ähnliche Versuche machte er dann mit Spermaeinspritzungen bei Kaninchen; das so gewonnene Serum präzipitierte aber das Blut von Frauen ebenso stark wie das von Männern.

Neuerdings hat Bruck die Differenzierung von Menschenrassen auf biologischem Wege studiert. Mit schwach präzipitierenden Seris unter Anwendung der unten zu besprechenden Komplementbindungsmethode gelang es ihm mit Hilfe eines gegen Vertreter der weißen Rasse gerichteten Antiserums, diese von den Angehörigen der mongolischen und und malayischen Rasse zu unterscheiden und gleichzeitig aus den erzielten Titergrößen auf die Verwandtschaft der einzelnen Rassen untereinander zu schließen. Nach unserem Dafürhalten sind die Differenzen der Titergrößen aber so gering, daß sie sichere Schlüsse nicht zulassen.

Auf die Verwandschaftsreaktion hat man bei Abgabe eines Gutachtens Rücksicht zu nehmen. So würde man beispielsweise, wenn die verdächtige Blutlösung bei Zusatz eines Menschenantiserums einen deutlichen Niederschlag geben würde, sagen: „es besteht das untersuchte Blut aus Menschenblut, falls Affenblut auszuschließen ist" (Uhlenhuth, Strauch).

Sollte die Unterscheidung von Menschen- und Affenblut verlangt werden, so müßte man das Serum eines mit Menschenblut vorbehandelten Affen heranziehen. Für die Praxis kommt das für unsere Gegenden kaum in Betracht.

Zum Schluß sei hier noch angeführt die schon erwähnte

Komplementbindungsmethode,

die neuerdings von Neisser und Sachs zur Kontrolle und Ergänzung der Präzipitinmethode in Vorschlag gebracht worden ist.

Über das Wesen und Zustandekommen des Phänomens der sogenannten Komplementablenkung, wie es von Bordet, Gengou und Moreschi zuerst beobachtet und beschrieben worden ist, sind unsere Ansichten noch keineswegs geklärt. Soviel steht jedoch fest, daß Präzipitation und Komplementbindung in der Regel parallel gehen.

Da, wo eine Präzipitinwirkung stattgefunden hat, wird man in den zugleich ein hämolytisches System (Hämolysin und Blutkörperchen) enthaltenen Röhrchen ein Ausbleiben der Blutauflösung beobachten und daher eine deckfarbene Blutaufschwemmung vor sich haben, in der sich die Blutkörperchen allmählich zu Boden senken, während die darüber stehende Flüssigkeit vollkommen klar und farblos bleibt. Da, wo keine Präzipitinwirkung zustande gekommen ist, konstatiert man dagegen vollständige Hämolyse, die in einer lackfarbenen roten Blutlösung deutlich zum Ausdruck kommt.

Diese Farbenreaktion ist natürlich im höchsten Maße eklatant und in Fällen, wo die Präzipitinreaktion in sehr starken Verdünnungen nur angedeutet ist, dokumentiert sich der positive Ausfall dieser Reaktion noch in auffallender Weise durch Ausbleiben der Hämolyse.

Die wissenschaftlichen Grundlagen dieser Methode sind absolut sichere, und es kann auch auf Grund theoretischer Erwägungen an der Zuverlässigkeit der Methode nicht gezweifelt werden. Es fragt sich nun aber, wie liegen die Verhältnisse in der gerichtsärztlichen Praxis?

Da das Zustandekommen resp. Ausbleiben der Hämolyse das ausschlaggebende Moment für die Beurteilung der Reaktion darstellt, so kam es zunächst darauf an, dieses für sich allein unter den Verhältnissen. der Praxis eingehend zu studieren. Neisser und Sachs haben in ihrer ersten Arbeit (Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 44) ein künstliches hämolytisches System vorgeschlagen, d. h. als Ambozeptor das Serum eines mit Rinderblut (gleichzeitig auf Hammelblut wirkend) vorbehandelten Kaninchens, als Komplement normales Meerschweinchenserum, als Blutkörperchen Hammelblut.

Wohl mit Rücksicht auf die Umständlichkeit dieser Versuchsanordnung haben sie dann in ihrer zweiten Arbeit (Berliner klin. Wochenschrift 1906, Nr. 3) eine Vereinfachung der Methode angegeben, die sie dadurch erzielten, daß sie als hämolytisches Serum normales Serum, das also gleichzeitig hämolytischen Ambozeptor und Komplement enthält, benutzten. Es wurde von diesen Autoren das im normalen Kaninchenserum enthaltene Hämolysin für Hammelblut empfohlen.

Bei seinen Untersuchungen über die praktische Verwertbarbarkeit der von Neisser und Sachs angegebenen Methoden machte Uhlenhuth die Beobachtung, daß die Extrakte zahlreicher Stoffe, wie sie in der Praxis dem Sachverständigen zur Untersuchung vorgelegt werden, in das natürliche hämolytische System eingefügt, eine totale Ablenkung zeigten, so z. B. Auslaugungen von Säcken (Jute), Fußlappen, wollenen Strümpfen, Leinwand, Hosen, Filzhüten, Jackets usw., ferner von Hanfstaub, Pappe, Erde, Kies, Holzrinde, Heu, Stroh, Brot, Leder, Federn, verschiedenen Haaren, Urin, Pepton, Peptonbouillon, Tuberkulin; verschiedene unverdünnte Sera bewirkten ebenfalls komplette Ablenkung. Nur durch Erhöhung der hämolytischen Dosis von Kaninchenserum, oftmals um das 10fache, konnte die hemmende Wirkung aufgehoben werden.

Unverdünnter Urin zeigte selbst bei diesem starken hämolytischen System (1,0 ccm normales Kaninchenserum) absolute Ablenkung; durch Verdünnung des Urins konnte die ablenkende Wirkung beseitigt werden.

Welcher Art diese ablenkenden Stoffe sind, läßt sich nicht mit Bestimmtheit sagen; jedenfalls ist sicher, daß sie weder durch Kochen zugrunde gehen (Uhlenhuth, Neisser und Sachs) noch durch Fil-

tration mittels Berkefeldscher Kerzen beseitigt werden können (Uhlenhuth).

Weit besser waren die Resultate, die Uhlenhuth in Parallelversuchen bei Anwendung von Meerschweinchenkomplement und spezifisch erzeugtem Ambozeptor erhielt. Hierbei ergab sich daß eine große Reihe der oben genannten für Kaninchenserum ablenkenden Stoffe nicht mehr ablenkend wirkte, immerhin zeigten aber auch diesem System gegenüber Wolle, Fußlappen, Leder noch eine ablenkende Wirkung. Diese ließ sich zum Teil durch Erhöhung der Komplementmenge beseitigen. Aber selbst bei erheblichen Komplementmengen (von 0,3 ccm Meerschweinchenserum, eine Dosis, welche an sich schon 1,0 ccm Hammelblut auflöst) und erhöhtem Ambozeptorgehalt konnte Uhlenhuth die ablenkende Wirkung von unverdünntem Urin, von Peptonlösung und Tuberkulin nicht beseitigen. In diesen Fällen konnte er ebenfalls nur durch Verdünnung der betreffenden Flüssigkeiten zum Ziele kommen.

Für die Praxis erscheint jedoch die Verdünnung im allgemeinen nicht anwendbar, da, wenn nur ein kleiner Blutfleck vorliegt, der an sich nur einen ganz schwachen Eiweißauszug liefert, eine weitere Verdünnung den positiven Ausfall der Reaktion in Frage stellen könnte. Man wird daher in erster Linie ein kräftiges hämolytisches System wählen müssen. Als solches ist nach unseren Untersuchungen — und Neisser und Sachs stimmen darin mit uns überein — das normale Kaninchenserum für die forensiche Praxis unbrauchbar. Auch kann die Verwendung normaler Hämolysine insofern zu Mißständen führen, als eine getrennte Dosierung von Ambozeptor und Komplement nicht möglich ist. Es ist daher unter allen Umständen die Anwendung eines künstlichen Systems, welches viel wirksamer und leichter dosierbar ist, zu empfehlen. Jedoch muß in jedem konkreten Falle eine genaue Einstellung des hämolytischen Systems auf die aus dem betreffenden Corpus delicti ausgelaugte Flüssigkeit — zunächst ohne Antiserumzusatz — vorgenommen werden. Ist das hämolytische System für den konkreten Fall genau eingestellt, so wird man bei Interferenz der fraglichen aus dem betreffenden Material hergestellten Blutlösung und Zusatz des betreffenden Antiserums brauchbare Resultate erhalten.

Es kommt nunmehr wieder auf die Konzentration der zu untersuchenden Blutlösung und den Titer resp. die Menge des zuzufügenden Antiserums an; beide Faktoren müssen wiederum in richtigem Verhältnis zu der Stärke des hämolytischen Systems stehen, um einen optimalen Ausschlag der Reaktion zu erzielen. Ein Komplement- oder Ambozeptorüberschuß stört den Ausfall der Reaktion. Die zu untersuchende Blutlösung (präzipitable Substanz) und das zugehörige Antiserum (Präzipitin) müssen eine so feste Bindung eingehen, daß sie durch das hämolytische System — sozusagen — nicht „gesprengt" oder doch so „gelockert" werden, daß nachträglich eine totale oder partielle Hämolyse erfolgt. Es kommen also bei diesem Verfahren zahlreiche, sehr variable Faktoren in Betracht, die — jeder für sich — einer besonderen Prüfung bedürfen, ehe man zur Untersuchung des praktischen Falles übergehen kann.

Die Neisser-Sachssche Methode dürfte etwa in folgender Weise auszuführen sein:

Als Vorversuch würde zuerst die genaue Einstellung des zur Verwendung kommenden hämolytischen Systems auszuführen sein; es

besteht dasselbe, wie bereits erwähnt, aus der Kombination von Hammelblut, inaktivierten vom Kaninchen gewonnenen Immunserum für Hammelblut (Ambozeptor) und von aktivem Meerschweinchenserum (Komplement). Zuerst erfolgt die Einstellung des Ambozeptors. Die Hammelblutkörperchen werden vor dem Versuch, um sie von anhaftendem Serum zu befreien, mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Je 1 ccm 5%iger Hammelblutaufschwemmung werden mit je 0,1 ccm Meerschweinchenserum und absteigenden Mengen inaktivierten (durch halbstündiges Erwärmen bei 56° C) Ambozeptors gemischt. In allen Röhrchen werden dann durch Auffüllen mit physiologischer (0,85%iger) gleiche Volumina hergestellt. Die Gemische werden dann eine Stunde in den Brutschrank (37° C) gestellt und sofort danach oder bei folgendem 12—24stündigem Aufenthalt im Eisschrank am nächsten Morgen betrachtet. Zeigt sich nun z. B., daß die komplett lösende Dosis des Ambozeptors 0,00025 ccm beträgt, so empfiehlt es sich, zu den weiteren Versuchen die doppelt lösende Dosis, in unserem Falle also 0,0005 ccm, zu verwenden.

Für diese Ambozeptormenge muß nunmehr durch einen zweiten Versuch der Komplementbedarf festgestellt werden. Findet man, daß die kleinste komplett lösende Dosis des benutzten Meerschweinchenserums 0,05 ccm beträgt, so ist es zweckmäßig, auch hier wiederum das doppelte Quantum, nämlich 0,1 ccm zu benutzen.

Unter Verwendung des durch die beiden Vorversuche ermittelten hämolytischen Systems muß weiterhin der Titer des durch Immunisierung mit Menschenserum vom Kaninchen gewonnenen Antiserums bestimmt werden, da dasselbe nicht in beliebiger Menge verwandt werden darf; denn einmal wirken größere Serummengen sehr oft bereits an und für sich antikomplementär, andererseits kann aber auch ein Überschuß des Antiserums, wie Moreschi, Neisser und Sachs, Liefmann gezeigt haben, die antihämolytische Wirkung verhindern. Rickmann und J. Bauer verfahren in der Weise, daß sie einmal absteigende Mengen des Antiserums mit der Testdosis des Komplements einerseits, andererseits mit Komplement und Antigen mischen. Als Antigen dient das homologe Serum. Da die Autoren für die forensische Praxis fordern, daß $^1/_{10000}$ ccm Blutserum noch nachgewiesen werden muß, so wählen sie als Antigendosis 0,0001 ccm des entsprechenden Serums. Die Gemische bleiben 1 Stunde im Brutschrank, sodann erfolgt Zusatz von Blut und Ambozeptor. Als Testdosis des Antiserums empfehlen sie ein $1^1/_2$—2faches Multiplum der gerade noch vollständig hemmenden Dosis des Antiserums. Vorbedingung ist natürlich, daß diese Menge des Antiserums nicht etwa bereits ohne Antigenzusatz antikomplementär wirkt.

Nunmehr kann man erst zu dem eigentlichen Komplementbindungsversuch schreiten. Er wird etwa in folgender Weise ausgeführt: Zu 1 ccm der etwa 1:1000 verdünnten auf Menschenblut zu untersuchenden, inaktivierten Lösung wird frisches Meerschweinchenserum und die Testdosis des inaktivierten Menschenantiserums gesetzt. Das Gemisch wird tüchtig durchgeschüttelt und wird 1 Stunde in den Brutschrank (37° C) gestellt, sodann erfolgt der Zusatz von 1 ccm 5%iger Hammelblutlösung und der Testdosis des Ambozeptor. Die gutgemischte Lösung kommt dann abermals etwa eine Stunde in den Brutschrank und kann bereits jetzt (Uhlenhuth) oder bei folgendem Aufenthalt im Eisschrank am nächsten Morgen (Ehrlich) betrachtet werden. Um die Befunde besser beurteilen zu können, ist es notwendig die in dem Brutschrank befindlichen Röhrchen

von Zeit zu Zeit zu beobachten. In dem Augenblick, wo das als Kontrolle dienende hämolytische System vollständige Hämolyse zeigt, wird der Befund in den übrigen Röhrchen festgestellt. Es wird das meistens nach einer Stunde der Fall sein. Hat man die Blutkörperchen vor dem Versuch „sensibilisiert", d. h. hat man den Ambozeptor auf die Blutkörperchen bereits durch halbstündigen Aufenthalt im Brutschrank einwirken lassen, so verläuft die Reaktion viel schneller.

Fig. 7. Brutschrank für Hämolyse-Versuche nach Weidanz.

Um bei der Komplementbindungsmethode den Eintritt und Verlauf der Reaktion in den einzelnen Röhrchen bei konstanter Temperatur fortwährend in bequemer Weise vom Arbeitsplatz aus beobachten zu können, bedienen wir uns des von Weidanz für Hämolyseversuche angegebenen, durchsichtigen Brutschrankes (Fig. 7). Der Brutschrank (*I*) besteht aus einem doppelwandigen Wasserbehälter aus Metall, welcher in Gestalt eines Rahmens den Innenraum umgibt. Dieser wird an der Vorder- und Rückseite durch je zwei Glasscheiben abgeschlossen, die äußeren Glasscheiben sind zum Auswechseln. In den Innenraum führt eine Tube, durch die ein Thermometer (T_1) zur Kontrolle der Temperatur eingeführt ist. Die

Regulierung derselben geschieht durch einen sehr empfindlichen Mikrothermoregulator (*RI*), der sich in einer Metallhülse des Wasserbades befindet und mittels eines massiven Metallrohres (*C*) mit dem Brenner (*A*) verbunden ist Durch Tube *G* wird das Wasser in den Wasserraum gefüllt. Der Brutschrank befindet sich auf einem Gestell, an dem der Mikrobrenner (*A*) mit Glimmerzylinder angebracht und feuersicher mit dem Thermoregulator verbunden ist. Der Brutschrank ist ferner so eingerichtet, daß an denselben ein Wasserbad (*II*) zur Inaktivierung der einzelnen in Frage kommenden Flüssigkeiten angehängt werden kann. Durch einen Mikrothermoregulator (*RII*) und den Brenner *B*, die ebenfalls mittels eines Metallrohres (*D*) verbunden sind, wird eine konstante Temperatur von 56 ⁰ C erreicht. Das Wasserbad besitzt zur Aufnahme der mit den zu inaktivierenden Flüssigkeiten gefüllten Reagenzgläser vier auswechselbare Metallplatten (*J*), welche je nach der Weite der verwendeten Gläser mit verschieden großen Löchern versehen sind. Damit die Röhrchen in dem Wasser bleiben und nicht hochgedrückt werden können, wird ein Klappdeckel (*H*) auf die Wattepfropfen der Gläser gelegt. Zur Kontrolle der Temperatur im Wasserbade dient ein Thermometer (T_{II}).

Um den Innenraum des Brutschranks, der sehr klein ist, möglichst auszunutzen, müssen die zum Versuche gebrauchten Reagenzgläser aus ihrem gewöhnlichen Holzgestell herausgenommen und mittels eines mit Löchern versehenen Metallsteges reihenförmig im Brutschrank aufgehängt werden. Der 35 cm lange Steg, der genau die Länge der gewöhnlichen großen hölzernen Reagenzglasgestelle hat, ist so eingerichtet, daß sich, wenn er auf die oberen Holzplatten des Gestells gelegt wird, die in ihm befindlichen Löcher genau mit denen der darunter liegenden Holzplatte decken. Es können also mit diesem Steg gleichzeitig 12 große Reagenzgläser in den Brutschrank gestellt werden. Kommen aber bei einem Versuch noch mehr Röhrchen zur Verwendung, so bedient man sich zweckmäßig eines Metallsteges, der eine knopfgabelähnliche Form hat. Hierdurch ist es möglich, die einzelnen Röhrchen unmittelbar aneinander zu schieben, so daß jetzt statt 12 18 Röhrchen Platz haben. Da nun aber bei den Komplementbindungsversuchen im höchsten Falle 6 ccm Flüssigkeit für das einzelne Röhrchen in Betracht kommen, so kann man recht gut mit viel kürzeren etwa 6 cm langen Röhrchen auskommen. Bei Verwendung dieser Röhrchen lassen sich in dem Brutschrank bequem zwei Reihen untereinander aufhängen. Haben diese Röhrchen einen Durchmesser von 1,6 cm, so würden sich etwa 36 Stück in dem Brutschranke unterbringen lassen. Bei Benutzung von Röhrchen mit geringerem Durchmesser können natürlich entsprechend mehr davon untergebracht werden. Von diesen von WEIDANZ in Vorschlag gebrachten Röhrchen, die einen etwa 1,5 mm breiten nach außen umgebogenen Rand haben, werden vier verschiedene Sorten (1,6, 1,2, 0,9 und 0,6 cm Durchmesser) mit den dazugehörigen Metallstegen angefertigt. Bei Anwendung der mit Löchern versehenen Stege kann man die in einer Reihe aufgehängten Röhrchen mitsamt dem Steg in die Löcher des großen Reagenz-

Fig. 8. Reagenzglasgestell nach WEIDANZ.

glasgestelles hineinhängen. Bei Benutzung des knopfgabelförmigen Steges ist das bei den dicht nebeneinander hängenden Röhrchen nicht möglich. In diesem Falle bedienen wir uns eines Metallgestelles (Fig. 8), in das der Steg mit den Röhrchen so hineinpaßt, daß er weder vorwärts noch rückwärts, noch seitlich abgleiten kann. Außerdem lassen sich die hier vollkommen freihängenden Röhrchen ausgezeichnet beobachten.

Um nicht bei einem größeren Hämolyse-Versuch für jede Röhrchenreihe ein besonderes Metallgestell zu benötigen, bedient man sich zweckmäßig eines treppenartigen Gestells (Fig. 9), auf dem neun Röhrchenreihen hintereinander Platz haben. Man kann auf diese Weise auf einem verhältnismäßig beschränkten Raum weit über 100 Röhrchen unterbringen. Eine genaue Beobachtung der dicht hintereinander hängenden Röhrchenreihen ist hierbei natürlich ausgeschlossen. Zu diesem Zwecke kann aber der die zu beobachtende Röhrchenreihe enthaltende Steg leicht aus dem treppenförmigen Gestell herausgenommen und in das oben beschriebene Metallgestell gelegt werden.

Fig. 9. Treppenförmiges Reagenzglasgestell nach Weidanz.

Um alle Fehlerquellen nach Möglichkeit auszuschließen sind bei der Komplementbindungsmethode zahlreiche Kontrollen notwendig.

(S. Tabelle pag. 767.)

Damit scheinen alle Kontrollen verzeichnet zu sein.

Wir wollen nicht unterlassen auf eine Beobachtung hinzuweisen, die wir mehrere Male selbst gemacht haben und die wir auch bei unseren Mitarbeitern machen konnten. In zwei genau unter denselben Bedingungen mit dem gleichen Material angestellten Versuchsreihen konstatierten wir bisweilen in den entsprechenden Röhrchen einmal eine komplette Ablenkung, einmal eine totale Hämolyse. Diese rätselhafte Tatsache kann, da ein Versuchsfehler mit Sicherheit ausgeschlossen war, nur so erklärt werden, daß die betreffenden Reagenzgläschen eine ablenkende Substanz enthalten hatten, trotzdem stets für diese Arbeiten saubere und sterile Röhrchen benutzt werden. So außerordentlich empfindlich ist die Reaktion; eine Kontrolle für diese Fehlerquelle kann nur dadurch angestellt werden, **daß jeder Komplementbindungsversuch mehrere Male zu wiederholen ist.**

Läßt sich nun mit Hilfe dieser angeführten Kontrollen in jedem Falle ein sicherer Entscheid treffen?

Diese Frage muß verneint werden. Es kann z. B. in der Praxis recht gut einmal vorkommen, daß Blutspuren mit einer ablenkenden Substanz oder dem Auszug einer solchen fein gemischt auf einer nicht ablenkenden Unterlage eingetrocknet sind und daß die geringe Blutspur eine stärkere Verdünnung nicht zuläßt, auch die Verstärkung des hämo-

Über die anzulegenden Kontrollen gibt folgende Tabelle Aufschluß:

Versuch	Kontrolle I	Kontrolle II	Kontrolle III	Kontrolle IV	Kontrolle V	Kontrolle VI
Kompl.	Kompl.	Kompl.	Kompl.	Kompl.	Kompl.	Kompl.
Untersuchungsflüssigkeit (Menschenblut) ?	Menschenblutlösung	Rinderblutlösung	Schweineblutlösung	physiolog. Kochsalzlösg.	physiolog. Kochsalzlösg.	Untersuch.-Flüssigkeit
Menschen-Antiserum	Menschen-Antiserum	Menschen-Antiserum	Menschen-Antiserum	Menschen-Antiserum	—	—
1 Stunde bei 37° C . . .						
Ambozeptor	Ambozeptor	Ambozeptor	Ambozeptor	Ambozeptor	Ambozeptor	Ambozeptor
Hammelblut	Hammelblut	Hammelblut	Hammelblut	Hammelblut	Hammelblut	Hammelblut
1 Stunden bei 37° C . . .						

Kontrolle VII	KontrolleVIII	Kontrolle IX	Kontrolle X	Kontolle XI	Konrrolle XII	KontrolleXIII
Kompl.	Kompl.	Kompl.	Kompl.	—	—	—
Untersuch.-Flüssigkeit (gekocht)	Substrat- *) extrakt	Substrat-extrakt	Untersuch.-Flüssigkeit	physiolog. Kochsalzlösg.	physiolog. Kochsalzlösg.	Untersuch.-Flüssigkeit
—	Menschen-antiserum	—	normales Kaninchen-Serum	—	—	—
1 Stunde bei 37° C . . .						
Ambozeptor	Ambozeptor	Ambozeptor	Ambozeptor	Ampozeptor	—	—
Hammelblut	Hammelblut	Hammelblut	Hammelblut	Hammelblut	Hammelblut	Hammelblut
1 Stunde bei 37° C . . .						

*) Unter Substratextrakt verstehen wir einen Auszug aus dem Material, auf dem das Blut angetrocknet ist.

lytischen Systems die ablenkende Substanz nicht paralysiert. Der Sachverständige würde in diesem Falle selbst durch Kochen der Lösung nicht entscheiden können, ob außer der nicht spezifischen Ablenkung noch eine spezifische vorhanden gewesen ist. Auch wäre er nicht imstande bei dem an sich sehr stark ablenkenden Urin, in dem sich geringe Blutspuren (Menstrualblut) befinden, sodaß eine Verdünnung nicht angängig ist, mit Hilfe der Komplementablenkung eine Entscheidung zu treffen. Wenn das auch recht seltene Fälle sein mögen, so muß doch darauf aufmerksam gemacht werden.

Die Präzipitinmethode gestattet in solchen Fällen einen sicheren Entscheid.

Es fragt sich nun, ob die Komplementablenkung an sich in der Praxis besondere Vorteile vor der gewöhnlichen Präzipitinreaktion bietet. Es ist wohl richtig, daß man bei der Empfindlichkeit dieser Methode schwach wirksame Antisera und auch solche die opaleszieren (Neisser-Sachs) verwerten kann, Sera also, die Uhlenhuth für die Praxis vollkommen verwirft.

Die Klärung der Untersuchungsflüssigkeit, die von einigen Autoren nicht für nötig gehalten wird, ist unserer Ansicht nach jedoch erforderlich.

Was nun die Leistungsfähigkeit beider Methoden betrifft, so muß ohne weiteres zugegeben werden, daß die Neisser-Sachssche Methode in Verdünnungen, auch bei Anwendung weniger hochwertiger Antisera, in denen die gewöhnliche Präzipitinreaktion nur noch schwach sichtbare Präzipitate liefert, noch komplette Ablenkung zeigen kann. Eine feinere Methode wie die Präzipitinmethode brauchen wir jedoch in der forensischen Praxis nicht.

Denn mit dem von Uhlenhuth verlangten Titer kann man noch $^1/_{20000}$ g Blut und weniger einwandsfrei nachweisen. Bei seinen zahlreichen gerichtlichen Blutuntersuchungen ist Uhlenhuth bezüglich der Kleinheit der Blutflecke kaum in Verlegenheit geraten. Wenn man in solchen Fällen die ausgezeichnete Hauser-Carnwathsche Kapillarmethode anwendet, so wird man selbst noch weit kleinere Mengen mit Hilfe der Präzipitinmethode nachweisen können. So gelang es Hauser noch bei einer absoluten Blutmenge von $^1/_{200000}$ ccm, die er mit 4 cmm steril physiologischer Kochsalzlösung, d. h. 1:800 verdünnte, eine absolut sichere Präzipitinreaktion zu erhalten.

Gerade die von einzelnen Autoren immer wieder hervorgehobene größere Empfindlichkeit der Komplementbindungsmethode gegenüber der Präzipitinmethode ist ein Nachteil für die Praxis. So konnte Friedberger zeigen, daß die Spuren Eiweiß, die im menschlichen Schweiß vorkommen, mit dieser Methode festgestellt werden können. Das erscheint besonders beachtenswert, da in der forensischen Praxis diese Fehlerquelle selten ganz auszuschließen ist.

In diesem Falle würde die Präzipitinreaktion keinen Ausschlag mehr gegeben haben, denn selbst sehr hochwertige Antisera geben mit menschlichem Schweiß versetzt keine Reaktion. Wir kommen also hier zu der prinzipiellen Frage, ob man allein bei positivem Ausfalle der Komplementablenkung und negativem Ausfalle der Präzipitinreaktion ein Urteil in der Praxis abgeben soll.

Es könnte dieser Fall z. B. eintreten bei der Untersuchung winzigster Blutflecken. Wie erwähnt gelingt es bei Anwendung der gewöhnlichen Präzipitinreaktion mit Leichtigkeit bei Beobachtung der von uns gegebenen Vorschriften mit hochwertigen Seris noch $^1/_{20000}$ g und mit der Hauser-

Carnwathschen Kapillarmethode $^{1}/_{200000}$ g Bluteiweiß nachzuweisen, was praktisch vollkommen ausreicht. Bei noch kleineren Blutmengen wird natürlich die Präzipitinreaktion immer schwächer und schließlich ist man nicht mehr imstande, eine solche sicher zu erkennen. In solchen Fällen sieht man unter Umständen noch Hemmung der Hämolyse oder Ablenkung bei Anwendung der Komplementbindungsmethode. Ist nur eine Hemmung der Auflösung, nicht eine totale Ablenkung vorhanden, so ist unserer Ansicht nach in der forensischen Praxis ein positiver Ausfall nicht zu verzeichnen.

Wird man nun in solchen und ähnlichen Fällen bei negativem Ausfall der Präzipitinreaktion aber nachgewiesener Ablenkung ein Gutachten, von dem Leben und Tod unter Umständen abhängt, abgeben? Diese Frage müssen wir von unserem Standpunkte aus mit nein beantworten. Die große Kompliziertheit, die Unzahl der kaum noch übersehbaren Fehlerquellen macht diese Methode schon in der Hand des gewiegten Immunitätsforschers zu einer äußerst schwierig zu handhabenden.

Das wird jeder, auch der in alle Einzelheiten eingearbeitete Forscher zugeben; und aus eigener Erfahrung wissen wir, welche Zufälligkeiten oft die Beurteilung erschweren. Wir erinnern an den verschiedenen Ausfall ein und desselben Versuches. Von dem Gerichtsarzt und Chemiker vollends, der nicht dauernd mit dieser Methode arbeitet, kann unmöglich verlangt werden, daß er eine derartig diffizile Immunitätsreaktion völlig beherrscht, und daß er auf Grund dieser Methode allein auf seinen Eid ein folgenschweres Gutachten abgibt. Es wird sich ja auch in Zukunft nicht durchführen lassen, daß man die forensischen Blutuntersuchungen ausschließlich in besonderen Instituten vornimmt.

Aus diesen Ausführungen geht zur Genüge hervor, „daß die Neisser-Sachssche Methode besonders infolge der komplizierten Technik und ihrer übergroßen Empfindlichkeit an praktischer Brauchbarkeit jedenfalls hinter der Uhlenhuth-Wassermannschen zurücksteht". (H. Marx, Prakt. für gerichtl. Med., Berlin 1907.)

Auch Puppe kommt auf Grund seiner Erfahrungen zu dem Schluß, daß die gerichtlich-medizinische Bedeutung der Methode der Komplementablenkung keine erhebliche ist; vom wissenschaftlichen Standpunkt sei sie indes eine außerordentlich willkommene Bereicherung unserer Kenntnisse über die Faktoren, welche einerseits die Präzipitatbildung und andererseits die Hämolyse bedingen.

Wie Neisser und Sachs in ihren ersten Arbeiten selbst hervorhoben, soll ihre Methode nur eine Kontrolle und Ergänzung für die biologische Reaktion sein. Nach Vorschlag von Uhlenhuth ist in jedem forensischen Fall zunächst die gewöhnliche Präzipitinreaktion nach den bekannten Vorschriften auszuführen; ist die Reaktion positiv, so ist ja eine eigentliche Kontrolle überhaupt überflüssig, da Zweifel nicht entstehen können. Jedoch wird man dann zur Bestätigung die Neisser-Sachsche Reaktion heranziehen können, indem man das, was man vorher bereits als Präzipitinbildung notiert hat, in anderer Weise als Farbenreaktion zum schön demonstrablen Ausdruck bringt. Ist aber die gewöhnliche Präzipitinreaktion negativ, die Neisser-Sachssche Reaktion jedoch positiv, so ist in der Praxis, wo es sich häufig um Leben und Tod eines Menschen handelt, auf den positiven Ausfall dieser Reaktion allein ein Urteil über die Provenienz des Blutes nicht abzugeben. (Uhlenhuth, Löffler u. a.)

Der quantitative Blutnachweis.

Versuche eines quantitativen Blutnachweises sind zuerst von Strassmann und Ziemke angestellt worden.

Die Bedeutung derartiger quantitativer Feststellungen von Blutmengen außerhalb des Körpers wird wesentlich sein für die Frage, ob Wunden bei Lebzeiten oder nach dem Tode entstanden waren, sowie dafür, ob ein Mord am Fundort der Leiche oder anderswo geschah. Nach Kockel würden insbesondere quantitative Bestimmungen des in der Umgebung einer Leiche befindlichen Blutes geeignet sein, Klarheit in jene oft fälschlicherweise als Ritualmorde bezeichneten Verbrechen zu bringen, die begangen werden, um menschliches Blut für rituelle Zwecke zu gewinnen.

Strassmann und Ziemke haben zunächst versucht, für die Bestimmung der Menge des an Kleidungsstücken haftenden Blutes ein geeignetes Verfahren auszuarbeiten. Für frischere Blutspuren empfehlen die genannten Autoren die kolorimetrische Bestimmung, die ausgeführt wird, indem den blutbefleckten Geweben mit destilliertem Wasser oder gesättigter Boraxlösung der Blutfarbstoff entzogen wird. An der so erhaltenen Blutlösung wird mit dem Gowerschen Hämoglobinometer der Hämoglobingehalt bestimmt und daraus dann die ursprüngliche Blutmenge berechnet. Das hierbei sich ergebende Defizit betrug bei frischen Blutflecken höchstens 15 %, bei älteren ca. 30 % der tatsächlich vorhandenen Blutmenge. In der Praxis dagegen, wo über den ursprünglichen Hämoglobingehalt des Individuums nichts bekannt ist, wo derselbe z. B. bei Anämie bis 40 % herabgesetzt sein kann, würden die Resultate noch viel ungünstiger ausfallen.

Für ältere Blutflecken, in denen schon Umwandlung des Hämoglobins in Methämoglobin eingetreten ist, haben Strassmann und Ziemke eine zweite Methode, die auf der Bestimmung der Trockensubstanzen des Blutes beruht, angegeben. An gleichen Flächenteilen des blutgetränkten und des blutfreien Gewebes wird die Trockensubstanz ermittelt; die Gewichtsdifferenz entspricht dann dem Gewichte der Trockensubstanz des Blutes. Die bei diesen Laboratoriumsversuchen erhaltenen Zahlen blieben bis zu 20 % hinter dem wahren Wert zurück. Durch Verunreinigungen irgendwelcher Art, sowie durch Fäulnis können diese Fehler nicht unerheblich erhöht werden.

Ein einfaches, zur schnellen Orientierung brauchbares Verfahren wird von Marx angegeben. Die blutgetränkten Gegenstände werden 24 bis 48 Stunden mit destilliertem Wasser ausgelaugt, darauf wird das spezifische Gewicht der Lösung mittels eines Aräometers bestimmt. Aus dem spez. Gewicht der Lösung, das im direkten Verhältnis zur Menge des ausgelaugten Blutes steht, aus der Menge des benutzten Wassers und aus dem spezifischen Gewicht des Blutes = 1055 wird die Menge des Blutes berechnet. Diese Methode empfiehlt sich nach Marx besonders für die Messung großer Blutmengen.

Als weitere Methode für die quantitative Blutbestimmung hat A. Schultz neuerdings das biologische Verfahren zu verwerten gesucht. Er benutzte hierzu zwei konstant auftretende Eigenschaften der biologischen Reaktion, einmal daß die Intensität der spezifischen Trübungen von dem jeweiligen Grade der Blutverdünnung abhängig und ihr genau angepaßt ist, und daß sich dabei zweitens der zeitliche Ablauf der Trübungen ebenfalls nach bestimmten Gesetzen vollzieht. Vorbedingung

für die quantitative Bestimmung ist die Kenntnis der genauen Wertigkeit des zur Verwendung kommenden spezifischen Serums. Die Wertigkeit muß in einem solchem Falle nicht für Serum, sondern für Blut berechnet sein; zu diesem Zwecke stellt man sich eine ganze Reihe Blutverdünnungen her, deren Abstände mit den zunehmenden Verdünnungen allmählich immer größer werden, z. B.: 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000, 1:10000, 1:12000, 1:16000, 1:20000 usw. Zu jeder dieser Verdünnungen kommt ein 10 %iger Zusatz des homologen Antiserums; um dasselbe gleichmäßig in der Flüssigkeit zu verteilen, müssen die einzelnen Röhrchen geschüttelt werden. Der Beginn der spezifischen Trübungen bei den verschiedenen Konzentrationsgraden wird genau beobachtet und sofort zu Protokoll genommen. Auf diese Weise ist z. B. ermittelt worden, daß nach Zusatz des spezifischen Serums nach 30 Minuten bei der Verdünnung der Blutlösung von 1:10000 eine Trübung auftritt.

Jetzt wird das bluthaltige Material unter häufigem Umschütteln in der bekannten Weise mit 0,6 %iger Kochsalzlösung 24 Stunden ausgelaugt. Von dem erhaltenen, klar filtrierten Extrakte werden Verdünnungen in bestimmter Progression angelegt; hierzu kommen je 10 % des auf seine Wertigkeit geprüften Antiserums. Nach tüchtigem Durchschütteln wird der Beginn der Trübungen in den einzelnen Röhrchen schriftlich fixiert. Findet man nun beispielsweise in einem Röhrchen 30 Minuten nach dem Antiserumzusatz eine beginnende Trübung, so ist das ein Beweis dafür, daß man es auch hier mit Konzentrationsgrad von 1:10000 zu tun hat.

Für die Rechnung kommt dann folgendes in Betracht: Die Auslaugungsflüssigkeit besteht aus den in Lösung gegangenen spezifischen Blutbestandteilen, dessen Menge ermittelt werden soll und die daher mit x bezeichnet wird, und der Kochsalzlösung, deren Menge bekannt ist und die mit k bezeichnet wird. Es verhält sich in der Auslaugungsflüssigkeit die Blutmenge zur Menge der Kochsalzlösung wie $x:k$. Wird jetzt ein abgemessenes Quantum dieser Auslaugungsflüssigkeit, z. B. 10 ccm, mit ebensoviel 0,6 %iger Kochsalzlösung gemischt, so ist nunmehr das Verhältnis der Blutmenge zur Kochsalzlösung wie $x:2k$. Ein abgemessenes Quantum dieses Gemisches wieder mit der gleichen Menge Kochsalzlösung zusammengebracht, gibt ein Verhältnis von $x:4k$. Ist nun die Konzentration einer in dieser Weise angelegten Verdünnung schließlich ermittelt — sagen wir in der mit $x:200k$ bezeichneten Verdünnung —, so läßt sich daraus der Wert für x selbst berechnen. Beträgt die Konzentration z. B. 1:10000, so verhält sich $1:10000 = x:200k$ oder $x = {}^1/_{50}k$, oder, wenn k 2500 ccm beträgt, $x = 50$.

Die mit dieser Methode von SCHULTZ erzielten Resultate waren sehr günstig; so konnte der Autor in Sand, Gartenerde und Sägespänen Blut bis zu etwa 10 Tagen noch in ganzer Menge nachweisen; ferner konnte noch nach 8 Monaten die an Leinwand angetrocknete Blutmenge genau bestimmt werden. Aber diese Methode hat auch ihre Fehlerquellen in der forensischen Praxis. Es kann durch Fäulnis, Hitze oder andere Schädigungen eine Reduktion der löslichen Eiweißkörper eingetreten sein und andererseits kann gelegentlich das Blut durch andere Eiweißkörper derselben Spezies verunreinigt sein.

Nachdem wir in den obigen Ausführungen eine genaue Beschreibung der wichtigsten für die gerichtsärztliche Praxis in Betracht kommenden Blutdifferenzierungsmethoden gegeben und die Brauchbarkeit der einzelnen Verfahren kritisch beurteilt haben, soll jetzt kurz der

Gang einer Blutuntersuchung.

angegeben werden.

Die erste Frage, die der Sachverständige zu beantworten hat, ist stets: Handelt es sich überhaupt um Blut? Wenn auch in gerichtsärztlichen Untersuchungen nach der Vorgeschichte und nach dem Aussehen der Flecken vielfach darüber kein Zweifel besteht, so ist doch der einzig richtige Weg, dieses mit positiver Sicherheit zu beweisen, die Ausführung der chemisch-physikalischen Reaktionen.

Wenn für die forensische Blutuntersuchung reichliches Material zur Verfügung steht, so empfiehlt es sich, bei eingetrocknetem Blute als Vorproben die van Deensche Guajakprobe und die Richtersche Wasserstoffsuperoxydprobe auszuführen. Bei positivem Ausfall der erwähnten Vorproben wird man dann die mikroskopische und die Teichmannsche Häminprobe vorzunehmen haben. Bei ganz frischen Blutflecken und wenn es sich um die Differenzierung zwischen Säugetier- und Vogel- resp. Fisch- oder Amphibienblut handelt, darf die mikroskopische Untersuchung nicht unterbleiben. Fallen die beiden Proben negativ aus, so muß man den spektroskopischen Nachweis auf Blut zu erbringen suchen. Erst wenn auf diese Weise das Vorhandensein von Blut sicher bewiesen ist, geht man zur biologischen Methode über.

Stehen dem Sachverständigen nur Spuren von Untersuchungsmaterial zur Verfügung, so muß er natürlich auf einzelne der Vorproben verzichten. Da die Teichmannsche Häminprobe in einer großen Anzahl der Fälle nicht gelingt, obwohl sicher Blut vorhanden ist, so empfehlen Strassmann und Marx in solchen Fällen nur die spektroskopische Methode anzuwenden.

Der Gang der Blutuntersuchung bei geringfügigem Material ist nach den Angaben von Max folgender:

„Der kleine verdächtige Fleck wird mit einer entsprechenden Menge 0,6 %iger Kochsalzlösung während 24 Stunden ausgelaugt, die Lösung wird durch Filtrieren und Zentrifugieren geklärt und eventuell mit Hilfe der Hauserschen Kapillarröhrchenmethode mittels entsprechenden Antiserums geprüft, der Rest der nicht filtrierten und nicht zentrifugierten Lösung wird mit einem oder mehreren Tropfen einer 1 %igen Kalilauge alkalisch gemacht und durch Zusatz einer geringen Menge Schwefelammoniums reduziert.“ Bei Vorhandensein von Blutfarbstoff erhält man dann das Spektrum des Hämochromogens*). Dasselbe besitzt zwei charakteristische Streifen, von denen der erste außerordentlich intensiv ist und etwa in der Mitte zwischen D und E liegt. Der zweite Streifen ist schwächer und liegt bei E.

Bei der Differenzierung mit Hilfe der biologischen Methode dürfte es sich immer empfehlen, zunächst festzustellen, ob das Blut vom Menschen herstammt. Bei negativem Ausfall der

*) Das Spektrum des Hämochromogens hat für die gerichtsärztliche Praxis große Bedeutung, weil es sich aus den kleinsten Blutpartikelchen herstellen läßt und weil es auch noch in relativ schwachen Lösungen, in denen ein anderes Spektrum nicht mehr erkennbar sein würde, sehr deutlich hervortritt.

Reaktion wird man sich dann zur Beantwortung der weiteren vom Richter gestellten Fragen zuwenden.

Wird in seltenen Fällen der Sachverständige beauftragt, die Herkunft des Blutes zu bestimmen, ohne daß nach dem beigefügten Aktenmaterial irgend eine bestimmte Blutart in Betracht kommt, so ist es zweckmäßig, nach vorhergegangener Untersuchung auf Menschenblut, ein Schaf- oder Ziegenantiserum in Anwendung zu ziehen. Aus dem völlig negativen Ausfall der Reaktion wird dann geschlossen werden können, daß es sich nicht um Schaf-, Ziegen- oder Rinderblut handeln kann. Fällt dagegen die Reaktion positiv aus, so ist die Differenzialdiagnose zwischen Schaf-, Ziegen- und Rinderblut zu stellen; die erstere Entscheidung, ob Schaf oder Ziegenblut, ist, wie bereits erwähnt, durch die biologische nicht sicher zu erbringen wegen der sehr nahen Verwandtschaft von Schaf und Ziege, während die zweite Entscheidung, ob Schaf- bezw. Ziegen- oder Rinderblut vorliegt, nach Verwendung von Rinderantiserum an der Hand von Kontrollproben mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zu treffen ist. Ähnliche Verhältnisse wie bei Schaf und Ziege liegen bei anderen nahe verwandten Tieren vor, wie Pferd und Esel, Hund und Fuchs, auch bei den nahe verwandten Vogelarten, wie z. B. Gans und Ente, sind diese Verhältnisse wohl zu berücksichtigen.

Um die praktische Bedeutung der biologischen Methode für die gerichtliche Medizin zu illustrieren, sei eins von den zahlreichen Gutachten, die UHLENHUTH in seinem Buche: „Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen- und Tierblut sowie anderer Eiweißsubstanzen, und seine Anwendung in der forensischen Praxis“ (Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1905) zusammengestellt hat, hier angeführt. Wir verweisen ferner auf unser bereits im Druck befindliches Buch: „Technik und Methodik der biologischen Blut- und Fleischuntersuchung“. (Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1909.)

Der Erste Staatsanwalt T., den 28. August 1903.
5 J 102/03.

Haftsache.

In der Untersuchungssache wider den Fleischer Albert H. aus L. übersende ich Euer Hochwohlgeboren hierbei:

1. eine gelbbraune Hose,
2. ein Hemd,
3. ein Taschentuch

mit dem ergebenen Ersuchen, diese drei Stücke daraufhin zu untersuchen, ob die in ihnen befindlichen Blutflecke von Menschenblut herrühren und ein Gutachten über das Ergebnis der Untersuchung zu erstatten.

Zur Information darf ich wohl hervorheben, daß der Angeschuldigte, welchem die übersandten drei Stücke gehören, unter der Beschuldigung steht, einen Raubmord ausgeführt zu haben.

Da die Sache bereits in der nächsten Schwurgerichtsperiode zur Aburteilung gelangen soll, so ersuche ich Euer Hochwohlgeboren um gefällige äußerste Beschleunigung und Rücksendung der Asservate, sobald sie dort entbehrlich sind. gez. E.

Greifswald, 8. September 1903.

Gutachten.

Auf Veranlassung des Ersten Staatsanwaltes zu T. sind mir unter 28. VIII. 03 Journ.-Nr. 5 J 102/03 in der Untersuchungssache wider den Fleischer Albert H. aus L. 1. ein Hemd, 2. ein Taschentuch und 3. eine Hose übersandt mit dem Ersuchen, festzustellen, ob die an diesen Sachen befindlichen Blutflecke von Menschenblut herrühren, und ein Gutachten über das Ergebnis der Untersuchung zu erstatten.

ad 1. Hemd.

Die äußere Besichtigung ergibt folgenden Befund:

An den unteren Dritteln beider Ärmel, ganz besonders an dem umgenähten Ärmelrand, befinden sich an der Außenseite, zum Teil aber auch an der Innenseite, zahlreiche diffuse und zirkumskripte braunrote Flecke von verschiedener Größe und Gestalt, die auf den ersten Blick den Verdacht erwecken, daß sie von Blut herrühren. Besonders verdächtig erscheinen einzelne winzige Fleckchen an beiden Ärmeln, die wie Blutspritzer aussehen.

Um nun den Beweis zu erbringen, daß diese blutverdächtigen Flecken in der Tat von Blut herrührten, wurden zunächst die üblichen chemischen Reaktionen angestellt.

Behufs Ausführung derselben wurden zahlreiche kleine Partikelchen des blutverdächtigen Materiales abgekratzt, zerzupft und mit etwas Wasser auf einem Stückchen Filtrierpapier ausgelaugt, sodaß an diesen Stellen das Papier gelblich gefärbt erschien. Sodann wurde als Vorprobe die van Deensche Guajak-Probe angestellt; d. h. die gelblich gefärbten Fleckchen auf dem Filtrierpapier wurden mit ozonhaltigem Terpentinöl und alkoholischer Guajakharzlösung übergossen. Sofort trat eine intensive Blaufärbung der vorher gelblich gefärbten Flecken auf, wie sie für das Vorhandensein von Blut charakteristisch ist. Doch genügt diese Reaktion nicht für den sicheren Nachweis von Blut.

Es wurde daher weiterhin die Teichmannsche Häminprobe ausgeführt. Einzelne zerzupfte, blutverdächtige Fäserchen wurden mit einigen Körnchen Kochsalz und wenigen Tropfen Eisessig versetzt; sodann wurde das Ganze über der Flamme leicht erwärmt und mikroskopisch untersucht. Man sah dann bei dieser mikroskopischen Betrachtung sehr zahlreiche rhomboide Stäbchen und hanfkornförmige Gebilde, die sog. Häminkristalle. Durch diesen Befund war der Nachweis von Blut mit Sicherheit erbracht.

Es konnte nunmehr zur Bestimmung der Herkunft des Blutes geschritten werden.

Die Bestimmung derselben erfolgt nach der von mir angegebenen und in die forensische Praxis eingeführten Methode. Sie beruht auf der Tatsache, daß das Serum eines mit Blut längere Zeit vorbehandelten Kaninchens die Eigenschaft besitzt, nur in der zur Vorbehandlung benutzten Blutlösung einen Niederschlag zu erzeugen, während der Zusatz desselben Serums zu anderen Blutlösungen in diesen einen Niederschlag nicht hervorruft.

Da hier zunächst der Verdacht auf Menschenblut vorlag, wurde zu einer aus den blutbefleckten Zeugstückchen durch längeres Auslaugen mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellten stark verdünnten Blutlösung ein gewisses Quantum hochwertigen Blutserums eines mit Menschenblut vorbehandelten Kaninchens hinzugefügt. Schon nach wenigen Augenblicken war in dieser Lösung eine starke Trübung entstanden, die sich bald als flockiger Niederschlag auf dem Boden des Reagenzglases absetzte. Die Kontrollblutlösungen der verschiedensten Tiere, Schwein, Hammel, Rind, Pferd usw. blieben bei Zusatz dieses Serums klar; auch gab das Serum eines mit Schweine- und Rinderblut vorbehandelten Kaninchens in der betreffenden Flüssigkeit keine Reaktion. Auch normales, von nicht vorbehandelten Kaninchen stammendes Serum bewirkte keinerlei Trübung.

Zahlreiche, von verschiedenen Stellen an beiden Ärmelrändern hergestellte Blutlösungen ergaben dasselbe unzweideutige Resultat. Damit war bewiesen, daß die von mir untersuchten Blutflecken von Menschenblut herrührten. Die Untersuchnng eines in der Genitalgegend befindlichen Schmutzfleckens, sowie mehrerer schmutzig verwaschen aussehender Stellen an beiden Ärmeln, konnte das Vorhandensein von Blut nicht feststellen.

ad 2. Taschentuch.

Das äußerst schmutzige Taschentuch zeigt zahlreiche Löcher. Man sieht mehrfache, unregelmäßig gestaltete, kleine rotbraune, blutverdächtige Flecken, die zum Teil mit winzigen, rotbraunen Krusten bedeckt sind; diese werden in derselben Weise untersucht wie ad 1 beschrieben. Es konnte auch hier sowohl der chemische Nachweis von Blut als auch die Herkunft desselben — Menschenblut — bei zahlreichen von mir untersuchten Flecken mit Sicherheit erbracht werden.

ad 3 gelbbraune Hose.

An der geflickten Hose sieht man am rechten und linken Hosenbein zahlreiche verschieden große Löcher. Bis auf mehrere grauschwarze Schmutzflecken war bei oberflächlicher Besichtigung der Hose nichts zu finden, was für Blut hätte gehalten werden können. Jedoch ergab eine sehr genaue eingehende Betrachtung, daß am rechten und linken Hosenbein mehrere verwaschen aussehende, winzige rötliche Flecken zu konstatieren waren. Auch konnten mehrere hanfkorngroße, spritzerartige Krusten aufgefunden werden, die sich bei Anwendung der Guajak- und TEICHMANNschen Proben als Blut erwiesen. Da die einzelnen Fleckchen für die Bestimmung der Herkunft des Blutes zu wenig Material lieferten, wurden mehrere rötlichbraun gefärbte Flecken, die sich am linken Hosenbein vorfanden, in toto ausgelaugt und bezüglich Herkunft untersucht. Die biologische Reaktion war positiv, ein Beweis, daß sie von Menschenblut herrührten.

Die Untersuchung eines in der rechten Kniegegend befindlichen grauschwarzen verwaschenen Fleckens führt zu keinem positiven Resultat.

Auf Grund dieses Befundes ist es mit Sicherheit erwiesen, daß die von mir untersuchten Flecken von Blut und zwar von Menschenblut herrühren, da Affenblut nach den richterlichen Erhebungen auszuschließen ist.

gez. UHLENHUTH.

Auf Grund eines erdrückenden Indizienbeweises, bei welchem die Blutuntersuchung als wichtiger Faktor mit in Betracht kam, ist H. zum Tode verurteilt worden. Kurz vor der Hinrichtung hat er ein umfassendes Geständnis abgelegt.

Nachdem in zahlreichen Fällen der Praxis die biologische Methode wichtige Aufschlüsse über die Herkunft verdächtiger Blutflecke ergeben hatte, ist diese Methode in zahlreichen Ländern und Staaten durch offizielle Verfügungen in die forensische Praxis eingeführt, so in Preußen, Österreich, Württemberg, Baden, Elsaß usw.

Verfügungen.

Preußen.

Erlaß betr. die von dem Stabsarzt Prof. Dr. UHLENHUTH in Greifswald ermittelte Methode der Blutuntersuchung vom 8. September 1903.

Von dem Stabsarzte Professor Dr. UHLENHUTH in Greifswald ist eine Methode der Blutuntersuchung ermittelt worden, welche es ermöglicht, die Art des zu untersuchenden Blutes festzustellen und namentlich Menschenblut mit Sicherheit von Tierblut zu unterscheiden. Bei der Behandlung des zu untersuchenden Blutes mit Serum aus dem Blute von Kaninchen, denen zuvor Blut anderer Tiere oder Menschenblut eingespritzt war, ergeben sich bestimmte Erscheinungen, wenn das zu untersuchende Blut von derselben Art ist, wie das zuvor den Kaninchen eingespritzte. Es kann deshalb jede Art von Blut, wenn das entsprechende Serum angewendet wird, bestimmt werden. Die wissen-

schaftliche Deputation für das Medizinalwesen hier hat sich über den Wert der Methode mit Hervorhebung von deren großen Bedeutung wie folgt geäußert:

„Die Erfahrungen über die Serummethode der Blutuntersuchung sind bereits in Deutschland wie im Auslande so ausgedehnte, die Resultate der Forschungen im wesentlichen so übereinstimmende, daß kein Zweifel mehr darüber bestehen kann, daß diese neue biologische Methode in der Mehrzahl der Fälle mit großer Sicherheit gestattet, frisches sowie angetrocknetes Blut nach seiner Herkunft zu bestimmen, Menschenblut von Tierblut, Blut verschiedener Tierarten zu unterscheiden. Es ist daher dringend geboten, diese vortreffliche Methode, welche natürlich die alten bewährten Methoden des Blutnachweises nicht verdrängen, sondern nur ergänzen und vervollständigen soll, für die gerichtliche Praxis allgemein nutzbar zu machen."

Als Institute, bei denen diese Methode seit längerer Zeit zur Anwendung gelangt, werden bezeichnet:

Das hygienische Institut der Universität Greifswald;
Das Institut für Infektionskrankheiten in Berlin, Nordufer 39;
Das Institut für Staatsarzneikunde in Berlin;
Das Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.

Diese Institute werden in erster Linie für die Vornahme von Untersuchungen der in Rede stehenden Art empfohlen.

Indem ich auf diese Methode der Blutuntersuchung aufmerksam mache, empfehle ich, in allen Fällen die Untersuchungen nach ihr ausführen zu lassen.

Abdrücke dieser Verfügung sind zur weiteren Mitteilung an die Landesgerichtspräsidenten und die Ersten Staatsanwälte des dortigen Bezirks beigefügt.

Der Justizminister
I. A.: gez. Vietsch.

(Siehe Veröffentlichungen des Kaiserlichen Gesundheitsamtes 1903, Bd. XXVII, Jahrgang 42.)

Österreich.

I. Verordnung des Justizministeriums im Einvernehmen mit den Ministerien des Innern und für Kultus und Unterricht betr. die biochemische Untersuchung von Blutspuren im Strafverfahren. Vom 13. Aug. 1903. (Österr. San.-Wesen, pag. 358.)

Neben der bisherigen mikroskopischen Methode, Blutspuren auf ihre Herkunft zu untersuchen, welche Methode in der Anwendung vielfach auf Schwierigkeiten stößt und häufig nicht zu zuverlässigen Ergebnissen führt, besteht gegenwärtig eine neue biochemische (die sogenannte Uhlenhuthsche) Methode. Ihr Wesen besteht darin, daß durch wiederholte Einspritzung des Blutserums eines bestimmten Tieres, z. B. eines Hundes, in das Blut eines Tieres, z. B. eines Kaninchens, sich im letzteren gewisse „Präzipitine" genannte Stoffe bilden, welche die Eigenschaft haben, nur aus dem Blutserum desselben Tieres (des Hundes) eine Eiweisfällung zu erzeugen, während das Blutserum jeder anderen Tierart klar bleibt. Es wurde nun vorläufig bei dem gerichtlich-medizinischen Institute der Wiener Universität die Vornahme derartiger Untersuchungen zu strafgerichtlichen Zwecken ermöglicht, zu welchem Zwecke das staatliche serotherapeutische Institut in Wien das erforderliche Serum beistellt. Die Benutzung dieser Einrichtung erfolgt derart, daß die Gerichte dem gerichtlich-medizinischen Institute der Wiener Universität die betreffenden, auf Blutspuren zu untersuchenden Gegenstände in sorgfältiger Verwahrung und mit genauer Bezeichnung zum Zwecke der Untersuchung einsenden. Zugleich haben die Gerichte dem zu untersuchenden Institute die Fragen bekannt zu geben, zu deren Beantwortung die Untersuchung des Blutes führen soll und jene Ergebnisse des Verfahrens mitzuteilen, die es dem Institute so weit als tunlich ermöglichen sollen, zu beurteilen, welche Blutspuren in Frage kommen (menschliches Blut, Tierblut im allgemeinen oder Blut von bestimmten Tiergattungen).

Besteht beispielsweise der Verdacht, daß die Spuren von Menschenblut herrühren, geht aber die Verantwortung des Beschuldigten dahin, daß sie von

einer bestimmten Tiergattung stammen, so wäre dem Institute auch dieser Umstand mitzuteilen, damit die Prüfung auch auf das Blut dieser Tiergattung erfolgen könne. Es ist die Einrichtung getroffen, daß die Untersuchung bei dem genannten Institute vorläufig sowohl nach der bisherigen mikroskopischen, als nach der neuen biochemischen Methode vorgenommen wird, um dadurch eine erhöhte Garantie und Kontrolle zu erzielen.

Von der aus dieser Einrichtung zu gewinnenden Erfahrung und der Zahl der Untersuchungsfälle wird es abhängen, ob und in welchem Umfange solche Untersuchungen in Zukunft auch an anderen gerichtlich-medizinischen Instituten einzuführen sind.

Was die Kosten dieser Untersuchung anbelangt, so wird das genannte Institut die im Gebührentarife vom 20. März 1901 unter Post. A, 3, C angeführten Gebühren beanspruchen, welche von den Gerichten fallweise dem Institute einzusenden und als Kosten des Strafverfahrens zu verrechnen sind. (V.-Bl. des Just.-Min. Nr. 25, S. 208).

(Siehe Veröffentlichungen des Kaiserl. Gesundheitsamtes, XXVII. Jahrg., Nr. 41, 14. Oktober 1903.)

II. Verordnung des Justizministeriums im Einvernehmen mit den Ministerien des Innern und für Kultus und Unterricht vom 23. März 1907, betreffend die biochemische Untersuchung von Blutspuren im Strafverfahren.

Mit der Verordnung vom 13. August 1903, Just.-Min. V.-Bl. Nr. 25, wurde den Gerichten und Staatsanwaltschaften bekannt gegeben, daß vorläufig in dem gerichtlich-medizinischen Institute der Wiener Universität Einrichtungen getroffen wurden, um die neue biochemische Methode, Blutspuren auf ihre Herkunft zu untersuchen, für strafgerichtliche Zwecke zu verwerten. *Die hier und in anderen in- und ausländischen Instituten durchgeführten zahlreichen wissenschaftlichen Untersuchungen haben ergeben, daß die Eiweißdifferenzierung in Form der biochemischen Methode tatsächlich ein verläßliches Mittel sei, um frisches sowie eingetrocknetes Blut nach seiner Herkunft zu bestimmen, Menschenblut vom Tierblut und Blut verschiedener Tiergattungen zu unterscheiden.*

Um die Benutzung dieser Methode für gerichtliche Zwecke zu erleichtern, werden vom 1. Mai d. J. angefangen auch die gerichtlich-medizinischen Institute der Universitäten Prag, Krakau, Lemberg, Graz und Innsbruck derartige Blutuntersuchungen auf Ersuchen der Gerichte vornehmen und es werden sich die Gerichte der Oberlandesgerichtssprengel Wien, Prag, Krakau, Lemberg, Graz und Innsbruck an das gerichtlich-medizinische Institut der in ihrem Oberlandesgerichtssprengel gelegenen Universitäten, die Gerichte des Oberlandesgerichtssprengels Brünn an die Institute der Universitäten Wien oder Prag und die Gerichte des Oberlandesgerichtssprengels Triest und Zara an das Institut der Universität Graz zu wenden haben.

Die Zahl der an das gerichtlich-medizinische Institut der Wiener Universität gelangten Ersuchen war eine verhältnismäßig geringe und es werden die Gerichte angewiesen, in allen Fällen, in denen Blutspuren auf ihre Provenienz zu prüfen sind und nicht besondere Umstände eine Ausnahme rechtfertigen, die vorgenannten Universitätsinstitute wegen Vornahme der Untersuchung in Anspruch zu nehmen. Bei diesen Ersuchen sind die in Absatz 3 der Verordnung vom 13. August 1903 gegebenen Direktiven über die Verwahrung und Bezeichnung der einzelnen Gegenstände, über die Bekanntgabe der für die wissenschaftliche Untersuchung relevanten Ergebnisse des Verfahrens und die dem Institute vorzulegenden Fragen zu beachten.

Die Institute werden neben der biochemischen Methode auch noch die mikroskopische oder die spektroskopische Methode, nach Erfordernis alle drei Methoden anwenden, um dadurch eine erhöhte Garantie zu erreichen. *Das erforderliche Serum wird von dem staatlichen serotherapeutischen Institute in Wien hergestellt.*

Die Vorschrift des letzten Absatzes der Verordnung vom 13. August 1903 über die Vergütung der Kosten hat für alle Institute zu gelten.

Klein.

Württemberg.

Bekanntmachung des Justizministeriums vom 14. Oktober 1904, betreffend die Uhlenhuthsche Methode der Blutuntersuchung.

Von dem Stabsarzte Professor Dr. Uhlenhuth in Greifswald ist eine neue Methode der Blutuntersuchung ermittelt worden, welche es ermöglicht, die Art des zu untersuchenden Blutes festzustellen und namentlich Menschenblut mit Sicherheit von Tierblut zu unterscheiden. Bei der Behandlung des zu untersuchenden Blutes mit Serum aus dem Blute von Kaninchen, denen zuvor Blut anderer Tiere oder Menschenblut eingespritzt war, ergeben sich bestimmte Erscheinungen, wenn das zu untersuchende Blut von derselben Art ist wie das zuvor dem Kaninchen eingespritzte. Es kann deshalb jede Art Blut, wenn das entsprechende Serum angewendet wird, bestimmt werden.

Das Kgl. Medizinalkollegium hat die Entwicklung und Ausbildung dieser biochemischen Methode der Blutuntersuchung seit ihrer Entdeckung mit Interesse verfolgt und sich dahin ausgesprochen, daß der Wert dieser Untersuchungsmethode unbestreitbar sei. Das Kgl. Medizinalkollegium ist in der Lage, derartige Untersuchungen in seinem hygienischen Laboratorium, medizinische Abteilung, ausführen zu können.

Hiernach wird den Gerichten und Staatsanwaltschaften empfohlen, sich vorkommendenfalls dieser neuen, auch von der Kgl. preußischen wissenschaftlichen Deputation für das Medizinalwesen anerkannten Methode der Blutuntersuchung zu bedienen und sich dieserhalb an das hygienische Laboratorium, medizinische Abteilung, des Kgl. Medizinalkollegiums in Stuttgart zu wenden.

Stuttgart, den 14. Oktober 1904. Breitling.

(Siehe Amtsblatt des Königl. Württembergischen Justizministeriums. Jahrg. 1904 [5. November] Nr. 8).

Baden.

Bekanntmachung des Ministeriums der Justiz, des Kultus und Unterrichts vom 8. Februar 1905. Blutuntersuchungen betreffend.

An die Großh. Landgerichte, Großh. Staatsanwaltschaften (einschl. des Herrn Staatsanwalts in Pforzheim) und die Großh. Amtsgerichte.

Von dem Stabsarzt Professor Dr. Uhlenhuth in Greifswald ist eine Methode der Blutuntersuchung ermittelt worden, welche es ermöglicht, die Art des zu untersuchenden Blutes festzustellen und namentlich Menschenblut mit Sicherheit von Tierblut zu unterscheiden. Die Methode ist ein sogenanntes sero-diagnostisches Verfahren, darauf beruhend, daß das Serum (Blutwasser) eines mit einer bestimmten Blutsorte in entsprechender Weise vorbehandelten Kaninchens nur wieder in gleichartiger Blutlösung eine bestimmte Reaktion hervorruft, die sich zunächst in einer Trübung der Lösung, späterhin in Flocken- und Bodensatzbildung äußert.

Im hygienischen Institut der Universität Heidelberg sind die zu Vornahme derartiger Blutuntersuchungen erforderlichen Einrichtungen getroffen; wir empfehlen den Gerichten und Staatsanwaltschaften, in geeigneten Fällen hiervon Gebrauch zu machen.

In Vertretung:
Jübbe.

Änliche Verfügungen sind in Elsaß-Lothringen (10. April 1905), Bayern, Luxemburg, Rußland, Rumänien, Ägypten usw. erlassen worden.

B. Technik und Methodik des biologischen Verfahrens für den Nachweis verschiedener Fleischarten (Pferdefleisch usw.).

Ein solcher Nachweis würde praktisch in Frage kommen
1. für die Fleischbeschau,
2. für die Nahrungsmitteluntersuchung.

Beschäftigen wir uns nun zunächst mit der Anwendung und dem Wert des biologischen Verfahrens für die

Fleischbeschau.

Ehe wir näher darauf eingehen, wollen wir in Kürze die für die Einfuhr von Fleisch in Deutschland gesetzlich vorgeschriebenen Maßnahmen besprechen:

„Das in das Inland eingehende frische Fleisch darf nur in ganzen Tierkörpern, zubereitetes Fleisch (Pökel-, Salz- und geräuchertes Fleisch usw.) dagegen nur in Stücken, die mindestens 4 kg schwer sind, eingeführt werden. Die Einfuhr von Fleisch in luftdichten, verschlossenen Büchsen oder in ähnlichen Gefäßen, sowie von Würsten und sonstigen Gemengen aus zerkleinertem Fleische ist verboten; ebensowenig darf Hundefleisch sowie zubereitetes Fleisch, welches von Pferden, Eseln, Mauleseln oder anderen Tieren des Einhufergeschlechts herrührt, eingeführt werden."

Da frisches Fleisch nur in ganzen Tierkörpern eingeführt werden darf, so wird es bezüglich seiner Herkunft zu Verwechslungen kaum Veranlassung geben. In der Praxis würde es sich nur darum handeln, daß zubereitetes Fleisch von Pferden und anderes Einhuferfleisch unter falscher Deklaration einzuführen versucht würde.

Der bei der Auslandsfleischbeschau als Sachverständiger fungierende Tierarzt wird häufig schon bei einfacher makroskopischer Besichtigung die Herkunft des Fleisches bestimmen können. Erweckt das Fleisch infolge der Farbe der Muskulatur, Farbe und Konsistenz des Fettgewebes, Hervortreten der Faszien den Verdacht, daß es sich um Pferdefleisch handeln könnte, so ist nach den neuen, am 1. April 1908 in Kraft getretenen Ausführungsbestimmungen zum Fleischbeschaugesetz **in erster Linie** die biologische Methode anzuwenden. Sofern die Untersuchung, z. B. bei ungeeigneter Beschaffenheit des Materials (gekochtes Fleisch) nicht zu einem entscheidenden Ergebnisse führt, ist die chemische Untersuchung (Bestimmung der Jod- und Refraktometerzahl) vorzunehmen.

Die Technik und Methodik der biologischen Fleischuntersuchung, die im wesentlichen dieselbe ist wie die der biologischen Blutdifferenzierung, muß natürlich entsprechend der Größe, Art und Konservierung des Untersuchungsmaterials modifiziert werden.

Auf diese Modifikationen soll nun in folgendem näher eingegangen werden.

Was die Entnahme des Untersuchungsmaterials anbelangt, so ist vorgeschrieben, dasselbe aus der Mitte der dicksten Stelle des verdächtigen Fleischstückes zu nehmen, weil diese Partien am wenigsten den evtl. Konservierungsmethoden — vor allem höheren Temperaturen — ausgesetzt gewesen sind. Wenn auch die einzelnen Konservierungsmittel — ausgenommen ist das Kochen — die biologische Reaktion nicht

in Frage stellen, so können sie doch mehr oder weniger die Herstellung einer für die Reaktion brauchbaren Eiweißlösung erschweren. Bei der Entnahme des Untersuchungsmaterials von den Randpartien des verdächtigen Fleischstückes könnten, falls dieses beim Transport mit anderen Fleischsorten in direkte Berührung gekommen ist, bei der Empfindlichkeit der Reaktion, Fehlerquellen entstehen. Bei stark durchgesalzenem Fleisch ist es zweckmäßig, dasselbe, ehe man es mittels 0,85 %iger Kochsalzlösung auslaugen läßt, durch Übergießen mit sterilem destillierten Wasser zu entsalzen; dabei muß das Wasser öfters erneuert werden. Ohne zu schütteln kann man auf diese Weise bereits nach 10 Minuten eine vollkommen genügende Entsalzung erreicht haben.

Um eine gute Auslaugung des Fleischeiweißes zu erzielen, muß das Fleisch möglichst mager sein und fein zerkleinert werden. Was die Schnelligkeit der Auslaugung der in dem Untersuchungsfleische vorhandenen Eiweißsubstanzen anbelangt, so ist sie abhängig von der Art der Konservierung. Bei frischem Fleisch wird in den meisten Fällen bereits nach 1/2 Stunde die für die biologische Reaktion nötige Eiweißkonzentration erreicht sein; bei gepökeltem und geräuchertem Fleische dauert dagegen die Auslaugung erheblich länger. Bei Entnahme des Untersuchungsmaterials aus der Mitte der Stücke, wo am wenigsten durch Räuchern, Pökeln oder Kochen hervorgerufene Eiweißschädigungen zu befürchten sind, genügt in fast allen Fällen zur Herstellung einer brauchbaren Lösung eine dreistündige Auslaugung.

Durch Schütteln eine Beschleunigung der Lösung zu bewirken ist im allgemeinen nicht ratsam, denn es werden dabei, außer den Eiweißkörpern auch noch die selbst in magerem Fleische vorhandenen feinsten Fetttröpfchen mit losgerissen, die dann auf der Oberfläche schwimmen, beim Schütteln der Probelösung eine Schaumbildung verhindern und dadurch die Feststellung, ob bereits eine für die Untersuchung genügend starke Eiweißlösung vorhanden ist, unmöglich machen. Ein weiterer Nachteil entsteht dadurch, daß ein klares Filtrat einer stark fetthaltigen Eiweißlösung nur mit großen Schwierigkeiten herzustellen ist. Handelt es sich um die Herstellung von Auszügen aus fettem Fleisch, so ist der Zusatz von einigen Tropfen Chloroform zu empfehlen.

Zur Orientierung, ob bereits die für die Untersuchung nötige Menge Eiweiß in Lösung gegangen ist, dient auch hier zunächst die Schaumbildung beim Schütteln des Röhrchens. Sie ist allerdings bei Fleischlösungen viel weniger charakteristisch als bei Blutlösungen. Bei Fleischlösungen läßt sich auf Grund der Stärke des Stehenbleibens des Schaumes über die Konzentration der Lösung nichts sicheres sagen. Oft kommt es vor, daß konzentrierte Fleischlösungen viel weniger Schaumbildung zeigen als weniger starke. Es ist das wohl abhängig von dem Fettgehalt der Lösung. Wäre derselbe bei allen Fleischlösungen gleich, so würde man auch hier, wie bei Blut- und Serumlösungen eine ziemliche Regelmäßigkeit in der Stärke der Schaumbildung bei den verschiedenen Verdünnungsgraden beobachten können. Bei Blutlösungen hört die Schaumbildung bei Verdünnungen von etwa 1 : 4000 auf, bei Fleischlösungen läßt sich eine solche Grenze aber wegen ihres schwankenden Fettgehalts nicht bestimmen, sie muß jedenfalls viel niedriger gesetzt werden und wird selbst bei magerem Fleisch kaum 1 : 1000 erreichen.

Nach dem positiven Ausfall des Orientierungsversuches muß ein klares Filtrat hergestellt werden. Bei magerem und frischem Fleische

gelingt es bereits nach zweimaligem Filtrieren durch gehärtete, vorher mit 0,85 $^0/_0$iger Kochsalzlösung angefeuchtete Papierfilter (Schleicher & Schüll, Nr. 575, 603 u. 605) eine klare Lösung zu bekommen. Bei fettem, gepökeltem, geräuchertem und faulendem Fleische kommt man auf diese Weise meist nicht zum Ziel. Recht gute Resultate gibt in solchen Fällen die Filtration mit ausgeglühter Kieselgur (Fig. 10). Man verfährt zweckmäßig in folgender Weise:

Fig. 10. Filtration mittels Kieselgur (BÜCHNERscher Trichter).

Die ausgeglühte Kieselgur wird mit steriler 0,85 $^0/_0$iger Kochsalzlösung zu einem dünnen Brei verrührt. Dieser wird auf die Filterplatte eines BÜCHNERschen Trichters (*a*), der mit der Saugflasche (*b*) mittels eines Gummistopfens in Verbindung steht, gegossen; um das Hindurchfließen der Filtermasse zu verhüten, ist die durchlochte Platte vorher mit Fließpapier sorgfältigst bedeckt. Mittels der auf pag. 805 ff. beschriebenen Saugvorrichtung wird aus dem Brei die Kochsalzlösung abgesaugt und es bleibt die Kieselgur, die in gleichmäßig dicker etwa 2 mm starker Schicht den Boden bedecken soll, zurück. Vor der Filtration der Untersuchungsflüssigkeit muß erst durch Aufgießen von Kochsalzlösung die Filtrationsfähigkeit des Filters geprüft werden. Ein solches Filter ist brauchbar, wenn die Kochsalzlösung vollkommen klar filtriert wird. Bei dieser Filtration hat man daran zu denken, daß Kieselgur, in zu dicker Schicht benutzt, einen erheblichen Teil der Eiweißkörper zurückzuhalten vermag; man wählt daher eine möglichst dünne Schicht der filtrierenden Kieselgur.

NÖTEL empfiehlt zur Herstellung klarer Lösungen die Filtration mit gereinigtem Glasstaub von $^1/_4$ mm Korngröße; dieser wird auf ein feuchtes Filter ausgeschüttet, dann mit der Untersuchungsflüssigkeit angefeuchtet und diese durchfiltriert. Nach seinen Angaben soll hierbei die Einbuße an Eiweißkörpern viel geringer sein wie bei der Kieselgurfiltration.

Da man bei diesen Untersuchungen Pferdefleischeiweiß nachweisen will, so ist von vornherein zur Herstellung spezifischer Sera die Vorbehandlung der Kaninchen mit Fleischpreßsaft oder Fleischauszügen am

rationellsten. Fleischpreßsaft hat sich nach den Untersuchungen von Piorkowski, Ascoli und Grund als Injektionsmaterial nicht bewährt, denn die Tiere gingen infolge der giftigen Eigenschaften des Fleischsaftes schnell zugrunde. Nur Nötel und Ruppin ist es gelungen, so vorbehandelte Tiere durchzubringen, doch haben diese Autoren nur schwach wirksame Sera erzeugen können. Umfangreiche Untersuchungen, die wir selbst in dieser Richtung vorgenommen haben, haben uns ebenso wie W. A. Schmidt gezeigt, daß die Kaninchen Fleischpreßsaft sehr schlecht vertragen. Nur bei steriler Gewinnung von Fleischsaft, der aus ganz frisch entnommenem Pferdefleisch ausgepreßt war und steril intravenös dem Kaninchen einverleibt wurde, gelang es uns, ein spezifisches hochwertiges Serum herzustellen. Schmidt berichtet, daß der durch Berkefeldsche Kerzen filtrierte Fleischsaft in hohem Maße zur Gewinnung spezifischer Sera geeignet ist, und daß sich hiermit leicht ein Serum erzeugen läßt, welches nicht nur reich an Muskeleiweiß-, sondern auch an Bluteiweißpräzipitin ist. Man kann auch in der Weise verfahren, daß man feingeschabtes Fleisch mit dem gleichen Quantum steriler 0,85 %iger Kochsalzlösung mehrere Stunden auslaugen läßt und das Gemisch durch ein gut durchfeuchtetes, ausgekochtes Koliertuch hindurchpreßt. Will man sich für die weiteren Einspritzungen die Fleischeiweißlösungen aufbewahren, so versetzt man sie zweckmäßig mit kleinen Mengen von Chloroform, das man vor der Einspritzung der Tiere durch leichtes Erwärmen verdunsten läßt. Am besten ist es jedoch, für jede Einspritzung eine frische Fleischlösung herzustellen. Am bequemsten und in allen Fällen ausreichend ist nach unseren Erfahrungen die Vorbehandlung der Tiere mit defibriniertem Pferdeblut oder Pferdeserum. Es hat das gleichzeitig den Vorteil, daß man die so gewonnenen Antisera auch zum forensischen Blutnachweis benutzen kann.

Benutzt man für die biologischen Reaktion ein Antiserum, welches durch Vorbehandlung eines Kaninchens mit Pferdeblut- oder Serum gewonnen ist, so hat man die Fleischeiweißverdünnung so zu wählen, daß sie — bezüglich der Stärke der Reaktion — einer Serumverdünnung von etwa 1 : 1000 entspricht. Es ist das der Fall, wenn sich in 300 Teilen der Ausziehungsflüssigkeit 1 Teil Fleischeiweiß befindet. Diese Verdünnung läßt sich ebenfalls nur empirisch durch die Salpetersäurekochprobe bestimmen; sie ist dann erreicht, wenn bei der Reaktion eine opaleszierende Eiweißtrübung entsteht, die sich nach etwa 5 Minuten langem Stehen als eben noch erkennbarer flockiger Niederschlag zu Boden senkt. Die als Kontrollösungen in Frage kommenden Pferde-, Schweine- und Rindfleischextrakte sind genau so wie die Untersuchungsflüssigkeit herzustellen und müssen denselben Konzentrationsgrad haben. Benutzt man ausnahmsweise zur Kontrolle angetrocknetes Blut oder Serum, so ist hierbei in der bekannten Weise eine Verdünnung von etwa 1 : 1000 zu wählen. Nach der Herstellung der klaren Lösungen wird die Reaktion genau in der oben angegebenen Weise und mit Benutzung der notwendigen Kontrollen ausgeführt. Handelt es sich nicht um Pferdefleisch, so sind die anderen Antisera (Schweine-, Rinder- usw. Antiserum) zu verwenden.

Nach Herstellung der klaren Untersuchungs- und Kontrollösungen muß die Reaktion sofort angeschlossen werden, da sich nach längerem Stehen die Lösungen leicht wieder trüben können. Ostertag empfiehlt, falls man die klaren Lösungen längere Zeit brauchbar aufbewahren will, Zusatz von Formalin.

Unter Berücksichtigung der oben erörterten Punkte ist für die biologische Untersuchung auf Pferdefleisch folgende Anweisung im Kaiserl. Gesundheitsamt*) ausgearbeitet und nach § 16, Abs. 3 der Anlage a zu den am 1. April 1908 in Kraft getretenen Ausführungsbestimmungen D zum Fleischbeschaugesetz gesetzlich vorgeschrieben. Hier heißt es:

„Beim Vorliegen des Verdachtes verbotswidriger Einfuhr von zubereitetem Einhuferfleisch (§ 2 Abs. 1 Nr. 4) ist die biologische Untersuchung auszuführen. Sofern diese Untersuchung, z. B. bei ungeeigneter Beschaffenheit des Materials, nicht zu einem entscheidenden Ergebnisse führt, ist die chemische Untersuchung (Anlage a zu den Ausführungsbestimmungen D, Erster Abschnitt unter I) vorzunehmen.

Zur Ausführung der biologischen Untersuchung auf Pferdefleisch und anderes Einhuferfleisch sind mit einem ausgeglühten oder ausgekochten Messer aus der Tiefe des verdächtigen Fleischstückes etwa 30 g Muskelfleisch, möglichst ohne Fettgewebe, von einer frisch hergestellten Schnittfläche zu entnehmen und auf einer ausgekochten, mit ungebrauchtem Schreibpapier bedeckten Unterlage durch Schaben mit einem ausgekochten Messer zu zerkleinern. Die zerkleinerte Fleischmasse wird in ein ausgekochtes oder sonst durch Hitze sterilisiertes, etwa 100 ccm fassendes Erlenmeyersches Kölbchen gebracht, mit Hilfe eines ausgekochten sterilisierten Glasstabes gleichmäßig verteilt und mit 50 ccm sterilisierter 0,85 %iger Kochsalzlösung übergossen. Gesalzenes Fleisch ist zuvor in einem größeren sterilisierten Erlenmeyerschen Kolben zu entsalzen, indem man es mit sterilem destillierten Wasser übergießt und letzteres, ohne zu schütteln, während zehn Minuten mehrmals erneuert. Das Gemisch von Fleisch und 0,85 %iger Kochsalzlösung bleibt zur Ausziehung der im Fleische vorhandenen Eiweißsubstanzen etwa drei Stunden bei Zimmertemperatur oder über Nacht im Eisschrank stehen und darf, um eine klare Lösung zu erhalten, nicht geschüttelt werden. Zur Feststellung, ob die für die Untersuchung nötige Menge Eiweiß in Lösung gegangen ist, sind etwa 2 ccm der Ausziehungsflüssigkeit in ein sterilisiertes Reagenzglas zu gießen und tüchtig durchzuschütteln. Entwickelt sich dabei ein feinblasiger Schaum, der längere Zeit stehen bleibt, so ist der Auszug verwendbar. Die zu untersuchende Eiweißlösung muß für die Ausführung der biologischen Untersuchung wie alle übrigen zur Verwendung kommenden Flüssigkeiten vollständig klar sein. Zu diesem Zwecke muß der Fleischauszug filtriert werden, und zwar entweder durch gehärtete Papierfilter, oder, wenn ein klares Filtrat nicht erzielt wird, durch ausgeglühte Kieselgur auf Büchnerschen Trichtern oder auch durch Berkefeldsche Kieselgurkerzen. Das Filtrat ist für die weitere Prüfung geeignet, wenn es wie der unfiltrierte Auszug beim Schütteln schäumt und außerdem eine Probe (etwa 1 ccm) beim Kochen nach Zusatz eines Tropfens Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1,153 (= 25 %) eine opaleszierende Eiweißtrübung gibt, die sich nach etwa fünf Minuten langem Stehen als eben noch erkennbarer flockiger Niederschlag zu Boden senkt. Dann besitzt das Filtrat die für die biologische Prüfung zweckmäßigste Konzentration (etwa 1 : 300). Ist das Filtrat zu konzentriert, so muß es solange mit sterilisierter Kochsalzlösung verdünnt werden,

*) Uhlenhuth, Weidanz nnd Wedemann, Technik und Methodik des biolologischen Verfahrens zum Nachweis von Pferdefleisch. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. XXVIII, Heft 3.

bis die Salpetersäurekochprobe den richtigen Grad der Verdünnung anzeigt. Ferner soll das Filtrat neutral, schwach sauer oder schwach alkalisch reagieren.

Von der filtrierten, neutral, schwach sauer oder schwach alkalischen, völlig klaren Lösung wird mit ausgekochter oder anderweitig durch Hitze sterilisierter Pipette je 1 ccm in zwei Reagenzröhrchen von je 10 cm Länge und 0,9 cm Durchmesser (Röhrchen 1 und 2) gebracht. In ein Röhrchen 3 wird 1 ccm eines ebenfalls klaren, neutral oder alkalisch reagierenden, aus Pferdefleisch in gleicher Weise hergestellten Filtrats eingefüllt. Weitere Röhrchen 4 und 5 werden mit je 1 ccm einer ebenso hergestellten Schweine- und Rindfleischlösung beschickt. In ein Röhrchen 6 wird 1 ccm sterilisierter 0,85 $^0/_0$ iger Kochsalzlösung gegossen. Die Röhrchen werden in ein kleines, passendes Reagenzgestell eingehängt. Sie müssen vor dem Gebrauch ausgekocht oder anderweitig durch Hitze sterilisiert und vollkommen sauber sein. Zum Einfüllen der verschiedenen Lösungen in die einzelnen Röhrchen sind je besondere sterilisierte Pipetten zu benutzen. Zu den, wie angegeben, beschickten Röhrchen wird, mit Ausnahme von Röhrchen 2, je 0,1 ccm vollständig klares, von Kaninchen gewonnenes, Pferdeeiweiß ausfällendes Serum von bestimmtem Titer so zugesetzt, daß es an der Wand des Röhrchens herabfließt und sich auf seinem Boden ansammelt. Zu Röhrchen 2 wird 0,1 ccm normales ebenfalls völlig klares Kaninchenserum in gleicher Weise gegeben. Die Röhrchen sind bei Zimmertemperatur aufzubewahren und dürfen nach dem Serumzusatz nicht geschüttelt werden.

Beurteilung der Ergebnisse. Tritt in Röhrchen 1 ebenso wie in Röhrchen 3 nach etwa fünf Minuten eine hauchartige, in der Regel am Boden des Röhrchens beginnende Trübung auf, die sich innerhalb weiterer fünf Minuten in eine wolkige umwandelt und nach spätestens 30 Minuten als Bodensatz absetzt, während die Lösungen in den übrigen Röhrchen völlig klar bleiben, so handelt es sich um Pferdefleisch (oder anderes Einhuferfleisch). Später entstehende Trübungen dürfen als positive Reaktion nicht aufgefaßt werden. Zur besseren Feststellung der zuerst eintretenden Trübung können die Röhrchen bei auffallendem Tages- oder künstlichem Lichte betrachtet werden, indem hinter das belichtete Reagenzglas eine schwarze Fläche (z. B. schwarzes Papier oder dergleichen) geschoben wird.

Das ausfällende Serum muß einen Titer von 1:20000 haben, d. h. es muß noch in der Verdünnung 1:20000 in einer Lösung von Pferdeblutserum binnen 5 Minuten eine beginnende Trübung herbeiführen*). Getrübtes oder auch nur opalisierendes Serum ist nicht zu verwenden. Serum, das durch den Transport trübe geworden ist, darf nur gebraucht werden, wenn es sich in den oberen Schichten binnen 12 Stunden vollkommen klärt, so daß die trübenden Bestandteile entfernt werden können. Zur Untersuchung soll stets nur der Inhalt eines Röhrchens, nicht dagegen eine Mischung mehrerer Röhrchen verwendet werden.“

Es sei noch erwähnt, daß unter das Verbot der Einfuhr von zubereitetem Pferdefleisch auch die Einfuhr von Pferdedärmen und angetrocknetem Pferdeblut fällt. Auch in diesen Fällen läßt sich das biologische Verfahren, wie das die Untersuchungen von Weidanz und Borchmann beweisen, ausgezeichnet verwenden.

---

*) Derartiges Serum ist bis auf weiteres vom Kaiserlichen Gesundheitsamte erhältlich. Das Serum wird in Röhrchen von 1 ccm Inhalt versandt.

Noch wichtiger wie für die Fleischbeschau ist die biologische Methode für die

Nahrungsmittelprüfung,

wenn es sich z. B. um Untersuchung von Fleischgemischen (Wurst, Hackfleisch usw.) handelt, denn hier ist sie die einzige Methode, die Aussicht auf Erfolg verspricht; die chemischen Methoden lassen uns hier vollständig im Stich.

Für den Sachverständigen ist es nun wichtig zu wissen, welche Fleischsorten gewöhnlich zur Verfälschung verwandt und in welcher Form sie in den Handel gebracht werden.

Fast in allen Fällen wird es sich auch hier wieder um den Nachweis von Pferdefleisch handeln und nur gelegentlich wird auch einmal Hunde-, Katzen-, Hirsch-, Reh-, Renntierfleisch usw. in Frage kommen. Diese Fleischarten werden dann, um die Erkennung von Verfälschungen zu verhindern, gewöhnlich mit anderen Fleischsorten gemischt und zu Wurst verarbeitet oder auch als Hackfleisch verkauft. Für den Untersuchenden ist es nun von gewissem Interesse zu wissen, welche Wurst nach ihrer makroskopischen Beschaffenheit und welche Wurstsorten und sonstigen Fleischwaren im allgemeinen am meisten der Verfälschung mit Pferdefleisch verdächtig sind.

Nach Borchmann kommen hierfür folgende Merkmale in Betracht: Einmal die dunkelbraunrote oder karminrote Farbe und ferner der süßliche Geschmack. Außerdem ist nach diesem Autor die Schnittfläche der mit Pferdefleisch versetzten Würste mattglänzender, stumpfer als bei den nur aus Rind- und Schweinefleisch hergestellten Würsten und die Bruchfläche enthält sehr viele trockene, dünne, zähe, daher beim Durchbrechen der Wurst sich langausziehende Fleischfasern. Verdächtig erscheinen nach seinen Untersuchungen auch die Würste, bei denen die Verarbeitung des verwendeten Fleisches feiner ist, als sie gewöhnlich bei der betreffenden Wurstsorte üblich ist. Verdächtig sollen auch die Würste sein, die bei oberflächlicher Betrachtung regelrecht verarbeitet erscheinen, bei genauerer Prüfung aber zwischen grob verarbeitetem Fleisch auffällig fein verarbeitetes Fleisch erkennen lassen, das in Gestalt von braunroten Pünktchen wahrnehmbar ist. Im allgemeinen verdächtig auf Pferdefleischzusatz ist weiterhin jede Wurst, bei der die gute Verarbeitung in keinem Verhältnis zu dem geringen Preise steht. Von den aufgezählten Merkmalen ist am wenigsten auf den braunroten Farbenton und auf den süßlichen Geschmack zu geben; denn bezüglich der Farbe sei erwähnt, daß es Pferdewürste gibt, die durch gleichzeitige Verfälschung mit fötalem und unreifem Kalbfleisch einen helleren Ton angenommen haben können, und daß andererseits Würste, zu deren Herstellung das Fleisch von Bullen oder von alten „trockenen Kühen" verwandt wurde, gleichfalls den für Pferdefleischzusatz charakteristischen braunroten Farbenton aufweisen. Was den süßlichen, auf dem Gehalt an Glykogen oder Traubenzucker beruhenden Geschmack des Pferdefleisches betrifft, so sei bemerkt, daß z. B. in Berlin vielfach ein Zusatz von Rohrzucker zur Wurstmasse üblich ist (Ostertag).

Ist aus diesen Gründen auf den makroskopischen Befund der Wurst kein allzu großes Gewicht zu legen, so leistet er doch bei der Auswahl des Untersuchungsmaterials wertvolle Dienste.

Das Material zur biologischen Untersuchung wird zweckmäßig aus der Mitte der dicksten Stelle der Wurst genommen, da hier am wenigsten eine durch Kochen oder Räuchern hervorgerufene Eiweißschädigung zu befürchten ist.

Da die zu untersuchende Wurst bisweilen nur verhältnismäßig wenig Pferdefleisch enthält und dieses auch nicht immer gleichmäßig durchgemischt zu sein braucht, so ist es notwendig, möglichst große Mengen (etwa 50 g) auszulaugen.

Das aus der Mitte der Wurst zu entnehmende Material wird dabei mit einem sterilen Messer möglichst fettfrei isoliert; gröbere Fleischteilchen werden mit einer kleinen Schere so fein wie möglich zerschnitten. Bei reichlichem Fettgehalte der Wurst empfehlen Miessner und Herbst das Fett vor Ansetzen der Testflüssigkeit erst 24 Stunden mit Äther sulfuricus oder mit Chloroform zu extrahieren. Die mit Äther behandelten Wurstsorten verdienen nach ihren Angaben vor den mit Chloroform extrahierten den Vorzug. Auch sollen die mit Äther behandelten Testflüssigkeiten noch nach monatelangem Stehen vollkommen klar bleiben und noch für die Reaktion geeignet sein.

Fig. 11. Schüttelapparat nach Uhlenhuth.

Die Auslaugungsfähigkeit der einzelnen Wurstsorten ist ganz verschieden. Bei magerer Wurst, die durch Räuchern oder Kochen wenig gelitten hat, kann man bereits nach 20 Minuten die nötige Eiweißlösung erhalten, während andererseits gekochte Würstchen oftmals zwei Tage auslaugen müssen. In diesen Fällen, ebenso bei halbgar gebratenem

Fleisch, sogenannten englischem Beefsteak, empfiehlt es sich nach Abgießen des Auszuges die Fleischstücke durch ein mit 0,85 %iger Kochsalzlösung angefeuchtetes Koliertuch auszupressen und den so erhaltenen Preßsaft mit der vorher abgegossenen Flüssigkeit zu mischen. Um eine möglichst ergiebige Auslaugung zu erzielen, verfahren wir auch in der Weise, daß wir die Wurstmasse in einem Porzellanmörser zusammen mit Glasstaub möglichst fein verreiben, sodann mit etwa dem gleichen Quantum 0,85 %iger Kochsalzlösung übergießen und zur besseren Auslaugung etwa 1 Stunde in dem UHLENHUTHschen Schüttelapparat (Fig. 11) schütteln. Der Apparat, der in einfacher Weise an jede Wasserleitung angebracht werden kann, ermöglicht es, Gemische bei verschiedenen Temperaturen zu schütteln. Ein solches Schütteln behufs besserer Auslaugung des Fleisches ist jedoch nur im Notfalle auszuführen (siehe pag. 780). Die Wurstlösungen werden darauf etwa zwei Tage lang im Eisschrank aufbewahrt, sodann zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird dann vorsichtig vom Bodensatz abgegossen. Die Herstellung eines klaren Filtrats sowie einer Verdünnung von 1:300 wird auch hier in der oben angegebenen Weise ausgeführt.

Die Hauptbedingung für die biologische Untersuchung auf Pferdefleisch in der Wurst ist ein hochwertiges Antiserum, denn man hat wohl zu berücksichtigen, daß die Eiweißverdünnung von 1:300 von den verschiedenen in der Wurst enthaltenen Eiweißstoffen herrührt und daher keine reine Pferdeeiweißlösung darstellt. Bestand z. B. die zu untersuchende Wurst aus drei Teilen Rindfleisch und einem Teil Pferdefleisch, so würde, aber auch nur unter der Voraussetzung, daß sich die beiden Eiweißstoffe gleich gut gelöst hätten, eine Eiweißlösung von 1:300 nur einer Pferdeeiweißlösung von 1:1200 entsprechen. Ein spezifisches Antiserum, das den UHLENHUTHschen Anforderungen entspricht, d. h. das noch in Verdünnungen von 1:20000 wirksam ist, wird für die Praxis in allen Fällen ausreichen, da hier ein Zusatz von Pferdefleisch unter 10 % kaum vorkommt. Selbst bei 5 % Pferdefleischzusatz haben wir den biologischen Nachweis ohne Schwierigkeiten erbringen können.

Da wir nun bei der Untersuchungslösung absolut keinen Anhalt haben, wieviel Pferdefleischeiweiß darin gelöst ist, so läßt sich hier über das Einsetzen, Stärke und Dauer der Reaktion keine bestimmte Zeitangabe machen. Es können noch nach 10 Minuten spezifische Trübungen auftreten.

Bei faulenden Würsten ist es angebracht, die Filtration mit bakteriendichten Filtern vorzunehmen. Außerdem würde es sich empfehlen, zur weiteren Kontrolle ein Röhrchen mit reiner Wurstlösung ohne Zusatz von Serum anzusetzen, um eventuell eine spontan in der Wurstlösung auftretende Trübung, die eine positive Reaktion vortäuschen könnte, zu erkennen. Auch ist es ratsam, bei der Wurstuntersuchung eine Kontrolle mit nicht Pferdefleisch enthaltender Wurst anzusetzen.

In der angegebenen Weise haben wir über 250 verschiedene Würste untersucht und dabei die Brauchbarkeit und Zuverlässigkeit des biologischen Verfahrens immer wieder bestätigen können. Das Verfahren, wie wir es vorschreiben, wird zurzeit auch von den Polizeitierärzten bei der Marktkontrolle offiziell angewandt.

Zum Schluß sei noch kurz die praktische Anwendung der Komplementbindungsmethode für die Wurstuntersuchung besprochen.

SACHS und BAUER, die neuerdings vergleichende Untersuchungen mit der Präzipitinmethode und der Komplementbindungsmethode zur

50*

Differenzierung des Eiweißes in Gemischen verschiedener Eiweißarten angestellt haben, kamen zu dem Ergebnis, daß der Nachweis von Eiweißbeimengungen in Lösungen einer anderen Eiweißart mittels Präzipitation auf große Schwierigkeiten stoßen, ja, überhaupt unmöglich sein könne, daß dagegen das Komplementablenkungsverfahren auch in diesen Fällen erfolgreich zum Ziele führe. Die Autoren empfehlen auf Grund dieser Vorzüge die praktische Anwendung der Methode für die Fälle, in denen es sich für die Differenzierung von weniger konzentriertem Eiweiß in Gemischen verschiedener Eiweißarten handelt.

Es sei hier aber betont, daß die Autoren mit künstlich hergestellten Serummischungen gearbeitet haben, nicht aber unter den ernsten Verhältnissen der Praxis.

Unsere umfangreichen Untersuchungen haben uns gezeigt, daß bei einer Verdünnung der Untersuchungslösung von etwa 1:300 heterologe Trübungen nicht vorkommen, und daß wir mit Hilfe eines hochwertigen (Titer 1 : 20000) spezifischen Antiserums bequem noch 5% Pferdefleischzusatz in der Wurst nachweisen können, Mengen, die für die Praxis gar nicht mehr in Frage kommen, da bei einer Verfälschung stets mehr Pferdefleisch zugesetzt wird.

Man kommt also mit der Präzipitinreaktion in der Praxis fast immer zum Ziel und kann deshalb auch schon aus diesem Grunde auf die Komplementablenkungsmethode für die Praxis verzichten.

Außer den bereits oben ausführlich besprochenen Nachteilen und Schwierigkeiten der Methode kommen hier noch neue hinzu, die durch die der Wurst zugefügten Gewürze bedingt werden. Wir haben in Gemeinschaft mit Borchmann etwa 40 bei der Wurstfabrikation eventuell zur Verwendung kommende Gewürze und Konservierungsmittel mit der Komplementablenkungsmethode geprüft und dabei gefunden, daß ein erheblicher Teil derselben eine Ablenkung resp. Hemmung hervorruft.

So zeigten Extrakte folgender Substanzen eine Ablenkung oder starke Hemmung: Nelke, Koriander, Thymian, Salpeter, Pökelsalz, sog. „Gewürz", Fenchel, Knoblauch, Zwiebel, Semmel, Holzessig, Formalin, Präservesalz, Benzoësäure, Natriumsulfit, Salizylsäure u. a.

Wir möchten daher aus diesen Gründen für die Praxis zunächst die sehr einfache Präzipitinmethode empfehlen, zumal da man mit ihr, wenigstens was die Untersuchung von Wurst auf Pferdefleisch betrifft, vollständig auskommt. Dasselbe gilt natürlich noch in erhöhtem Maße für die Fleischbeschau. Bei gekochten Würsten wird dagegen die Komplementbindungsmethode wegen ihrer großen Empfindlichkeit in vielen Fällen gute Dienste leisten (Wassermann).

Will man die Methode anwenden, so gilt hier dasselbe, was bei der Blutdifferenzierung ausführlich erörtert ist.

Was nun die quantitative biologische Eiweißbestimmung, die von Schulz auch für die Nahrungsmittelkontrolle empfohlen ist, betrifft, so hat sie für die Praxis wenig Bedeutung, da sie einmal nur unter außerordentlich günstigen Bedingungen wirksam sein kann, und da zweitens der Begriff der Verfälschung ganz unabhängig von der Menge des verbotenen Fleisches ist. Soll eine quantitative Methode einwandsfrei sein, so müssen zwei Vorbedingungen erfüllt sein:

1. in der zu untersuchenden Fleischeiweißlösung müssen sämtliche löslichen Eiweißkörper der einzelnen Fleischsorten auch wirklich gelöst sein;

2. in gleich großen Stücken einer Fleischsorte — gleichgültig, ob fett oder mager — müssen gleich große Mengen löslicher Eiweißkörper vorhanden sein.

Diese Vorbedingungen werden erfüllt bei Blutgemischen, falls nicht die einzelnen Blutsorten vor der Mischung Verluste ihrer löslichen Eiweißkörper erlitten haben; auch bei Fleischgemischen, die von gleich frischem und gleich magerem Fleisch hergestellt sind, würden diese Voraussetzungen annähernd zutreffen, wie das die SCHULZschen Laboratoriumsversuche bestätigt haben.

Ganz anders verhält sich dagegen eine quantitative Bestimmung in der Praxis, wo absolut kein Anhalt gegeben ist, ob zur Mischung fettes oder mageres Fleisch benutzt wurde, oder ob bei den einzelnen Fleischsorten vor der Mischung — sei es durch Fäulnis oder leichtes Kochen, Räuchern usw. — Zerstörungen der löslichen Eiweißkörper eingetreten waren.

Eine weitere allerdings weit weniger wichtige praktische Anwendung des biologischen Verfahrens dürfte in Frage kommen bei der Untersuchung von Nährpräparaten, bei denen der Verdacht auf Pferdefleisch- oder Pferdeblutzusatz vorliegt. Daß man mit der biologischen Methode bei derartigen Präparaten, vorausgesetzt, daß sich mittels 0,85 $^0/_0$iger Kochsalzlösung die für die Reaktion erforderlichen Eiweißstoffe extrahieren lassen, wohl zum Ziele kommen kann, haben diesbezügliche Versuche gezeigt. So konnten wir den Nachweis führen, daß das im Handel erhältliche Hämatogen (HOMMEL) und Hämoglobin Rindereiweiß enthält. Wie bereits oben erwähnt, konnten wir in Übereinstimmung mit HORIUCHI und GRUBER sowie SCHMIDT feststellen, daß in dem Fleischsaft „Puro“, der aus Preßsaft von frischem Ochsenfleisch hergestellt sein soll, kein lösliches Rindereiweiß enthalten ist, sondern daß das darin vorhandene Eiweiß aus Hühnereiweiß besteht.

Bei der Untersuchung von fetthaltigem Gewebe (Knochenmark, Butter, Margarine, Schmalz) wird die betr. fetthaltige Substanz bei 37 °C verflüssigt evtl. nach Zusatz von Äther oder Chloroform ausgeschüttelt und klar filtriert. Die so erhaltene Eiweißlösung wird dann in bekannter Weise untersucht (UHLENHUTH, BEUMER, WEIDANZ, SCHÜTZE, HÜNE).

Technik und Methodik der Serumgewinnung.

Da die Herstellung hochwirksamer präzipitierender Sera nach der übereinstimmenden Ansicht der meisten Autoren erhebliche Schwierigkeiten bereitet, die zum großen Teil technischer Natur sind, so soll im folgenden eine genaue, alle Einzelheiten berücksichtigende Beschreibung der Serumgewinung gegeben werden.

1. Auswahl der serumliefernden Tiere.

Es ist bereits erwähnt, daß für die Gewinnung spezifischen Serums fast ausschließlich das Kaninchen in Betracht kommt. Bei der Kleinheit des Tieres ist die zu gewinnende Serummenge eine relativ geringe; doch hat dieses Tier andererseits den Vorteil, daß es zur Vorbehandlung geringerer Blutmengen bedarf wie größere Tiere, was bei der immerhin schwierigen Beschaffung von Menschenblut ins Gewicht fällt. Die Versuche, Pferde, Esel, Ziegen und Schafe für die Gewinnung von Antiserum zu benutzen, führten bisher zu keinem befriedigenden Resultat; so konnte Uhlenhuth weder von einem Hammel noch einer Ziege, denen er während zweier Monate im ganzen $1^1/_2$—2 Liter menschliches Blut, bzw. Aszitesflüssigkeit injizierte, ein für forensische Zwecke brauchbares Antiserum gewinnen. Offenbar ist die Fähigkeit, Präzipitine zu liefern, nur bei wenigen Tierarten eine so prägnante, wie das für die Bildung anderer Antikörper (Agglutinine, Bakteriolysine usw.) der Fall ist. Das Kaninchen, und zwar die langohrige Art, scheint das geeignetste Tier für die Gewinnung präzipitierender Sera zu sein, doch spielt die Individualität des Tieres eine sehr große Rolle, so daß man immer 5—6 Tiere für die Serumgewinnung einstellen muß. Ein kräftiges, großes Kaninchen liefert etwa 40,0 bis 60,0 ccm Serum. In Anbetracht der geringen Menge Antiserum, die man für die Ausführung der Reaktion braucht, ist das ein ganz erhebliches Quantum, mit dem man zahlreiche biologische Untersuchungen erledigen kann. Auch verschiedene andere Gründe sprechen noch für die Verwendung des Kaninchens, so beispielsweise der Kostenpunkt, der bei der größeren Anzahl von Versuchstieren, die man aus eben erörtertem Grunde zur Serumgewinnung stets braucht, Berücksichtigung verdient. Außer dem Kaninchen sind auch Hühner (Uhlenhuth) zur Produktion präzipitierender Sera geeignet, während die Kaltblüter nach den Untersuchungen von v. Dungern u. a. überhaupt keine Präzipitine liefern. Meerschweinchen geben selbst nach langdauernder Vorbehandlung präzipitierende Sera von nur schwacher Wirksamkeit (Uhlenhuth).

Im allgemeinen gilt die Regel zwecks Gewinnung präzipitierender Sera, möglichst artfremdes Eiweiß dem zur Vorbehandlung in Frage kommenden Tiere zu injizieren, z. B. um ein Taubeneiweiß präzipitierendes Serum zu gewinnen, empfiehlt es sich, Taubeneiweiß Kaninchen zu injizieren, nicht aber Taubeneiweiß aufs Huhn zu übertragen, da bei der nahen Verwandtschaft dieser beiden Eiweißarten das Taubeneiweiß im Huhn keine bindende Gegengruppe findet (Bordet und Nolf). Daß es von dieser Regel aber Ausnahmen gibt, zeigten die oben erwähnten Untersuchungen Uhlenhuths, dem es gelang, durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Hasenblut und von Affen mit Menschen-

blut präzipitierende Sera herzustellen. Da die Fähigkeit, Immunserum zu liefern, von einer geimpften trächtigen Mutter auf die Jungen übergeht (zeigt doch auch ihr Serum Präzipitingehalt, wenn auch schwächeren als das der Mutter), so macht Leers den Vorschlag, die herangewachsenen, zur Antikörperbildung disponierten Jungen ebenfalls, mit demselben Serum, wie die Mutter, zu impfen und späterhin belegen zu lassen, um auf diese Weise ein gut reagierendes Geschlecht heranzuziehen.

2. Auswahl des Injektionsmateriales.

Was das Injektionsmaterial betrifft, so muß natürlich zur Vorbehandlung der Kaninchen dasjenige Eiweiß benutzt werden, dessen Nachweis durch die Präzipitinreaktion erbracht werden soll. Da es sich in der Praxis meistens um Blut oder Fleisch handelt, so wird man in diesen Fällen am besten Blut resp. Muskelsaft als Injektionsmaterial verwenden.

Zur Herstellung der Antisera zum forensischen Blutnachweis hat Uhlenhuth zuerst nur defibriniertes Blut als Injektionsmaterial verwandt und in Vorschlag gebracht. Von Nolf u. a. wurde dann die Tatsache festgestellt, daß die spezifisch wirkenden Präzipitine nur durch das Eiweiß des eingespritzten Serums, nicht aber der Blutkörperchen erzeugt werden. Somit glaubte man, daß die korpuskulären Elemente des Blutes völlig wertlos seien. Es ist jedoch Leblanc gelungen, durch Einspritzung von Blutkörperchen allein ein spezifisch wirkendes Antihämoglobinserum zu erzeugen. A. Klein konnte ebenso durch Vorbehandlung von Kaninchen mit gereinigten Hämoglobinlösungen Immunsera herstellen, die in den spezifischen Blutlösungen starke Niederschläge hervorriefen.

Da es sich in der forensischen Praxis fast durchweg um angetrocknete Blutflecken handelt, in denen ja sowohl Serum- wie Blutkörpercheneiweiß vorhanden ist, so wäre es begreiflicherweise am rationellsten, wenn man das ganze Blut zur Vorbehandlung der Versuchstiere benutzen würde, da in diesem sämtliche reaktionsfähigen Eiweißstoffe vorhanden sind. Die zahlreichen ad hoc angestellten Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß man durch Injektion von blutkörperchenfreiem Serum allein zum Ziele kommt.

Vom praktischen Standpunkte aus wendet man am besten reines Serum an, nur wenn ganz wenig oder schwer zu beschaffendes Blutmaterial zur Verfügung steht, ist es vorteilhaft, zur völligen Ausnutzung desselben das ganze Blut in Anwendung zu bringen.

Die Anwendung des Serums hat vor der des defibrinierten Blutes zahlreiche Vorzüge. So ist die Gewinnung einfacher, da die lästige Prozedur des Defibrinierens fortfällt, was beim menschlichen Blut, zumal wenn es langsam fließt, wegen der eintretenden Gerinnung ohne weitere Zusätze überhaupt kaum möglich ist. Die Schwierigkeit des Defibrinierens zeigt sich auch ganz besonders bei dem sehr schnell gerinnenden Vogelblut. Außerdem ist die intravenöse Einspritzung von Serum weniger gefahrvoll als die von Blut wegen der nach letzterem auftretenden Hämolysinbildung (Bordet). Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß man Serum bequem durch bakteriendichte Filter filtrieren kann. Auf diese Weise kann man es als flüssigen Vorrat für weitere Einspritzungen aufbewahren. Steril entnommen hält sich das Serum auch ohne Filtration, die absolute Klarheit

desselben bietet dann ziemlich sichere Garantie für die Sterilität. Um eine jahrelange Konservierung von schwer zu beschaffendem Injektionsmaterial zu erreichen, bedient man sich auch mit Vorteil der weiter unten angegebenen Eintrocknungsmethode.

Sollen die präzipitierenden Sera zum Nachweis von Pferdefleischeiweiß dienen, so ist es a priori am rationellsten, die Vorbehandlung der Kaninchen mit Pferdefleischsaft vorzunehmen. Einen solchen Saft erhält man am besten durch Auspressen des zerkleinerten Fleisches durch nasse Kolirtücher in einer Preßmaschine oder durch das Gefrieren des Fleisches und nachfolgendes schnelles Auftauen desselben (Gröning). Nötel empfiehlt zur Vorbehandlung der Tiere Pferdefleischextrakte, welche er in folgender Weise darstellt: Grob zerkleinerte Fleischstücke werden in einer großen Doppelschale oder auch in einem Suppenteller ausgebreitet und mit soviel 0,1 %iger Sodalösung übergossen, daß sie gerade bedeckt sind. Man läßt das Gemisch 3 Stunden bei 37° stehen, gießt die dunkelrote Flüssigkeit ab, preßt die Fleischstücke kräftig durch ein starkes, vorher mit Sodalösung durchfeuchtetes Kolirtuch und mischt den Preßsaft mit der vorher abgegossenen Flüssigkeit. Schütze erzielte ein streng spezifisches Antiserum mit Muskeleiweiß, das er auf chemischem Wege isolierte. W. A. Schmidt benutzt zur Herstellung spezifischer Sera filtrierten Fleischpreßsaft und verfährt dabei in folgender Weise: Der Preßsaft wird für jede Injektion frisch aus möglichst fettfreiem Muskelfleisch, welches 2 bis 12 Stunden alten Leichen entnommen ist, gewonnen. Das Fleisch wird darauf direkt, ohne Zerkleinerung, in einer (nicht sterilisierten) Fleischpresse ausgepreßt und dann durch ausgekochte Berkefeldsche Kerzen filtriert. Wie bereits erwähnt (s. pag. 782) vertragen die Kaninchen unfiltrierten Fleischsaft auffallend schlecht. Da die Vorbehandlung der Tiere mit Bluteiweiß viel bequemer und in allen Fällen ausreichend ist, so benutzen wir für die Herstellung der für die Fleischuntersuchung in Betracht kommenden Antisera fast ausschließlich Pferdeserum (s. oben).

3. Gewinnung des Injektionsmaterials.

Das zur Vorbehandlung der Versuchstiere dienende Menschenblut, das möglichst steril sein muß, bezieht man zweckmäßig aus den Entbindungsanstalten. Nach den Angaben von Uhlenhuth wird die Blutentnahme bei Geburten am besten in folgender Weise ausgeführt.

Sobald der Kopf des Kindes im Einschneiden ist, werden unter dem Steiß bis zum Knie der Kreißenden sterile Tücher ausgebreitet. Das Neugeborene wird auf diesen, nachdem die Hände des Geburtshelfers mit ausgekochten Gummihandschuhen versehen sind, abgenabelt und das plazentare Ende der Nabelschnur komprimiert. Nachdem der obere Rand eines großen sterilen Zylinderglases in der Flamme abgeglüht ist, wird die Nabelschnur vorsichtig hineingehängt und durch Druck auf den Uterus das in der Plazenta befindliche Blut möglichst herausgepreßt. Nachdem auch das in der Nabelschnur noch befindliche Blut ausgedrückt ist, wird das Glas mit abgesengtem Wattebausch verschlossen. Auf diese Weise gewinnt man von jeder Geburt 20—30 ccm Blut. Falls man hierbei von einer sterilen Gewinnung des Blutes absieht, kann man gleichzeitig durch den retroplazentaren Bluterguß oft noch ein beträchtliches Quantum Blut erhalten.

Das aus diesem Blut gewonnene Serum kann dann, nachdem es durch eine Berkefeldsche Kerze filtriert oder mit etwas Chloroform (Ziemke) versetzt ist, längere Zeit aufbewahrt werden.

Eine weitere sehr zweckmäßige Art der Blutgewinnung ist die mit dem Heurteloupschen Schröpfapparat, wie er bei Augenkranken in der Schläfengegend angesetzt wird; man gewinnt mit diesem Apparat etwa 15 ccm Blut.

Bei weitem am besten ist aber die Ausbeute beim Aderlaß, denn man kann hierbei bequem 200 ccm Blut erhalten.

Da es aber erfahrungsgemäß nur selten vorkommt, daß sich Gesunde Blut abziehen lassen, so wird man bei der sterilen Gewinnung von Menschenblut meist auf Geburten oder therapeutsiche Eingriffe angewiesen sein.

Auch die Verwendung von Leichenblut für die Vorbehandlung von Kaninchen kann empfohlen werden. Ziemke erzielte zuerst auf diese Weise ein hochwertiges Serum. Zur Gewinnung von Leichenblut öffnete er unter aseptischen Kautelen den Thorax, schnitt die Vorhöfe des Herzens an und schöpfte das sich in den Herzbeutel ergießende Blut steril aus.

Hauser, der ebenfalls in größerem Umfange mit gutem Erfolge Leichenblut als Injektionsmaterial verwendet, entnimmt es in folgender Weise:

Bei einer möglichst frischen Leiche präpariert er sich von dem gewöhnlichen Sektionsschnitt aus die Vena jugularis externa frei und führt in diese ein an dem einen Ende kurz abgebogenes und mit einer leichten Einschnürung versehenes Glasrohr bis in den rechten Vorhof ein. An der Stelle der Einschnürung legt er dann eine feste Ligatur um die Jugularis. Durch Heben der Extremitäten, eventuell auch der ganzen Leiche, sowie durch leichtes Pressen auf das Abdomen gelingt es dann leicht, große Mengen flüssigen Blutes auslaufen zu lassen, die er in weite, bis etwa 80 ccm haltende, sterile Glasröhren abfüllt. Auf diese Weise konnte er bisweilen von einer Leiche bis über 200 ccm Serum gewinnen, welches er unter Chloroformzusatz auf Eis aufbewahrte und so monatelang unverändert konservieren konnte. Interessant war hierbei seine Beobachtung, daß auch Serum von septischen Leichen (s. B. bei Perforationsperitonitis) völlig steril blieb und von den Kaninchen sowohl bei intraperitonealer als auch bei subkutaner Injektion reaktionslos vertragen wurde. Die mit diesem Material vorbehandelten Tiere lieferten gute brauchbare Antisera.

Eine Methode der Blutentnahme, die auch ohne Sektion der Leiche ausgeführt werden kann, ist von Oberndorffer (s. Münch. med. Wochenschr. 1905, Nr. 16) angegeben. Er entnimmt das Blut durch direkten Einstich in den rechten Vorhof des Herzens durch die vorher sterilisierte Haut. Oberndorffer ist es dabei oft gelungen, eine große Menge reines Serum zu gewinnen. Er gibt hierfür folgende Erklärung:

„Wie in einem Gefäß wird sich auch im Herzen das ruhende Blut, da die Leiche immer die Rückenlage beibehält, sedimentieren, das Serum entweder vom Blutkuchen ausgepreßt oder bei ungeronnenem Blut sich oben klärend in den oberen Partien des Vorhofs ansammeln. Gelangen wir mit unserer Kanüle direkt in diese Schicht, so gelingt es, das reine Serum abzuheben, das wir mit der Spritze sofort, also ohne weitere Vorbereitung, dem betreffenden Tiere einverleiben können, eine Prozedur, die mit dieser Methode im ganzen in wenigen Minuten ausgeführt ist, während wir bei allen anderen Blutentnahmen zuerst Serum darstellen müssen."

Zur Blutentnahme bedient sich Oberndorffer einer Injektionsnadel, die in das eine Ende eines Glasrohres eingeschmolzen ist, während das andere Ende des Glasrohres durch einen Gummischlauch mit einem Gummiballon verbunden ist, der neben dem Ansatz für den Gummischlauch noch eine zweite freie Öffnung besitzt. Das mit dem Gummischlauch verbundene Ende des Glasrohres wird mit einem Wattepfropfen versehen. Das Glasrohr mit Wattepfropfen einerseits und steriler Kanüle andererseits wird vor dem Gebrauch sterilisiert; beim Ansetzen des Schlauches an das Glas bleibt der Wattepfropfen sitzen, da er als Bakterienfilter für die durchstreifende Luft dienen soll (Fig. 12).

Fig. 12. Apparat zur sterilen Gewinnung von Leichenblut nach Oberndorffer.

Die Anwendung des Apparates geschieht in der Weise, daß man zuerst die Kanüle in den rechten Vorhof einsticht, dann den Gummiballon komprimiert, wobei die Luft durch die Öffnung des Ballons entweicht; verschließt man nun mit dem Finger diese Öffnung, so saugt der sich ausdehnende Ballon die Flüssigkeit im rechten Vorhof langsam unter geringem Druck an. Man hat hierbei jederzeit in der Hand, die Aspiration zu sistieren, indem man die obere Öffnung frei macht.

Mit Hilfe einer der angegebenen Methoden wird man wohl stets in der Lage sein, genügend Menschenblut resp. Serum zur Vorbehandlung mehrerer Kaninchen zu gewinnen.

Die beste Methode für die Gewinnung von Blut der größeren Tiere (Pferde, Rinder, Hunde, Ziegen) ist das Einstechen eines sterilen Troikarts in die Vena jugularis, nachdem diese durch einen unterhalb der Einstichstelle um den Hals gelegten Strick zur Anschwellung gebracht ist. Bei langhaarigen Tieren hat man, um das Hervortreten des komprimierten Gefäßes überhaupt wahrnehmen zu können, diesen Abschnitt des Halses zu scheren. Das Blut wird dann, nachdem man das erste hat abfließen lassen, unter Beobachtung aseptischer Kautelen in großen, etwa 600 ccm fassenden sterilisierten Glaszylindern von etwa 6 ccm Durchmesser aufgefangen.

Von Grawitz ist zur sterilen Blutentnahme an größeren Tieren ein Apparat empfohlen worden, bei dem die Injektionsnadel mittels eines Gummischlauches, der mit einer Klemme versehen ist, mit einem Meßzylinder in Verbindung steht.

Hat man genug Blut erhalten, so wird, ehe man die Kanüle aus der Vene herauszieht, der um den Hals gelegte Strick gelöst. Nach Herausziehen der Kanüle wird die etwa auftretende Blutung durch leichte Kompression mit steriler Watte gestillt.

Stehen in den Versuchsställen größere Tiere zur Blutentnahme nicht dauernd zur Verfügung, so kann man sich das zur Einspritzung nötige Blut auch aus dem Schlachthof verschaffen. Nach Betäubung der Schlachttiere läßt man sich die Haut über den großen Halsgefäßen zurückpräparieren, um eine Verunreinigung des Blutes durch Haare möglichst zu vermeiden, und fängt das aus den durchschnittenen Hals-

gefäßen ausströmende Blut in sterile Glaszylinder auf, nachdem man das erste hat abfließen lassen.

Bei Schweinen wird man durch Auffangen des nach dem Herzstich in großem Strahle ausströmenden Blutes genügend Material gewinnen können. Allerdings dürfte eine absolute Sterilität des Blutes bei Entnahme während des Schlachtens nicht garantiert werden können. Will man von Schweinen steriles Blut gewinnen, so empfiehlt es sich, einen großen Troikart, der an einem Schlauch und Flasche (sterilisiert) armiert ist, nach Desinfektion der äußeren Haut in das Herz einzustechen und das Blut direkt in die Flasche fließen zu lassen. Kleinere Blutmengen kann man vom lebenden Tier aus den Ohrvenen oder der Schwanzarterie entnehmen, nachdem man vom Schwanz nach sorgfältiger Desinfektion ein Stück abgeschnitten hat.

Die Blutentnahme ist bei kleineren Tieren, falls man sie nicht tötet, oft mit Schwierigkeiten verbunden. Bei Affen z. B. muß man sich operativ eine der großen Venen oder Arterien (jugularis, femoralis, brachialis usw.) freilegen und anschneiden.

Bei Tieren mit gut ausgebildeten Ohrvenen, wie das bei den Kaninchen der Fall ist, kann man bequem aus diesen Blutgefäßen die nötige Blutmenge gewinnen (s. unten).

Bei Hühnern, Tauben, Gänsen usw. schneidet man zweckmäßig, falls man sie nicht schlachten will, eine Flügelarterie an, nachdem man die Federn über der Arterie beseitigt und die Haut mit Alkohol und Äther gründlich gereinigt hat. In diesen Fällen wird man auf eine Sterilität des Materials verzichten müssen.

Hat man auf diese Weise das Blut gewonnen, so wird es für die Injektion vorbereitet. Zieht man vor Blut zur Einspritzung zu verwenden, so wird es durch Schütteln unmittelbar nach dem Auffangen in sterilen ERLENMEYERschen Kolben, in welche man vorher Glasperlen oder ausgeglühten Eisendraht eingebracht hat, defibriniert. Will man dieses Material längere Zeit aufbewahren, so gießt man es in gewöhnliche Reagenzgläser. Diese werden mit in 10 %ige Formollösung getauchtem Wattestopfen verschlossen, darüber wird eine Gummikappe gezogen. Die Aufbewahrung geschieht im Eisschrank oder in dem von MORGENROTH angegebenen Gefrierapparat „Frigo“ (LEERS).

Soll aber aus dem Blute Serum gewonnen werden, so fängt man das Blut vorteilhaft in Blutserumzylindern auf und läßt es, nachdem man das Gefäß gut verschlossen hat, bei gewöhnlicher Temperatur einige Stunden und dann über Nacht im Eisschrank stehen; dann wird das meist gut abgesetzte klare Serum mit einer sterilen Glaspipette abgehebert und in sterile Reagenzgläser abgefüllt. Will man das in dem Zylinder zurückbleibende Blut zur Serumgewinnung möglichst ausnutzen, so kann man den Blutkuchen, um ihn besser auszupressen, mit einem sterilen Gewicht beschweren (WASSERMANN).

Was nun die Konservierung des Injektionsmaterials betrifft, so kann man steril gewonnenes oder durch keimdichte Filter filtriertes Serum in zugeschmolzenen Reagensgläsern, dauernd aufbewahren. Zur Konservierung des Serums wird von einigen Autoren auch der Zusatz von kleinen Mengen Chloroform empfohlen. Durch leichtes Erwärmen hat man diesen Zusatz vor der Einspritzung der Tiere zur Verdunstung zu bringen. Als weiterer konservierender Zusatz ist zu erwähnen 0,5%ige Karbolsäurelösung. Dieser Zusatz schädigt das Kaninchen, wenn er mit mit dem Serum in die Blutbahn gerät, in keiner Weise.

Auch die von Uhlenhuth vorgeschlagene Eintrocknungsmethode ist empfehlenswert. Man läßt das möglichst steril entnommene Blut oder Serum in Petrischalen in dünner Schicht (1—5 mm) in der Sonne oder im Brutschrank bei 37° C eintrocknen. Das eingetrocknete Blut resp. Serum wird dann mit einem Messer abgekratzt und in Reagenzgläsern aufbewahrt (Fig. 13). Soll dieses Material zur Vorbehandlung der Tiere verwandt werden, so wird es in einem Mörser fein zerrieben und in physiologischer Kochsalzlösung bis zur Sättigung aufgelöst. Uhlenhuth hat auf diese Weise mit vier Jahre alten getrocknetem Blutmaterial hochwertige Antisera erzeugen können. Wenn auch frisches Blut und Serum im allgemeinen den Vorzug verdient, so kann man bei schwer zu beschaffendem Blut z. B. bei Wild in der Schonzeit, mit angetrocknetem Material sich behelfen. Bei stark verunreinigtem Blut empfiehlt sich auch, nach Angaben von Löffler, das angetrocknete Blut durch halbstündiges Erhitzen auf 150° keimfrei zu machen; die Fähigkeit spezifische Antikörper zu bilden, geht dabei nicht verloren.

I II

Fig. 13. I angetrocknetes Rehblut. II angetrocknetes Rehserum.

4. Art der Einspritzung des Materials.

Nachdem man das Material zur Einspritzung gesammelt und vorbereitet hat, beginnt man mit der Vorbehandlung der Tiere. Zur Injektion bedienen wir uns graduierter bis 5 ccm fassender sterilisierbarer Spritzen, die zweckmäßig zwei kleine Handhaben für den Zeige- und Mittelfinger besitzen. Um die meist in Reagenzgläschen aufbewahrte Injektionsflüssigkeit mit der Spritze bequem aufziehen zu können, empfiehlt es sich, dieselbe in kleine kurze Röhrchen, die in ein kleines Glas (Schnapsglas) gestellt werden, umzugießen (Fig. 14).

Fig. 14.

Ob man die Injektion intraperitoneal, subkutan oder intravenös ausführt, ist abhängig von dem zur Verwendung kommenden Material. Im allgemeinen ist die intravenöse und intraperitoneale Methode der subkutanen vorzuziehen, da das Blut des Kaninchens bzw. sein Serum in der injizierten Eiweißlösung etwa vorhandene Bakterien am ehesten unschädlich zu machen imstande ist, und auch das Bauchfell relativ unempfindlich gegen Infektionserreger ist. Im Gegensatz hierzu verfügt das Unterhautgewebe über natürliche Schutzkräfte in ähnlichem Umfange nicht, so daß sich die subkutane Injektion einer Eiweißlösung nur dann empfiehlt, wenn diese steril ist. Bei Vorbehandlung der Tiere mit reinem Serum bedient man sich am besten der intravenösen Methode, die im allgemeinen auch als wirksamste angesehen werden muß; bei Verwendung von defibriniertem oder angetrocknetem Blute als Injektionsmaterial würde der intraperitoneale Weg vorzuziehen sein.

Was die Dosierung des Injektionsmaterials anlangt, so haben fast alle Autoren anfangs viel zu hohe Dosen, im ganzen — 50—80 ccm,

angewandt. Biondi, Nuttall, Strube und Uhlenhuth fanden, daß schon geringe Serummengen zur Erzeugung von Antiseris genügten. Nuttall gelang es mit im ganzen 18 ccm Serum brauchbare Antisera zu erzielen. Wir selbst erhielten nach dreimaliger Injektion von je 1 ccm, zusammen 3 ccm, wirksame Antisera mit einem Titer von 1:20000.

Was nun den Modus und die Häufigkeit der Injektionen anbelangt, so hat es sich als das zweckmäßigste herausgestellt, alle 5 bis 6 Tage intravenös 1—3 ccm Serum zu injizieren. Behandelt man in dieser Weise mehrere Tiere vor, so liefern einzelne bisweilen schon nach der dritten Injektion hochwertige Antisera, während sich bei andern selbst nach zahlreichen Injektionen überhaupt keine Präzipitine in ihrem Serum nachweisen lassen. Die Individualität des Tieres scheint für die Präzipitinbildung von ausschlaggebender Bedeutung zu sein. Die Tatsache, daß Tiere, die nach den ersten drei Injektionen bereits ein brauchbares Serum lieferten, durch weitere Behandlung bisweilen einen totalen Rückgang und völligen Schwund ihrer Präzipitine zeigten, führt Uhlenhuth auf ein Erlahmen des Rezeptorenapparats zurück. Setzt man bei solchen Kaninchen die Einspritzungen mehrere Wochen aus, so kommt es nicht selten vor, daß die Tiere bereits nach der ersten wieder aufgenommenen Injektion ein brauchbares Antiserum liefern. Jedoch ist das nicht konstant. Man tut daher gut, die Tiere, sobald sie ein brauchbares Serum liefern, sofort zu schlachten.

Die intraperitoneale Impfung wird nach Uhlenhuth in folgender Weise vorgenommen: Ein Gehilfe umfaßt mit seiner rechten Hand die beiden Hinterbeine des Kaninchens, hält dieselben nach oben, während die linke Hand beide Vorderbeine umfaßt und sie nach abwärts hält, sodaß der Kopf des Tieres senkrecht nach unten hängt. Auf diese Weise wird erreicht, daß die Gedärme möglichst in die obere Hälfte der Bauchhöhle hineinfallen. Die Bauchhöhle des senkrecht gehaltenen Tieres wird demjenigen, der die Injektion ausführt, zugewandt. Dieser wählt als Stelle der Einspritzung die Unterbauchgegend, entfernt dort vermittels einer Schere die Haare und schneidet mit steriler Schere die zur Falte erhobene Oberhaut durch, sodaß an einer etwa erbsengroßen Stelle die Muskulatur freiliegt. Mit einer stumpfen Kanüle wird nunmehr die Bauchwand vorsichtig durchstoßen, dann die Spritze aufgesetzt und die Injektionsmasse eingespritzt. Nach dem Herausziehen der Nadel wird die kleine Wunde mit Kollodiumwattebausch verschlossen (Fig. 15). Nuttall, der dieselbe Technik anwendet, rasiert und desinfiziert zur größeren Vorsicht vorher die Impfstelle noch mit Lysol.

Fig. 15. Intraperitoneale Impfung von Kaninchen nach Uhlenhuth.

Miessner und Herbst führen die intraperitoneale Impfung bei Rückenlage der Kaninchen aus. W. A. Schmidt verfährt in der Weise, daß er die Bauchdecke des Kaninchens faltenartig vorzieht und sich dann durch Palpation vergewissert, daß sich im Innern der Bauchdeckenfalte keine Darmschlingen befinden. Ist das der Fall, so durchsticht er mit einer spitzen Kanüle die ganze Bauchdeckenfalte, sodaß die Kanülenspitze an der anderen Seite wieder sichtbar wird. Nunmehr zieht er die Kanüle vorsichtig zurück, bis sich die Spitze in der Bauchhöhle befindet.

In Notfällen kann auch die intraperitoneale Impfung ohne jede Assistenz ausgeführt werden. Man umfaßt mit der linken Hand die beiden Hinterschenkel des Kaninchens, während man mit seinen Oberschenkeln den so nach unten gerichteten Kopf und Brust des Tieres fixiert. Die freigebliebene rechte Hand des Operateurs führt dann die Injektion aus.

Ist die Injektion richtig ausgeführt, so überstehen die Kaninchen die Operation in der Regel gut, zeigen wohl einen Tag geringe Freßlust, werden dann aber bald wieder vollkommen munter.

Die Technik der intravenösen Impfung ist folgende:

Fig. 16. Intravenöse Impfung.

Der Gehilfe, der sich auf einen Stuhl setzt, nimmt das Kaninchen auf den Schoß und umwickelt Kopf, Leib, Vorder- und Hinterbeine so, daß nur das Ohr heraussieht. Dieses wird mit Alkohol-Sublimatlösung desinfiziert. Durch Kompression der Ohrvene an der Ohrwurzel eventuell noch durch Betupfen mit einem in Xylol getränkten Wattebausch schwillt das Blutgefäß zu einem deutlichen Strang an und man kann jetzt mit Leichtigkeit die Kanüle der Injektionspritze in sie hineinbringen. Die Tiere werden zuweilen unruhig, sobald man anfängt, den Stempel der Spritze vorzuschieben; es kommt deshalb viel darauf an, wie sie von dem Gehilfen gehalten werden. In jedem Falle tut man gut, die Einspritzung möglichst nahe dem Ohrende zu machen, weil man dann möglichst unabhängig von plötzlichen Bewegungen der Tiere bleibt und auch für weitere Injektionen genügend freies Feld übrig läßt. Nach Herausziehen der Kanüle genügt in den meisten Fällen ein kurzdauerndes Kneifen mit dem Fingernagel oder eine Klemme, um die Blutung aus der Einstichstelle zum Stehen zu bringen. Ist in seltenen Fällen die Nachblutung erheblich, so muß das Gefäß umstochen werden.

Die Tiere können auch von dem Gehilfen, nachdem sie auf den Tisch gesetzt sind, in der aus beistehender Figur 16 ersichtlichen Weise gehalten werden.

Ist man gezwungen ohne Diener ein Kaninchen intravenös zu injizieren, so eignet sich hierzu der Apparat nach MALASSEZ (Fig. 17).

Während nach der intraperitonealen Injektion, abgesehen von der geringen Freßlust, Krankheitserscheinungen meistens fehlen, sieht man unmittelbar nach der intravenösen Einspritzung häufig Zeichen, die auf ein mehr oder minder schweres Kranksein hindeuten. Am häufigsten sind schwere Dyspnoe, lähmungsartige Schwäche, Durchfälle und unwillkürliches Entleeren von Urin zu beobachten. Unter diesen Erscheinungen können je nach der Herkunft des Serums die Tiere sofort oder nach mehreren Stunden verenden. Im wesentlichen hängt dieses Krankheitsbild bzw. der Tod von der hämolytischen bzw. toxischen Wirkung des fremden Blutserums ab. In dieser Beziehung ist am wenigsten gefährlich Pferde- und Eselserum (UHLENHUTH).

Soll ausnahmsweise die subkutane Impfung vorgenommen werden, so verfährt man am besten so, daß man das sterile Material in eine Bauchhautfalte injiziert und dann, um eine gleichmäßige Verteilung des Injektionsmaterials zu erzielen, die entstehenden Beulen verstreicht. Die nach mehrfachen subkutanen Einspritzungen auch von sterilen Serum oft auftretenden Infiltrate und oberflächlichen Nekrosen, sind eine Folge des eingespritzten heterologen Bluteiweisses (UHLENHUTH) und lassen sich vermeiden, wenn man das Serum verdünnt. Nach LOELE empfiehlt es sich vor jeder erneuten Injektion das Tier abzutasten, ob sich irgendwo derbere Infiltrate oder Krusten finden und wenn diese vorhanden sind, erst nach Verschwinden derselben die nächste Injektion vorzunehmen. Es sei hier noch kurz darauf hingewiesen, daß ähnlich wie die Meerschweinchen, auch die Kaninchen nach Einspritzungen von Serum überempfindlich werden können.

Fig. 17. Apparat zur intravenösen Injektion ohne Assistenz.

5. Unterbringung und Beobachtung der Versuchstiere.

Um Verwechslungen zu vermeiden müssen die einzelnen Tiere genau bezeichnet werden. UHLENHUTH schert den Kaninchen Buchstaben auf den Rücken ein, und zwar der Übersichtlichkeit halber den Anfangsbuchstaben der Art des eingespritzten Materials. Die Buchstaben müssen von Zeit zu Zeit nachgeschoren werden. NUTTALL empfiehlt mit chinesischer Tusche die zarte weiße Innenfläche der Kaninchenohren

zu tätowieren. Von anderen Autoren werden nummerierte Ohrmarken vorgeschlagen, da diese aber leicht herausfallen können, so ist Vorsicht geboten. Die genau gekennzeichneten Tiere werden wenn möglich in einzelnen Käfigen untergebracht. Zu diesem Zwecke sind Käfige aus Eisendraht und Blech zu empfehlen, weil sie im ganzen im Desinfektionsapparat sterilisiert werden können. Für diese Käfige (Fig. 18) gibt es passende Gestelle aus Eisenrahmen, sodaß ganze Reihen übereinander gestellt

Fig. 18. Kaninchenkäfig (sterilisierbar).

werden können und daher verhältnismäßig wenig Platz beanspruchen. Der als Schublade herausnehmbare Boden des Käfigs wird mit Torfmull oder Sägespänen belegt, um den Urin aufzusaugen. Das Futter- und Wassergefäß kann entweder an den Seiten oder an der Innenseite der vorderen Schubladenwand angebracht werden.

Um eine genaue Beurteilung des Körperzustandes der im Versuch befindlichen Kaninchen zu ermöglichen, ist es empfehlenswert, wenn auch nicht notwendig, sie regelmäßig zu wiegen. Zu diesem Zwecke bedienen wir uns der Wage nach Duenschmann (Fig. 19). Gewöhnlich haben wir bei großen und kräftigen Tieren höchstens nach der ersten Injektion eine geringe Gewichtsabnahme konstatieren können; die Tiere erholten sich aber sehr schnell wieder, sodaß sie ihr ursprüngliches Gewicht bald überschritten hatten. In einzelnen Fällen konnten wir aber eine beständige Abmagerung nachweisen. Trotzdem lieferten die Tiere ein hochwertiges Serum. Aus dem Verhalten des Körpergewichts lassen sich im allgemeinen keine Schlüsse auf das Verhalten der Antikörperbildung ziehen.

6. Probeblutentnahme zwecks Serumprüfung.

Um festzustellen, wann die Kaninchen ein für die Praxis brauchbares Serum liefern, ist es notwendig, in gewissen Intervallen das Blut dieser Tiere auf seinen Präzipitingehalt zu

untersuchen. Wie bereits aus dem oben Gesagten hervorgeht, tritt dieser Zeitpunkt bei gleicher Vorbehandlung der Kaninchen, bei den einen früher, bei den anderen später oder gar nicht ein. Auf Grund umfangreicher Untersuchungen von UHLENHUTH und BEUMER hat es sich als zweckmäßig erwiesen nach der dritten Injektion eine Probeblutentnahme vorzunehmen und zwar hat diese in dem Augenblick stattzufinden, in welchem der Tierkörper auf dem Höhepunkt der Präzipitinbildung steht, d. h. am sechsten Tage nach der letzten Einspritzung. In zahlreichen Fällen haben wir bereits bei dieser ersten Prüfung ein hochwertiges Antiserum feststellen können. In anderen Fällen haben wir erst nach der fünften oder sechsten Injektion ein brauchbares Antiserum erhalten. Diese ungünstigeren Resultate sind oft auch auf zu schnell aufeinanderfolgende Injektionen größerer Eiweißmengen zurückzuführen.

Die Probeblutentnahme der Kaninchen geschieht in folgender Weise: Zur Erzeugung einer Hyperämie wird das Ohr des Kaninchens am Grunde der Ohrwurzel mit einem in heißes Wasser getauchten Wattebausch bedeckt, oder es wird das Ohr mit der Schere leicht geklopft; sehr wirksam ist das Betupfen des Ohres mittels eines mit Xylol getränkten Wattebausches. Auf diese Weise gelingt es leicht ein deutliches Hervortreten besonders der Randvenen zu bewirken. Jetzt wird das Ohr über den Finger gespannt und mit einer COOPERschen Schere ein etwa linsengroßes Stück der über einer Vene befindlichen Haut weggeschnitten. Das jetzt sehr deutlich hervortretende Gefäß wird mit einer sterilen Schere eingeschnitten, und das herausfließende Blut in einem sterilen Reagenzglas aufgefangen (Fig. 20). Hat man auf diese Weise genügend Blut erhalten, so muß man zur Vermeidung von Nachblutungen das Gefäß mit dem Fingernagel zukneifen oder durch angedrückte Watte eventuell auch mittels einer Klemme komprimieren. Hin und wieder ist die Nachblutung so erheblich, daß eine Umstechung des Gefässes notwendig ist. Sehr vorteilhaft ist es auch das Blut aus einer Ohrarterie zu entnehmen; man gewinnt dabei viel schneller das gewünschte Quantum Blut, und das so gewonnene Serum ist meist viel weniger hämoglobinhaltig. Die Blutstillung hat in solchen Fällen immer durch Umstechung zu erfolgen. KISTER und WOLFF empfehlen, den Kaninchen Blut aus der an der Innenseite des Oberschenkels oberflächlich verlaufenden Arterie zu entnehmen. Unserer Erfahrung nach ist das viel schwieriger und daher nicht emp-

Fig. 19. Kaninchenwage nach DUENSCHMANN.

fehlenswert. Für die Voruntersuchung genügen etwa 3 ccm Blut; dieses wird, um möglichst viel Serum zu erhalten, in den Reagenzröhrchen schräg gelegt, da dann das Serum besser ausgepreßt wird. Aus demselben Grunde wendet Nuttall für diese Zwecke Petrischalen an. Das abgeschiedene Serum wird dann mit einer Kapillarpipette (siehe oben) vorsichtig aufgesogen und in ein spitzes Zentrifugenröhrchen übergefüllt. Benutzt man bei der Blutgerinnung alte, durch häufiges Sterilisieren rissig gewordene Reagenzröhrchen, so haften gewöhnlich die sich bildenden Blutgerinnsel in großer Ausdehnung an der Wand fest und müssen, da sonst ein unvollkommenes Auspressen des Serums stattfindet, gelöst werden. Es geschieht das zweckmäßig mit Hilfe eines ausgeglühten gut erkalteten Platinspatels. Wird das Gerinnsel bei der Ablösung gequetscht oder ist der Spatel nicht genügend erkaltet, so erhält man durch das in Lösung gegangene Hämoglobin ein mehr oder weniger rot gefärbtes Serum. Hauser meint, daß die Anwesenheit von frischem Hämoglobin auf den Eintritt der Reaktion hemmend wirke und glaubt die Tatsache, daß die Niederschlagbildung in schwach gelblich gefärbten Blutlösungen viel intensiver auftritt als in schwach rötlich gefärbten, hierauf zurückführen zu müssen. Nach Kister und Wolff beruht das darauf, daß die rötlich gefärbten Blutlösungen die Reaktion viel weniger deutlich erkennen lassen als die farblosen. Wenn wir auch eine nennenswerte geringere Wirksamkeit solchen Serums im all-

Fig. 20. Probeblutentnahme vom Kaninchen.

Fig. 21. Wasserzentrifuge nach Jung.

gemeinen nicht beobachtet haben, so ist es immerhin doch ratsam ein möglichst farbloses Serum für die biologische Reaktion zu gewinnen. Zur Zentrifugierung des durch die Probeblutentnahme gewonnenen Serums verwendet man am besten eine in einem jeden Laboratorium leicht anzubringende Wasserzentrifuge (Fig. 21). Gibt das so gewonnene klare Serum eine Reaktion (auf die wir später noch ausführlich eingehen werden), die sofort oder nach wenigen Minuten in farblosen, aus eingetrocknetem Blut oder Serum mit Kochsalzlösung hergestellten homologen Blutlösungen in unzweideutiger Weise eintritt, so kann das Antiserum als praktisch brauchbar angesehen werden.

7. Definitive Blutentnahme.

Für die Blutentnahme sind verschiedene Verfahren empfohlen worden. Nach Uhlenhuth geht man in folgender Weise vor:

Das Tier wird tief chloroformiert und auf ein Brett gespannt. Nachdem die Brust- und Bauchfläche mit Alkohol befeuchtet sind — um Verunreinigungen durch Haare zu vermeiden —, werden durch einen medianen Längsschnitt die Weichteile von der Brustseite nach beiden Seiten getrennt und die vordere Brustwand entfernt. Bei den letzten schwachen Schlägen des Herzens wird das Herz angeschnitten. Das Tier entblutet in die Brusthöhlen. Mit einer sterilen etwa 20 ccm fassenden Pipette, die, um ein Verstopfen mit Blutgerinnseln zu vermeiden, mit einer recht weiten unteren Öffnung zu versehen ist, wird das Blut aufgesogen und in einen Blutzylinder gefüllt. Auf diese Weise gewinnt man 70—80 ccm Blut; kräftige Tiere lieferten bis zu 110 ccm.

Ein anderes Verfahren der Serumgewinnung ist von Ziemke angegeben: Das Tier wird in Rückenlage auf ein Brett aufgespannt, die Halsschlagader der einen Seite freigelegt, isoliert und doppelt abgeklemmt. Nun führt man entweder in den abgeklemmten Teil eine stumpfwinklig gebogene sterilisierte Glaskanüle, die man sich selbst herstellt, ein, oder man durchschneidet die Karotis ohne weiteres und fängt das Blut nach Lösung der einen Klemme in einer sterilen Schale auf, in welcher es bis zur Abscheidung des Fibrins geschlagen wird. Während des Verblutens hat man bei diesem Vorgehen die Möglichkeit durch rhythmische Kompressionen des Herzens für eine möglichst vollständige Entleerung des Blutes zu sorgen.

Nuttall verfährt in der Weise, daß er, nachdem das Fell des Tieres am Halse mit Lysol gewaschen, die großen Halsgefäße mit einem großen Schnitt durchtrennt und das Blut in einer flachen Schale auffängt. Schulz tötet ebenfalls die Tiere bei hängendem Kopf durch Halsschnitt.

Zur Gewinnung der spezifischen Sera ist es nach den Angaben einiger Autoren keineswegs nötig, die Tiere, die ein brauchbares hochwertiges Serum liefern, zu töten; sondern für jede Untersuchung die notwendige Serummenge aus der Ohrvene zu entnehmen. Um ein Zurückgehen des Serumtiters zu vermeiden, ist es nötig, die Tiere in gewissen Intervalen weiter zu injizieren.

Ohne die Tiere zu töten und ohne offenkundige Schädigung derselben zu beobachten, entnahmen Kister und Wolff aus der Karotis 40—50 ccm Blut und gewannen so für eine größere Versuchsreihe ausreichendes Serum. Unserer Erfahrung nach muß jedoch von einem derartigen Vorgehen dringend abgeraten werden, da wir häufig, nachdem das Serum sich als hochwertig erwiesen hatte, bei weiterer Behandlung

ein völliges Zurückgehen des Serumtiters haben beobachten können. Die Kaninchen sind stets zu entbluten, sobald das Serum sich als brauchbar erwiesen hat.

Nach Nuttall bleibt das in einer großen Schale aufgefangene Blut mehrere Stunden stehen; bei seiner Gerinnung preßt es das Serum an die Oberfläche; um das Serum abpipettieren zu können, wird die Schale schräg gestellt. Ohne Filtration und ohne irgend welchen Zusatz wird das Serum in sterile, an beiden Seiten ausgezogene Glasröhrchen (Fig. 22) gefüllt. Diese Röhrchen sind nach Nuttall deshalb sehr praktisch, weil ein sich etwa bildender Eiweißniederschlag durch einfaches Abbrechen der Spitze entfernt werden kann. W. A. Schmidt benutzt ähnliche Röhrchen, die aber nur an einer Seite zu einer Spitze ausgezogen sind.

Nach Angabe von Uhlenhuth erfolgt die Serumgewinnung am besten bei Anwendung folgender Methode:

Das in Blutzylinder gefüllte Blut bleibt bei gewöhnlicher Zimmertemperatur etwa 24 Stunden stehen. Es hat sich dann ein meist farbloses, klares Serum abgesetzt, welches, wenn das Gerinnsel sich ordentlich zurückgezogen hat, sogleich mit einer sterilen Pipette in ein steriles Reagenzglas übertragen wird. Um das in dem Zylinder zurückbleibende Blut nach Möglichkeit auszunutzen, wird der Blutkuchen, um ihn besser auszupressen, mit einem sterilen Gewicht beschwert. Nicht selten haftet das Gerinnsel doch an einigen Stellen der Wandung fest an; dann wird es mit einem geraden Spatel, dessen Krümmung der Wölbung des Zylinders entspricht, vorsichtig von der Wand des Glases abgelöst. Das erhaltene Serum wird dann durch Absitzenlassen oder Zentrifugieren von korpuskulären Elementen befreit.

Fig. 22. Nutallsches Röhrchen zum Aufbewahren von präzipitierenden Seris.

8. Notwendige Eigenschaften präzipitierender Sera.

Ein brauchbares Antiserum soll folgende Eigenschaften haben:

a) es soll absolut klar und steril sein; es darf nicht opaleszieren,

b) es soll hochwertig sein,

c) es soll artspezifisch sein.

Es ist daher jedes Antiserum auf diese Eigenschaften sorgfältig zu prüfen.

a) Klärung und sterile Filtration des Antiserums.

Um absolute Klarheit und Sterilität des Serums zu erreichen, empfehlen wir die Filtration mittels steriler Berkefeldscher Filter.

Da eine sterile Filtration, obwohl sie von einem geübten Bakteriologen leicht auszuführen ist, einem weniger Geübten gewisse Schwierigkeiten verursacht, so soll eine genaue Beschreibung und Anleitung hier gegeben werden.

Bei der von uns angewandten Serumfiltriervorrichtung hat man drei Teile zu unterscheiden

1. die Kieselgurkerze,
2. die Saugflasche,
3. die Saugpumpe.

Die Kerzen, die aus Kieselgur (Infusorienerde) bestehen (Liliputkerzen 6,0 cm lang, 1,5 cm Durchmesser), sind auf einem Metallansatz mit einer

Verschraubung befestigt und schließen durch einen Gummiring den Glaszylinder völlig dicht ab.

Um jede Fehlerquelle zu vermeiden, ist es empfehlenswert, zur Filtration von Antiserum jedesmal eine neue Kerze zu verwenden. Die in jeder neuen Kerze stets vorhandenen Schmutzteilchen werden zuerst durch gewöhnliche und umgekehrte Filtration (s. unten) mit steriler Kochsalzlösung entfernt. Darauf wird die Kerze in destilliertem Wasser ausgekocht, wobei man, ebenso wie bei der nachfolgenden Sterilisation darauf zu achten hat, daß die Schraube am Glaszylinder nicht fest angezogen ist, da sonst der Glaszylinder leicht zerspringt. Die ausgekochte Kerze (*a*) wird durch einen Gummipfropfen auf die Saugflasche (*b*) gesteckt. Die Öffnungen der Saugflasche, sowie die obere Öffnung des Umhüllungszylinders werden mit Watte verstopft; darauf findet eine etwa zweistündige Sterilisation im strömenden Wasserdampf statt. Nach dem Erkalten der Kerze und nach dem Anziehen der Schraube am Glaszylinder mit steriler Pinzette kann die Filtration vorgenommen werden.

Nach der früher von uns angewandten Methode (Fig. 23) wurde in die Saugflasche ein steriles Reagensglas gestellt, in welches das

Fig. 23. Alte Methode der sterilen Serumfiltration.

Serum nach der Filtration hineintropfte. Hierauf wurde dann nach Abnehmen des Gummistopfens das Reagensglas mit einer sterilen Pinzette herausgenommen und mit einem abgebrannten Wattebausch verschlossen. Ehe das Filtrat in kleine Röhrchen, wie wir sie für die Abgabe benutzen, abgefüllt werden konnte, mußte es, um festzustellen, ob es vollständig klar blieb, mehrere Tage bei Zimmertemperatur in den großen Reagenzgläsern stehen bleiben. Trübte sich der Inhalt, so wurde die Filtration wiederholt; blieb das Serum dagegen klar, so wurde es mit einer sterilen Pipette in kleine braune Röhrchen (s. pag. 809, Fig. 26) zu 1 ccm abgefüllt. Die mit Watte verschlossenen Röhrchen wurden abermals einige Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt, war ihr Inhalt klar geblieben, so wurden sie über der Flamme zugeschmolzen.

Trotz großer Vorsicht ist es uns auf diese Weise in vielen Fällen nicht gelungen, gleich bei der ersten Filtration ein steriles Filtrat zu erhalten.

Es ist das für unsere Zwecke doppelt unangenehm. Denn eine wiederholte Filtration beeinträchtigt die Wirksamkeit des Serums und es geht auch ein nicht geringer Teil des kostbaren Serums dabei verloren.

Die Nachteile der geschilderten Filtrationsmethode beruhen auf dem mehrfachen Öffnen der Saugflasche während der Filtration und auf der Schwierigkeit der sterilen Herausnahme des Filtrats.

Diese Mängel sind durch einen neuen Apparat (Fig. 24) vollständig beseitigt.

Fig. 24. Filtrierabfüllapparat nach Uhlenhuth und Weidanz.

Der Filtrierabfüllapparat, der im wesentlichen eine Kombination des Maassenschen Bakterienfiltrierapparats und des Lymphabfülltrichters (Modell der Königl. Preuß. Anstalten zur Gewinnung animalischer Lymphe) ist, besteht aus der Berkefeldschen Kerze (*a*), die mittels eines Gummistopfens mit der Saugflasche (*b*) in Verbindung steht. Diese zeigt dicht unter dem Halse ein Ansatzrohr, das mit einer Kugel behufs Aufnahme von Watte versehen ist; in derselben befindet sich außerdem noch eine zweite Glaskugel, die kleine nach der Saugflasche zu gerichtete Öffnungen besitzt und dadurch ein direktes Hineinströmen von Luft in die Saugflasche verhindern soll. Das Ansatzrohr steht mit der Wasserstrahlpumpe (*d*)

in Verbindung. Zur Vermeidung des Hineindringens von Wasser in die Saugflasche ist das Rückschlagventiel (*c*) eingeschaltet, und zur Regulierung des Luftdrucks in der Saugflasche dient der Dreiwegehahn (*e*). Der Abfüllhahn (*f*) ist mit einer umschmolzenen Hülle versehen und zeigt außerdem eine glockenförmige Erweiterung, die es gestattet einen Bausch Watte einzuführen, der die Drehung des Hahnes nicht hindert, wohl aber ein Eindringen etwaiger Luftkeime verhindert. Mit dem Abfüllhahn steht das genau graduierte Röhrchen (*h*), das oben behufs Aufnahme von Watte zu einer Kugel ausgezogen ist, in Verbindung. Der Abfüllhahn (*f*) ist so eingerichtet, daß auch mit Umgehung des Röhrchens (*h*) das Filtrat direkt abgefüllt werden kann. Das Ausflußrohr (*g*) ist von einer angeschmolzenen Glasglocke umgeben, sie hat den Zweck, einmal durch Verschließen der Glasglocke mittels Watte das Abflußrohr vor Infektion zu schützen und außerdem beim Abfüllen des sterilen Filtrats das Hineinfallen von Luftkeime in die Abfüllröhrchen zu verhindern.

Die Filtration wird nun in der Weise ausgeführt, daß, nachdem das zu filtrierende Serum in den Zylinder der Kerze gegossen ist, die Saugpumpe langsam angestellt wird. Hierbei ist darauf zu achten, daß der Dreiwegehahn (*e*) zwischen Saugflasche und Saugpumpe (*d*) richtig eingestellt ist, es ist das der Fall, wenn der Knebel des Hahns in der Richtung der beiden Ansatzröhren verläuft. Um die ersten Kubikzentimeter des Filtrats, die vorzugsweise aus Wasser bestehen, welches beim Auskochen und Sterilisieren der Kerze in derselben zurückgeblieben ist, zu beseitigen, muß die Saugpumpe ausgeschaltet und die Differenz des Luftdruckes zwischen Saugflasche und atmosphärischer Luft wieder ausgeglichen werden, beides wird erreicht durch Drehung des Hahns um 90° nach rechts. Nachdem durch Öffnen des Abfüllhahnes (*f*) der Saugflasche das unbrauchbare Filtrat entfernt ist, wird die Filtration wieder aufgenommen.

Ist die zu filtrierende Flüssigkeit in dem Umhüllungszylinder bis zu dem Metallansatz der Kerze gesunken, so wird, um restlos filtrieren zu können, die Flüssigkeit mit einer zu einer Kapillare ausgezogenen Glasröhre aufgesaugt und auf die filtrierende Kerze geträufelt. Nach W. A. Schmidt kann man auch in der Weise verfahren, daß man den Glaszylinder bis zum oberen Rande des Metallansatzes der Kerze mit Glaskügelchen anfüllt und auf diese Weise die Flüssigkeit zum Steigen bringt. Ferner kann man auch über die Kerze ein Reagenzglas stülpen, das bis auf den Boden des Glaszylinders reicht. Durch die noch in dem Zylinder vorhandene Menge Flüssigkeit wird die Öffnung des Reagenzglases abgeschlossen; es bildet sich bei weiterem Saugen zwischen Kerze und Reagenzglas ein luftverdünnter Raum, die Flüssigkeit steigt infolgedessen, benetzt den porösen Teil der Kerze und wird fast vollständig aufgesaugt. Nachdem das Serum filtriert ist, wird die Filtration in der angegebenen Weise wieder abgestellt. Die Filtration unter zu hohem negativen Druck, die sich durch starke Schaumbildung kenntlich macht, ist mit Hilfe des Dreiwegehahnes (*e*) leicht zu vermeiden, indem man durch Drehen des Hahnes nach rechts etwas Luft in die Saugflasche einströmen läßt. Das quantitative Abfüllen des klaren Filtrates wird folgendermaßen ausgeführt: Der Abfüllhahn (*f*) wird so gedreht, daß eine Kommunikation zwischen der Saugflasche und dem Röhrchen (*h*) hergestellt wird; ist das erreicht, so steigt das Filtrat in *h* in die Höhe, vorausgesetzt, daß der obere Watteverschluß des Röhrchens nicht zu dicht

ist. Sollte das der Fall sein, so muß er auf sterile Weise etwas gelockert werden. Hat man so das gewünschte Quantum abgefüllt, so wird durch Drehung des Abfüllhahnes die Verbindung mit der Saugflasche unterbrochen, dagegen mit dem Abflußrohr (*g*) hergestellt und das abfließende Serum zu je 1 ccm in die einzelnen sterilen Röhrchen abgefüllt. Ist das Filtrat bis zu dem unteren röhrenförmig ausgezogenen graduierten Ende der Saugflasche gesunken, so wird der Abfüllhahn so gedreht, daß mit Umgehung des Röhrchens (*h*) direkt abgefüllt wird und somit kein

Fig. 25. Modifizierter Filtrierabfüllapparat nach Uhlenhuth und Weidanz.

Tropfen von dem oft kostbaren Filtrat verloren geht. Wir haben bei dieser Filtration sehr gute Resultate erzielt. Bei unvollkommener Dichtung des Abfüllhahnes steigen bei der Filtration Luftblasen in der bereits filtrierten Flüssigkeit auf.

Um nun den Abfüllhahn bei der Filtrierabfüllvorrichtung ganz auszuschalten, haben wir folgende Modifikation (Fig. 25) angewandt: Die Saugflasche (*b*) steht hier mittels eines Druckschlauches mit dem genau graduierten Röhrchen (*h*) in Verbindung. Dieses hat an seinem oberen Ende ein seitliches Ansatzrohr (*i*), dessen obere Öffnung zwecks Auf-

nahme von Watte zu einer Kugel ausgezogen ist. Röhrchen *h* steht an seinem unteren Ende durch einen Druckschlauch mit dem mit angeschmolzener Glasglocke umgebenen Ausflußrohr (*g*) in Verbindung. Durch zwei Schraubenquetschhähne kann die Verbindung zwischen Saugflasche und Röhrchen *h* einerseits und zwischen Abflußrohr *g* und Röhrchen *h* andererseits unterbrochen werden.

Vor der Filtration ist der obere Quetschhahn so fest anzuziehen, daß bei der Filtration keine Luftblasen in der bereits filtrierten Flüssigkeit aufsteigen. Ist die Filtration in der oben beschriebenen Weise vollendet und die Luftdruckdifferenz zwischen Saugflasche und atmosphärischer Luft ausgeglichen, so wird nach Schließen des unteren Quetschhahnes der obere geöffnet und das gewünschte Quantum in Röhrchen *h* abgefüllt. Hierbei ist darauf zu achten, daß der Watteverschluß des Ansatzröhrchens (*i*) nicht zu dicht ist, damit beim Herabfließen des Filtrates die im Röhrchen *h* befindliche Luft entweichen kann. Durch vorsichtiges Öffnen des unteren Quetschhahnes kann nunmehr genau quantitativ das Filtrat abgefüllt werden.

Diese Modifikation des Filtrierapparates hat außerdem noch folgende Vorzüge:

1. Man kann sich den Apparat selbst zusammensetzen und unbrauchbar gewordene Stücke leicht ergänzen;
2. Man kann selbst größere Mengen genau quantitativ abmessen, da die graduierten Röhrchen in den verschiedensten Größen zu erhalten sind;
3. Man kann bei nicht quantitativem Abfüllen das Abflußrohr durch Druckschlauch direkt mit der Saugflasche verbinden.

Zum Abfüllen des Antiserums verwenden wir, wie bereits erwähnt, zweckmäßig braune, aber vollkommen klare Röhrchen von etwa 12,5 cm Länge und 0,7 cm Durchmesser (Fig. 26*a*). Die Länge ist deshalb so groß gewählt, um die Röhrchen nach dem Öffnen ev. wieder zuschmelzen zu können.

a *b*

Fig. 26. Serumabfüllröhrchen nach Uhlenhuth.

Ehe die Röhrchen gebrauchsfertig sind, müssen sie sorgfältig gereinigt werden; darauf werden sie mit destilliertem Wasser nachgespült und an der Luft getrocknet. Mit Wattestopfen versehen werden sie im Trockensterilisierungsschrank bei etwa 150° C eine Stunde sterilisiert. Zum Abfüllen des Serums wird das einzelne Röhrchen, nachdem der Wattestopfen abgenommen, mit dem Hals durch die Flamme gezogen und vorsichtig unter die dem Abflußrohr angeschmolzene Glasglocke (*g*) gebracht. Die mit abgebrannten Wattestopfen verschlossenen Röhrchen werden dann bei Zimmertemperatur mehrere Tage aufbewahrt und falls das Antiserum vollkommen klargeblieben und durch eine genaue Titerbestimmung die Wertigkeit des Serums festgestellt ist, zugeschmolzen*). Sodann werden die einzelnen Röhrchen mittels Glasätztinte genau bezeichnet (Fig. 26 *b*).

---

*) Die von anderer Seite vorgeschlagenen Röhrchen mit eingezogenem Halse sind, obwohl sie leichter zugeschmolzen werden können, nicht zu empfehlen, weil sich an der verengten Stelle das Serum beim Abfüllen leicht festsetzt.

Nach Beendigung der Filtration hat man die Kerzen sofort zu reinigen. Es geschieht das in einfacher Weise dadurch, daß man durch die Kerze umgekehrt Kochsalzlösung oder reines Wasser filtriert (Fig. 27). Nur auf diese Weise ist es möglich, die in die feinen Poren der Filtriermasse hineingedrückten Keime zu entfernen.

Opaleszenz des Antiserums.

Einer der störendsten Fehler, den ein Antiserum haben kann, ist die Opaleszenz. Obwohl eine solche häufig zu finden ist, so ist sie doch von vielen Autoren noch nicht gebührend berücksichtigt worden. Die Opaleszenz kann bei ungeübten Untersuchern zu den verhängnisvollsten Irrtümern Veranlassung geben. Es gibt Sera, die, wenn man

Fig. 27. Reinigung der Kerzen durch umgekehrte Filtration.

sie gegen das Licht hält, stark milchig opaleszieren, trotzdem sie an sich völlig klar sind. Setzt man derartige Sera zu irgend einer Blutlösung, so tritt je nach dem Grade der Opaleszenz eine starke Trübung auf, die einer spezifischen Reaktion täuschend ähnlich sieht. Daß sie aber nur durch das Serum an sich bedingt ist, beweist die Tatsache, daß sie bei Zusatz des Serums zu physiologischer Kochsalzlösung ganz ebenso in Erscheinung tritt. Es verdient hervorgehoben zu werden, daß diese Trübungen ganz ähnlich wie echte spezifische Trübungen sich nach einer gewissen Zeit am Boden der Reagenzgläschen als leichte Präzipitate zu Boden senken, um dann beim Schütteln des Gläschens sich als leichte wolkenartige Schleier zu erheben. Worauf die Opaleszenz beruht, ist noch

nicht recht klar. Höchstwahrscheinlich hängt sie mit dem Verdauungsstadium zusammen, in dem sich die Tiere befinden, wie das auch die Physiologen annehmen. Aus diesem Grunde ist es zweckmäßig, die Tiere vor der Entblutung längere Zeit (24 Stunden) hungern zu lassen. Die Opaleszenz löst sich nicht bei Zusatz von Alkalien (UHLENHUTH).

Da die Opaleszenz ein vorübergehender Zusand ist, so ist es zweckmäßig, die Tiere, die bei der Probeblutentnahme opaleszierende Sera zeigen, nicht zu töten, sondern zu warten, bis die Opaleszenz verschwunden ist. Außerhalb des Tierkörpers ist es bisher nicht gelungen, die Opaleszenz zu beseitigen. In der Praxis müssen opaleszierende Sera, die besonders den Ungeübten leicht irreführen können, unbedingt verworfen werden.

Weit seltener kommt es vor, daß Sera, infolge ihrer Neigung sofort zu einer Gallerte zu erstarren, für sero-diagnostische Zwecke unbrauchbar sind. Analog den Angaben HAUSERS u. A. beobachteten auch wir, daß das Serum eines an „Lungenseuche“ erkrankten Kaninchens, nachdem es von dem Blutkuchen abpipettiert war, sofort erstarrte. Durch Zentrifugieren der anfangs leicht opaleszierenden, durchsichtigen, nach längerem Stehen fast undurchsichtig gewordenen Masse, gelang es, von dem erstarrten Serum eine klare wasserhelle Flüssigkeit auszupressen. Wurde diese durch vorsichtiges Abpipettieren in ein frisches Röhrchen gebracht, so erstarrte sie wiederum zu einer elastischen Gallerte, aus welcher dann in gleicher Weise wieder ein klares farbloses Serum gewonnen wurde, das ebenfalls bald wieder erstarrte. Es gelang uns überhaupt nicht, ein flüssigbleibendes Serum zu gewinnen. Bei der Prüfung erwies sich das Serum außerordentlich hochwertig.

b) Titerbestimmung.

Die wichtigste Forderung, die man an ein praktisch zu verwendendes Antiserum stellen muß, ist seine prompte Wirksamkeit. Es ist daher notwendig, daß man die Wertigkeit durch die Titerbestimmung des Serums genau feststellt. Das kann in zweifacher Weise ausgeführt werden. Einmal kann man aus einer ihrer Konzentration nach genau bekannten Lösung durch Zusatz eines bestimmten Quantums Antiserum aus der Menge des aufgetretenen Präzipitats seine Wertigkeit bestimmen, oder man stellt sich mehrere immer stärker verdünnte Lösungen her und beobachtet nach Zusatz von spezifisch wirkendem Serum die auftretenden Trübungen.

Titerbestimmung nach NUTTALL.

Der erste Weg, der sich besonders für vergleichende Untersuchungen eignet, ist besonders von NUTTALL eingeschlagen. Er führt die Titerbestimmung etwa in folgender Weise aus:

Von einer Serumverdünnung von 1:100 werden 0,5 ccm mit 0,1 ccm Antiserum in ein kleines Reagenzröhrchen gebracht. Die Durchmischung der beiden Flüssigkeiten geschieht durch einfaches Umdrehen des mit dem Finger verschlossenen Röhrchens. Nach 24stündigem Stehen desselben wird von dem zu Boden niedergeschlagenen Präzipitat die darüber befindliche Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert und der zurückgebliebene Rest genau gemessen. Hierzu bedient man sich eines Thermometerröhrchens, dessen Lumen so beschaffen ist, daß 0,05 ccm einen 20 mm hohen Raum einnehmen. Um Glasröhrchen von möglichst gleichem Kaliber zu bekommen, steckt man einen zu einer Spitze ausgezogenen Glasstab

soweit als möglich in ein Glasrohr, das obigen Anforderungen entspricht, hinein. Durch Umdrehen des Stabes in dem Röhrchen bezeichnet man sich nunmehr genau den Berührungsring. Mit einem so markierten Glasstabe kann man sich dann leicht die passenden Röhrchen aussuchen. Aus diesen Röhrchen werden Pipetten (Fig. 28) hergestellt, deren Spitze (F) 7 cm und deren Hauptstück (D) 11 cm lang ist. Der Inhalt des Röhrchens zwischen A und B beträgt 0,05 ccm.

Fig. 28.

Fig. 29. Apparat zur genauen quantitativen Bestimmung von Präzipitaten nach G. Nuttall und O. Jnchley. (Journ. of hyg. 1904, Vol. IV, Nr. 2.)

Mit einer solchen Pipette wird die in dem kleinen Reagenzgläschen zurückgebliebene, präzipitathaltige Flüssigkeit vollständig aufgesogen, und zwar soweit, bis der untere Meniskus etwas oberhalb von B steht. Um ein Sinken der Flüssigkeit unter B zu verhindern, wird die Spitze des Röhrchens in ein mit Quecksilber gefülltes kleines Reagenzglas (E) gestellt. Nunmehr bleibt das Röhrchen 48 Stunden bei einer Temperatur, die ein Bakterienwachstum verhindert, stehen. Das in dem Thermometerröhrchen nach unten gesunkene Präzipitat wird dann mit folgendem Apparat genau bestimmt.

Der Meßapparat (Fig. 29, 2) besteht aus der eisernen Fußplatte A, auf der der Eisenstab B vertikal befestigt ist; er ist eingekehlt, um

dadurch zu verhindern, daß sich der obere Teil des Apparates dreht. Dieser läßt sich an dem Stabe auf und ab schieben und kann durch die Schraube C in jeder gewünschten Höhe festgestellt werden, Das eine Ende der Schraube ist so abgerundet, daß es genau in die Kehlung des Stabes B hineinpaßt. Der von C durchbohrte horizontale Metallstab trägt zwei senkrechte Röhren mit den Schrauben D und D', welche die inneren Röhrchen E und E' unabhängig voneinander mit je 5 cm Spielraum herauf und herunter gleiten lassen können. Röhre E trägt eine senkrecht stehende, stählerne 10 cm-Skala, die in 0,5 mm graduiert ist. Auf E' ist eine rechtwinklige Platte senkrecht befestigt, durch deren Mitte Röhre G in senkrechter Richtung geht. Außerdem befindet sich an der Platte noch ein Zeiger, der bis vor die Teilstriche der Skala F reicht. In G stecken 2 Röhren, die sich vor- und rückäwrts bewegen lassen. Eine davon, nächst dem Reagenzglasständer gelegen, trägt eine Blende (siehe Fig. 29, 3) mit rechteckiger Öffnung, deren horizontaler Durchmesser genau dem der Glasröhren, welche den zu messenden Niederschlag (Präzipitat) enthalten, entspricht. Eine feine schwarze Nadel ragt horizontal in das Zentrum dieser Blendenöffnung hinein. Die zweite Röhre J, ist an dem einen Ende offen, an dem anderen mit einer Blende versehen, die einen feinen durch die Mitte gehenden Schlitz zeigt. Die Röhren sind innen geschwärzt.

Der Röhrchenständer soll die das Präzipitat enthaltenen Röhrchen in senkrechter Stellung möglichst nahe der Nadel in der Scheidewand der in G beweglichen Röhre halten. Die kleinen Quecksilber enthaltenen Reagenzgläschen (J) ruhen in konischen Vertiefungen, die den nummerierten Rinnen auf dem Holzbrett K entsprechen. Die Thermometerröhrchen stehen auf dem Boden der Reagenzgläschen auf und halten diese, wenn sie selbst oben eingeklemmt sind, in ihrer Stellung. Die Vertiefungen (L) fixieren die Glasröhrchen, wenn sie mittels des Stabes M in diese Kerbschnitte eingedrückt werden in richtiger Lage. Der Metallstab verläuft parallel mit der oberen Kante von L und wird an jedem Ende durch eine Feder festgehalten. Die Röhrchen müssen immer von unten nach oben eingesetzt werden. Eine schwarze Papptafel liegt auf zwei seitlichen Metallträgern und dient als Hintergrund, um das Ablesen des Präzipitats in den Röhrchen zu erleichtern. Die vordere Fußkante des Röhrengestells dient als Gleitfläche für den Meßapparat.

Die Messung des Präzipitats mit dem beschriebenen Apparat wird folgendermaßen ausgeführt: Man setzt den Fuß des Röhrenständers (1) parallel zu den Boden A des Apparates. Die Höhe des Apparates wird bestimmt bzw. reguliert durch Lockern von C und Höher- oder Niederschieben des oberen Teils an dem Stabe B; hat man auf diese Weise die gewünschte Höhe erreicht, so muß die Schraube fest angezogen werden. Darauf wird die Röhre, welche die nadeltragende Blende hat, möglichst nahe an das das Präzipitat enthaltene Thermometerröhrchen von bekanntem Inhalt gebracht, ohne dieses jedoch zu berühren. Durch Regulierung und Durchschauen durch Röhre J muß die Nadelspitze in gleiche Lage mit dem unteren konvexen Spiegel der Flüssigkeit (Präzipitats) gebracht werden. Durch Drehen an D wird die Skala F so eingestellt, daß der Zeiger über der Zentimetergraduierung steht. Nunmehr wird durch Drehen an D' in ähnlicher Weise der obere Rand des Präzipitats festgelegt. Der Zeiger gibt die auf F zurückgelegte Distanz an, zur Erleichterung des Ablesens dient die kleine Lupe H. Aus der

so gefundenen Höhe des Präzipitats und dem Lumen des Röhrchens wird dann die Menge desselben berechnet.

Viel schneller und einfacher kommt man aber auf dem zweiten Wege der Titerbestimmung zum Ziel. Die hierfür angegebenen Methoden unterscheiden sich im Grunde genommen nur dadurch, daß die einen Autoren schwachwirksame Antisera bei konzentrierteren Eiweißlösungen anwenden, während die anderen hochwirksamen Seris bei starken Verdünnungen der Eiweißlösungen den Vorzug geben.

Titerbestimmung nach Wassermann und Schütze.

Wassermann und Schütze, die schwach wirkende Antisera benutzen, gehen, analog wie bei der Prüfung der Heilsera, von einem Normalserum aus, welches sie als „Normalpräzipitierungsserum“ bezeichnen. Es ist dies ein Serum, welches in der Menge von 1 ccm mit 5 ccm einer Blutlösung aus 0,1 ccm defibrinierten Blutes mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung nach einer Stunde bei 37 ° C einen flockigen Niederschlag gibt. Die in 1 ccm des Normalserums enthaltene Menge der präzipitierenden Substanz wird als „Präzipitierungseinheit“ bezeichnet. Ruft bereits 0,1 ccm des Antiserums bei 5 ccm der Blutlösung einen flockigen Niederschlag hervor, so nennt man es „10faches Normalpräzipitierungsserum“.

Wassermann und Schütze warnen vor einer Verwendung von Antiserum, welches mehr als 2 Präzipitierungseinheiten hat. Die Titration, durch die die Zahl der Einheiten in 1 ccm bestimmt wird, geschieht in folgender Weise: Man stellt sich Blutflecken auf Leinwandstückchen mit je 0,1 ccm Blut her und trocknet dieselben. Nach etwa 2 Tagen löst man mehrere solche Blutflecke mit je 5 ccm 0,85 %iger Kochsalzlösung auf, filtriert dann die Lösungen bis sie vollkommen klar geworden sind und schüttet die klaren Filtrate in je ein Reagenzglas (à = 5 ccm). Zu diesen Röhrchen wird nun das zu prüfende Antiserum in absteigendem Quantum, also beispielsweise 1 ccm, 0,75 ccm, 0,5 ccm, 0,25 ccm und 0,1 ccm zugesetzt; dann werden die Röhrchen in einen bei 37 ° C gehaltenen Brutschrank auf eine Stunde gestellt. Dasjenige Röhrchen, welches bei dem geringsten Zusatz von Serum die flockigen Niederschläge zeigt, gibt die Präzipitierungseinheit an. Wenn z. B. diese Erscheinung in den Röhrchen mit 1, 0,75 und 0,5 ccm Antiserumzusatz in unzweifelhafter Weise auftritt, in dem Röhrchen mit 0,25 ccm Antiserumzusatz aber nur eine schwache Trübung sichtbar ist, dann ist die Präzipitierungseinheit in 0,5 ccm enthalten. Das Antiserum ist dann als ein zweifaches Normalpräzipitinserum anzusehen.

Titerbestimmung nach Uhlenhuth und Beumer.

Uhlenhuth, der für die Praxis ein sehr hochwertiges Antiserum aus den bereits oben erörterten Gründen verlangt, geht bei der Titerbestimmung in folgender Weise vor: Man stellt sich zuerst Verdünnungen mit 0,85 %iger Kochsalzlösung von den betreffenden Serumsorten her, zu deren Nachweis das Antiserum dienen soll und zwar 1 : 1000, 1 : 10000 und 1 : 20000. Man bedient sich zur Titerbestimmung ebenfalls zweckmäßig des von Uhlenhuth und Beumer angegebenen Reagenzglasgestelles (s. oben). Für die Titerbestimmung werden nunmehr 4 gleichmäßig dicke und absolut saubere Reagenzröhrchen ausgesucht und in das Gestell hinein-

gehängt. Mit einer sterilen Pipette werden in Röhrchen I, II und III je ein Kubikzentimeter der klaren Verdünnungen 1:1000, 1:10000 und 1:20000 gebracht. Röhrchen 4 wird mit 1 ccm steriler 0,85 %iger Kochsalzlösung beschickt. Zum Einfüllen dieser verschiedenen Lösungen genügt eine einzige, sterile, ein Kubikzentimeter fassende Pipette, wenn man in der Weise vorgeht, daß man zuerst Röhrchen IV, dann III, II und zuletzt I mit den erwähnten Flüssigkeiten versieht.

Zu den einzelnen Röhrchen wird je 0,1 ccm des zu prüfenden klaren Antiserum mit einer sterilen, graduierten Pipette (1 ccm mit 100 Teilstrichen) zugesetzt. Ohne zu schütteln werden nunmehr die Röhrchen zweckmäßig bei durchfallendem Tageslicht betrachtet, indem zwischen Lichtquelle und Reagenzröhrchen ein schwarzes, schräg nach oben geneigtes Brettchen gehalten wird.

Bei einem den UHLENHUTHschen Anforderungen entsprechenden Antiserum muß in Röhrchen I, fast momentan, spätestens nach 1 bis 2 Minuten eine deutliche Trübung auftreten, nach 3 resp. 5 Minuten muß auch in Röhrchen II bzw. III die beginnende Trübung deutlich erkennbar sein. Die Reaktion ist zuerst als hauchartige Trübung an dem Boden des Röhrchens sichtbar, sie verwandelt sich aber nach etwa 5 Minuten in eine dicke, wolkige, die sich weiterhin als Bodensatz absetzt. Entsprechend den einzelnen Verdünnungen verläuft die Reaktion mehr oder weniger schnell. Röhrchen IV muß dagegen absolut klar bleiben.

Um die Frage zu beantworten, an welchem Material (ob an Blut- oder Serumverdünnungen) die Titerbestimmung der Antisera am besten vorgenommen werden soll, haben UHLENHUTH, BEUMER, HAUSER, KISTER und WOLFF sowie SCHULZ zahlreiche Versuche angestellt und sind dabei zu den übereinstimmenden Resultaten gekommen, daß eine genaue Wertigkeitsbestimmung nur an Serumverdünnungen möglich sei, da die Anwesenheit von Blutfarbstoff die Erkennung zarter Trübungen erschwere und außerdem einen gewissen hemmenden Einfluß auf die Reaktion ausübe. SCHULZ stellte ferner fest, daß die Wertigkeit eines Antiserums, an einer Serumverdünnung geprüft, höher ist als bei der entsprechenden Blutlösung. Es ist das ohne weiteres klar, denn in den Blutverdünnungen ist weniger ausfällbare Substanz vorhanden als in den Serumverdünnungen, da die Blutkörperchen etwa ein Drittel des Blutvolumens ausmachen. Eine Blutlösung von 1:1000 wird daher bei Zusatz der gleichen Mengen präzipitierenden Serums keine so eklatante Reaktion geben wie eine Serumverdünnung von 1:1000.

c) Spezifitätsbestimmung.

Hat man den Titer eines Antiserums ermittelt, so muß dasselbe auf seine Spezifität geprüft werden. Es ist das deshalb notwendig, weil homologe Antisera von gleich hoher Wertigkeit keineswegs auch gleich spezifisch zu sein brauchen. So kann es z. B. vorkommen, daß bei dem einen Antiserum die Grenze der heterologen Trübungen bis 1:50, bei dem anderen derselben Art dagegen bis 1:200 reicht. Die Spezifitätsprüfung ist aber auch aus dem Grunde schon erforderlich, als sie den Nachweis erbringt, daß nicht vielleicht einmal das vorbehandelte Kaninchen versehentlich mit einer heterologen Eiweißart gespritzt ist. Die Spezifitätsprüfung wird in der Weise ausgeführt, daß man sich eine Reihe heterologer Eiweißlösungen von je 1:200 und 1:1000 herstellt. Das homologe Serum wird dagegen nur 1:1000 verdünnt. Ähnlich wie

bei der Titerbestimmung werden die einzelnen Lösungen zu je 1 ccm in Uhlenhuthsche Röhrchen gebracht und mit je 0,1 ccm Antiserum versetzt. Während in dem mit homologer Eiweißlösung beschickten Röhrchen sofort nach dem Antiserumzusatz eine deutliche spezifische Trübung einzutreten hat, müssen die übrigen Röhrchen, selbst noch nach 20 Min. absolut klar bleiben. Aus denselben Gründen wie bei der Titerbestimmung hat auch die Spezifitätsprüfung an genau hergestellten Serumverdünnungen stattzufinden. Bei der Titerbestimmung von Pferde-Antiserum muß in jedem Falle genau die Spezifität des Serums gegen Schweine- und Rinderserum (bzw. Schweine- und Rindfleischlösungen) bestimmt werden.

9. Konservierung präzipitierender Sera.

Das in der angegebenen Weise steril gewonnene Serum wird am besten im Eisschrank aufbewahrt und hält sich hier, ohne eine nennenswerte Abschwächung zu erfahren, oft jahrelang brauchbar. Zusätze zum Serum wie Chloroform, Karbolsäure (Uhlenhuth), Trikresol (Nuttall) usw. haben sich nicht bewährt, Formalinzusatz schädigt die Präzipitation in erheblicher Weise. Nach Marx soll bereits ein mit Formalin getränkter, zum Verschluß der Aufbewahrungsgläser benutzter Wattebausch die Brauchbarkeit des Normal- wie die Wertigkeit des Antiserums beeinträchtigen. Nach den Untersuchungen von Graham-Smith gibt es bisher kein Antiseptikum, das die Wirkungskraft präzipitierender Sera nicht ungünstig beeinflußt. Das nach seinen Untersuchungen am wenigsten schädliche Chloroform hat den Nachteil, daß es das Serum trübe macht, besonders an der Berührungsschicht zwischen Serum und Chloroform. Wenn man die Sera mit soviel Glyzerin und Kochsalz versetzt, daß sie 20 % Glyzerin und 0,9 % NaCl enthalten, dann bleiben sie klar, aber das Auftreten der Präzipitinreaktion wird verlangsamt. Ebensowenig haben sich Zusätze von Allylalkohol und von arseniger Säure bewährt (Löffler).

Hauser tötet im Gegensatz zu Uhlenhuth die Tiere, die ein hochwertiges Antiserum liefern, nicht, sondern entnimmt dem Kaninchen jedesmal die für die Untersuchung notwendige Menge Serum. Da nun aber die Präzipitationsfähigkeit im Tierkörper, trotz der Weiterbehandlung der Tiere, oft abnimmt, und da außerdem das Antiserum, welches bei der ersten Abnahme klar war, bei weiteren Abnahmen recht wohl opaleszieren kann, so ist von einer „Aufbewahrung der Sera im Tierkörper" abzuraten. Ehrlich und Sachs empfehlen die Aufbewahrung präzipitierender Sera in gefrorenem Zustande und wollen mit dieser Methode die besten Erfolge erzielt haben.

Ferner hat man versucht, die Antisera im Vakuum zu trocknen. Das so erhaltene Pulver „trockene Serum" (Corin, Stockis) hat aber den erheblichen Nachteil, daß es sich besonders nach längerem Aufbewahren schlecht oder nicht vollkommen klar löst. Ottolenghi empfiehlt mit Jacobsthal und v. Eisler die Konservierung präzipitierender Sera auf Fließpapier. Diese Autoren fanden, daß solche auf Papier getrocknete Sera, wenn sie vor Licht und Feuchtigkeit geschützt aufbewahrt wurden, unverändert ihre Wirksamkeit beibehielten, und daß sie sich gegen hohe Temperaturen relativ unempfindlich erwiesen; konnten sie doch ein dreiviertelstündiges Erhitzen auf 100° C ohne Abschwächung aushalten. Dagegen verlor das in derselben Weise behandelte Serum, dem Einfluß von Licht, Luft und Feuchtigkeit ausgesetzt,

schon innerhalb 14 Tagen bedeutend von seiner Wirksamkeit. v. Eisler, der über die Konservierung präzipitierender Sera auf Papier, eingehende Untersuchungen angestellt hat, verwendete im Gegensatz zu Berestneff, der Filtrierpapier von Schleicher und Schüll Nr. 571 zur Serumtrocknung benutzte, schwarzes Papier, das sich als dunkler Hintergrund für die Sichtbarmachung der auftretenden Trübung als zweckmäßig erwies, während weißes Papier die Wahrnehmung einer beginnenden Trübung erschwerte. Nach seinen Untersuchungen eignet sich am besten das sog. Naturpapier, da das Serum in verhältnismäßig kurzer Zeit darauf eintrocknet und sich später leicht wieder löst. Auf etwa 1 qcm große Stückchen dieses Papieres wurde dann das Serum in der zur Ausführung der Reaktion nötigen Menge von 0,1 ccm gebracht und nunmehr 2—3 Stunden im Brutschrank bei 36° gehalten. Derartig konserviertes Serum soll, vor Luft und Feuchtigkeit geschützt, während der Zeit von drei Monaten nichts von seiner Wirksamkeit verloren haben. Die mit angetrocknetem Serum versehenen Papierstückchen werden zweckmäßig in gelben Fläschchen, deren Stöpsel mit Paraffin abgedichtet sind oder noch besser im Exsikkator aufbewahrt.

Die Ausführung der Reaktion gestaltet sich bei der Verwendung des mit Präzipitin präparierten „Reagenzpapieres" in folgender Weise: Ein mit 0,1 ccm Immunserum beschicktes Papierchen wird in die zu untersuchende 1:1000 verdünnte Blutlösung resp. Serumverdünnung (2 ccm) gebracht, das eingetrocknete Serum löst sich innerhalb 1—2 Minuten. Durch Umschütteln kann die Lösung befördert werden.

Derartig eingetrocknetes Serum hat nach v. Eisler und Kraus vor dem flüssigen Serum den Vorzug, daß es viel bequemer zu verschicken ist und eine große Ersparnis von Material gewährleistet, denn das auf dem Papierstückchen eingetrocknete Serum ermöglicht es, gerade nur die zur Ausführung einer Untersuchung nötige Menge von Serum zu verwenden, während bei Anwendung von flüssigem Serum, selbst wenn es in kleineren Mengen in Röhrchen aufbewahrt wird, nach Eröffnung des Röhrchens die ganze darin enthaltene Serummenge schnell aufgebraucht werden muß. Die günstigen Resultate, die v. Eisler mit dieser Methode erzielte, haben ihn veranlaßt, das Verfahren für die forensische Praxis zu empfehlen.

Keine der Konservierungsmethoden ist aber nach unseren Erfahrungen der einfachen sterilen Aufbewahrung des flüssigen Serums vorzuziehen.

Solche Sera haben, wie aus den von uns im Kaiserl. Gesundheitsamte ausgeführten Untersuchungen hervorgeht, eine fast unbegrenzte Haltbarkeit. Zeigten doch die ersten Sera, die Uhlenhuth in dieser Weise konservierte und die bereits zum Teil aus dem Jahre 1903 stammten, trotzdem sie monatelang bei Zimmertemperatur aufbewahrt und öfters stundenlang dem schädlichen Einflusse des Sonnenlichtes ausgesetzt gewesen waren, bei der im Januar 1908 vorgenommenen Titerprüfung kaum eine nennenswerte Abschwächung ihrer Wirksamkeit. Ebensowenig ließen sich, wenigstens bei den in der Praxis in Frage kommenden Verdünnungen, Hemmungserscheinungen der Sera beobachten. Die Untersuchungen erstreckten sich auf 35 verschiedene Menschen-, Pferde- und Rinder-Antisera.

Ebenso wie Biondi konnten auch wir feststellen, daß Sera, die durch Schimmelpilze verunreinigt waren, keine Spur von Ab-

schwächung zeigten; klar filtriert konnten sie ohne Einschränkung gebraucht werden.

Bei vielen im flüssigen Zustande aufbewahrten Seris findet sich ein mehr oder weniger starker gelbgrau bis grauweißer Bodensatz, der insofern sehr störend ist, als er beim Versand oder bei unvorsichtiger Entnahme des Serums aufgerührt, letzteres trübt und momentan unbrauchbar macht. Durch längeres Stehenlassen oder Zentrifugieren des getrübten Serums gelingt es jedoch leicht, die für die Reaktion notwendige Klarheit wieder herzustellen.

Wodurch die Niederschläge, die sicher nicht bakterieller Natur sind, in den Seris bedingt werden, läßt sich zurzeit noch nicht mit Sicherheit sagen. W. A. Schmidt machte ganz zufällig die Beobachtung, als er bei der Titerbestimmung von Menschenantiseris irrtümlich zweimal Antiserum, das von verschiedenen Kaninchen stammte, zusetzte, daß in diesem Röhrchen, im Gegensatz zu den anderen, sofort eine ungewöhnlich starke Reaktion eintrat. Er schloß aus dieser Beobachtung

1. daß ein Antiserum neben dem Präzipitin auch das zur Vorbehandlung der Kaninchen verwandte (also präzipitable Eiweiß) enthalten kann, ohne daß im Antiserum selbst eine Wechselwirkung zwischen beiden eintritt und

2. daß dies präzipitabele Eiweiß, welches sich im „latenten“ Zustande im Antiserum befindet, durch das Präzipitin eines anderen, mit gleicher Blutart vorbehandelten Kaninchens ausgefällt werdeu kann.

Diese paradoxe Eigenschaft der Antisera ist praktisch insofern von Bedeutung, als sie davor warnt, bei einer Untersuchung Sera zu benutzen, die von verschiedenen Kaninchen stammen. Im § 16 Abs. 3 der Anlage a zu den am 1. April 1908 in Kraft getretenen Ausführungsbestimmungen D zum Fleischbeschaugesetz, durch den die biologische Untersuchung beim Vorliegen des Verdachtes verbotswidriger Einfuhr von zubereiteten Einhuferfleisch gesetzlich vorgeschrieben ist, hat man auf diese Eigenschaft der präzipitierenden Sera bereits Rücksicht genommen, denn in der Anweisung heißt es: „Zur Untersuchung soll stets nur der Inhalt eines Röhrchens, nicht dagegen eine Mischung mehrerer Röhrchen verwendet werden.“ Dasselbe gilt natürlich auch für Abgabe anderer Antisera.

Die Tatsache, daß in einem Antiserum die präzipitierende Substanz und das zur Vorbehandlung der Kaninchen verwandte Eiweiß unabhängig voneinander vorkommen können, legte den Gedanken nahe, daß die spontan in den präzipitierenden Seris auftretenden Ausfällungen durch sog. „Autopräzipitation“ bedingt seien. Für diese Annahme sprach ferner noch die Tatsache, die auch von Merkel beobachtet wurde, daß nachträgliche Trübungen und Ausflockungen steril gewonnener Sera besonders dann aufzutreten pflegten, wenn die Sera zu früh nach der letzten Injektion dem Kaninchen abgenommen wurden, d. h. zu einer Zeit, in der neben den bereits gebildeten Antikörpern noch freies Antigen vorhanden war.

Um diese Frage näher zu studieren, wurden von uns 10 mit Pferdeeiweiß vorbehandelte Kaninchen täglich auf Antigen und Antikörper untersucht. Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß den einzelnen Tieren jedesmal etwa 1 ccm Blut aus der Ohrvene entnommen wurde. Das hieraus gewonnene, klar filtrierte Serum wurde zum Antigennachweis mit der 10fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und dann mit hochwertigem Pferde-Antiserum überschichtet (Kapillar-

methode). Bei Kaninchen, die mit 5 ccm Pferdeserum intravenös einmal gespritzt waren, konnten wir noch am 15. Tage nach der Injektion den Nachweis von Pferdeeiweiß im Blut erbringen. Um den Nachweis von Antikörpern in den mit Pferdeeiweiß vorbehandelten Tieren zu führen, überschichteten wir das klar filtrierte Kaninchenserum mit 1 : 10 verdünntem Pferdeserum. Als Kontrolle diente normales Kaninchenserum. Wir konnten bereits etwa acht Tage nach der ersten intravenösen Injektion geringe Antikörperbildung nachweisen. Mit dem täglich beobachteten Wachsen der präzipitierenden Substanz ging die Abnahme der Antigenmenge Hand in Hand. Bei Antiseris, die bereits ziemlich hochwertig waren, ließ sich noch längere Zeit nach der letzten Injektion freies Antigen nachweisen. Weiter zeigte es sich, daß ein von demselben Kaninchen stammendes Antiserum, am zweiten Tage nach der letzten Injektion abgenommen und steril in einzelnen Röhrchen aufbewahrt, nach einiger Zeit spontan einen etwas größeren Niederschlag gab, als das vier Tage später abgenommene Serum. Die vor und nach dem Auftreten des Niederschlages ausgeführte Titerbestimmung ergab außerdem, daß eine ganz minimale Abnahme der Wirksamkeit des Serums stattgehabt hatte.

Alle diese Untersuchungen scheinen dafür zu sprechen, daß die in den einzelnen Serumröhrchen gefundenen Niederschläge vielleicht auf Autopräzipitation zurückzuführen sind.

Gegen diese Annahme spricht allerdings die Beobachtung, daß auch normales Kaninchenserum, wenn auch nur selten, nachträglich ähnliche Ausfällungen zeigen kann. Nach Uhlenhuth ist es nicht ausgeschlossen, daß die Niederschläge auch durch bestimmte Glassorten, in denen die Sera aufbewahrt sind, bedingt werden.

Die eben erwähnten Ausflockungen sind nicht zu verwechseln mit den Trübungen, die nach Uhlenhuth eintreten, wenn das Antiserum in zu kühlen Räumen aufbewahrt wird; im Gegensatz zu jenen lösen sich diese Niederschläge, die auf Salzausfällungen zu beruhen scheinen, bei gelindem Erwärmen auf und setzen die Wirksamkeit des Antiserums nicht herab.

Der bei vielen Seris beobachtete „fettige“ Überzug, der höchstwahrscheinlich aus Cholestearin besteht, scheint die Wirksamkeit der präzipitierenden Sera nicht zu beeinträchtigen.

Aus unsern Untersuchungen ergibt sich:

1. Die im flüssigen Zustande ohne konservierende Zusätze steril aufbewahrten präzipitierenden Sera sind jahrelang haltbar.

2. Die Tötung der Kaninchen, die ein hochwertiges Antiserum liefern, ist zweckmäßig erst dann vorzunehmen, wenn kein freies Antigen mehr nachweisbar ist.

3. Nach dem Auftreten von Eiweißausfällungen, die vielleicht auf „Autopräzipitation“ zurückgeführt werden müssen, ist eine abermalige Titerbestimmung vorzunehmen.

Da die Gewinnung hochwertiger Sera, wie wir gesehen haben, mit gewissen Schwierigkeiten verbunden ist und solche Sera nicht überall erhältlich sind, so werden bis auf Weiteres Menschen- und Pferdeeiweiß präzipitierende Sera vom Kaiserlichen Gesundheitsamt an amtliche Untersuchungsstellen abgegeben. Das Antiserum, das mit Datum und

Titer versehen ist, wird in flüssiger Form ohne jeden Zusatz verschickt. Es empfiehlt sich gleichzeitig die für die Herstellung der Kontrolllösungen notwendigen Reagentien (normales Kaninchenserum in flüssiger Form sowie angetrocknetes Menschen-, Pferde- und Rinderblut) beizufügen.

Die für den Transport bestimmten Menschen-Antisera sowie die zur Herstellung der Kontrollösungen nötigen Röhrchen (4) werden zweckmäßig in einen mit 6 Bohrungen versehenen Holzklotz geschoben. Die einzelnen Bohrlöcher sind numeriert (1—6) zur Aufnahme der entsprechend bezeichneten Röhrchen. Der Verpackung ist zweckmäßig folgende Anweisung beizugeben: Das auf Mencheneiweiß präzipitierend wirkende Serum (vom Kaninchen) in Röhrchen 1 und 2 und das normale Kaninchenserum in Röhrchen 3 sind ohne jeden Zusatz steril aufbewahrt. Etwaige Trübungen sind nicht bakterieller Natur, sondern Ausfällungen von Eiweißsubstanzen, die durch den Transport aufgeschüttelt sind. Durch längeres Stehen oder Zentrifugieren wird das Serum wieder klar und somit gebrauchsfähig. Das Serum ist vor Licht geschützt kühl aufzubewahren.

In Röhrchen 4, 5 und 6 befindet sich auf Gaze angetrocknetes Menschen-, Pferde- und Rinderblut. Die Blutlösungen werden durch Auslaugung mittels physiologischer Kochsalzlösung ebenso wie die Lösungen aus den Testobjekten hergestellt.

Literatur.

Die mit einem Stern versehenen Literaturangaben beziehen sich auf den biologischen Nachweis von Pferdefleisch und anderer Fleischsorten.

Alkan, R., Über den Einfluß der Salzkonzentration auf die Präzipitinreaktion. Diss. Würzburg. 1893.

Arthus und Vansteenberghe, Compt. rend. de soc. de biol. 1902, Nr. 8. Referat Zeitschr. f. Medizinalbeamte 1902, Nr. 13.

Aschoff, Ehrlichs Seitenkettentheorie und ihre Anwendung auf die künstlichen Immunisierungsprozesse. Zeitschr. für allg. Physiol. Bd. I.

Ascoli, M., Über den Mechanismus der Albuminurie durch Eiereiweiß. Münch. med. Woch. 1902, Nr. 10.

Ders., Zur Kenntnis der Präzipitinwirkung und der Eiweißkörper des Blutserum. Ebd. 1902, Nr. 34.

Ders., Neue Tatsachen und neue Ausblicke in der Lehre der Ernährung. Ebd. 1903, Nr. 5.

Ders., Passiert Eiweiß die plazentare Scheidewand? Zeitschr. für physiol. Chemie, Nr. 36, pag. 498.

Ascoli, M. u. Bonefanti, A., Weitere Untersuchungen über alimentäre Albuminurie. Ebd. 1903, Nr. 41.

Ascoli, M. u. Vigano, L., Zur Kenntnis der Resorption der Eiweißkörper. Hoppe Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie 1903, Bd. XIL, Heft 3 u. 4.

Austin, Limitation of the Uhlenhuth test for the differentiation of human blood. Boston med. and surg. Journ., Vol. CXIIX, pag. 279—281.

*Baier, E. und Reuchlin, E., Über den Nachweis von Pferdefleisch mittels des biologischen Verfahrens. Zeitschr. für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel 1908, Bd. XV, Heft 9.

Bail, Versuche über Typhusagglutinine u. Präzipitine. Arch. f. Hyg. 1902, Bd. XLII.

Balthazard, V., La réaction précipitante des serums en médicine légale. Gaz. des hôpitaux. 31. Mars 1905, pag. 363.

*) Die für die Herstellung von präzipitierenden Seris und für die Ausführung des biologischen Verfahrens notwendigen Apparate sind von der Firma F. u. M. Lautenschläger, Berlin N., angefertigt und von dort zu beziehen.

BASTERO LERGA, J., Procedimento biologico para el Reconocimento Médico-legal del origen de las Manchas de Sangre. M. Escar. Zaragoza 1902.
BAUER, J., Über die Spezifität der biologischen Eiweißdifferenzierung. Arbeiten aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt. Heft 3, 1907.
*BEHRE, A., Der Nachweis von Pferdefleisch in der Wurst. Zeitschr. für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel 1908, Bd. XV, Heft 9.
BEHRING, Deutsche med. Wochenschr. 1900.
BEHRING und WERNICKE, Zeitschr. für Hygiene 1892, Bd. XII. pag. 10.
BELJAEFF, Über die Bedingungen der Bildung spez. KRAUSscher Niederschläge, Centralbl. für Bakt., Bd. XXXII.
BERESTNEFF, Russ. Wratsch 1905, Nr. 22.
BERTARELLI, Die Verwendung der biol. Methode zur Auffindung und Diagnose der Hülsenfruchtmehle mit besonderer Berücksichtigung der Wicke, Centralbl. für Bakt. 2. Abtlg. 1903, Bd. XI, Heft 38.
BEUMER, Die Untersuchung der Menschen- und Tierknochen auf biol. Wege. Zeitschr. für Medizinalbeamte, 1902, Heft 23.
Ders., Verhandl. d. Ver. deutscher Naturforscher u. Ärzte, Breslau. 19. Sept. 1903.
BINDA, Sulla diagnosi spezifica del sangue. Giornale di medic. legale 1901, Nr. 1.
BIONDI, Beitrag zum Studium der biol. Methode für die spez. Diagnose des Blutes. Vierteljahrsschr. für gerichtl. Med. u. öffentl. Sanitätsw. 1902. 3. Folge. Bd. XXIII.
BONOME, Präzipitinreaktion als diagnostisches Mittel d. Tuberkulose u. zur Diff. zwisch. Menschen- u. Rindertuberkulose. Centralbl. für Bakt. usw. Originale. Bd. XLIII, Heft 4, 1907.
*BORCHMANN, K., Notwendigkeit der Untersuchung von mit Pferde-, Hunde-, Hirsch-, Renntierfleisch usw. verfälschten Fleisch- und Wurstwaren mittels d. sog. biol. Methode durch Tierärzte. Zeitschr. für Fleisch- u. Milchhygiene XVI. Jahrg., 1906, Heft 3.
Ders., siehe WEIDANZ.
BORDET, Sur l'agglutination et dissolution des globules rouges. Ann. Pasteur 1899.
Ders., Les sérums hémolytiques leur antitoxins et les théories des sérums cytolytiques. Ibid. 1900.
Ders., Bull. Soc. Royal Science Méd. et Nat. Bruxelles. Vol. LIX, pag. 174—176.
BRUCK, C., Über spez. Immunkörper gegen Gonokokken. Deutsche med. Wochensch. 1906, Nr. 34.
Ders., Zur forensischen Verwertbarkeit u. Kenntnis des Wesens der Komplementbindung. Berliner klinsche Wochenschr. Nr. 47, 1907.
BUCHNER und GERET, Über ein kristallinisches Immunprodukt. Münchener med. Wochenschr. 1902.
BUTZKA, Un nouveau moyen pratique pour distinguer le sang de l'homme. Compt. rend. de la soc. de biol. Tome LIV, pag. 406—407; Zeitschr. für Medizinalbeamte 1903, Nr. 3.
CAMUNETY, Rivista Chilene de hygiena, 1902.
CAMUS, Spécifité et condition d'action des précipitines. Compt. rend. de la soc. de biol. 1901. 6. Juli.
CAMUS und GLEY, Arch. internat. de Pharmacodyn., 1899, Tome V, pag. 247; Ann. Pasteur, 1899.
CAPOGROSKI, Isoagglutinine et isolisine del siero umano. Ann. d'igiene sperim. 1903.
CARNWATH, Zur Technik der Untersuchung kleinster Blutspuren. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 1907, Bd. XXVII, Heft 2.
CARRARA, Sulla diagnosi specifica sangue umano. L'arte med. 1901, Nr. 33 u. 34.
CARRARA, M., Siero precipitante specifico per il sangue ottenuto mediante inezioni di nucleoproteidi. Rivista critica di Clin. med. Vol. III, 1902, Nr. 37.
Ders., Di un nuovo metodo par la diagnosi specifica di sangue umano. Arch. di Psych. Med. legale ed Anthrop. crim., Vol. XXV, fasc. III.
CASTELLANI, Some experiments on the precipitins. Lancet, 28. Juni 1902; Ref. Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 32.
CASTAIGNE und BATHERY, Compt. rend. de la soc. de biol. 1902, pag. 568.
CENTANNI, Über Autopräzipitine u. über eine allgemeine Form derselben. Centralbl. für Bakt. usw. 1903.
Ders., Lo Speriment, 1902.
Ders., Rif. med. Vol. IV, 1900—1902.
CHIROKIKH, Wratsch, 1901, Nr. 29.
COMMENTZ, Revista Chilena de hygiene, 1902.
CORIN, Zur prakt. Verwertung der Serodiagnostik des menschl. Blutes. Arch. d'anthropol. criminelle 1901, Tome XVI, Nr. 94; Vierteljahrschr. für gerichtl. Med. u. öff. San. Bd. XXIII, 1 Heft.

Corin, Le séro-diagnostic du sang, Ann. de la Soc. de Med. lég. de Belgique 1901.
Creite, Versuche über die Wirkung des Serumeiweißes nach Inj. in das Blut. Zeitschr. für rat. Med., Bd. XXXVI.
Daske, O., Zur Unterscheidung des Menschenblutes vom Tierblut nach van Jtalie Ärztliche Sachverständigen-Zeitung 1907, Nr. 14.
Dehne, R., Die spez. Löslichkeit u. ihre Anwendung bei der forens. Blutuntersuchung. Münch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 8.
Dennstedt und Voigtländer, Der Nachweis von Schriftfälschungen, Blut, Sperma usw., Baumerts Lehrb. der gerichtl. Chemie 1906, Bd. II.
Deutsch, Le diagnostic de tâches de sang. 13 Congr. intern. de méd., Paris 1900.
Ders., Zur Diagnose d. menschl. Blutkörperchen, Deutsche med. Wochenschr. 1901.
Ders., Die forensische Serumdiagnose d. Blutes. Centralbl. für Bakt. usw. 1901, Bd. XVI.
Dieudonné, Beiträge z. biol. Nachweis v. Menschenblut. Münch. med. Wochenschr., 1901, Nr. 14.
Ders., Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie. Zusammenfassende Übersicht über die Immunitätslehre. Verlag J. A. Barth, Leipzig 1903 und Würzburger Abhandlungen 1901, Bd. I, Heft 8.
H. Dürck, Neuere Forschungen über Eiweiß, Blut und Blutsverwandtschaft. Vortrag in der Anthropolog. Gesellschaft in München 25. Januar 1907.
v. Dungern, die Antikörper. Verlag v. G. Fischer, Jena, 1903.
Ders., Bindungsverhältnisse bei der Präzipitinreaktion. Centralbl. f. Bakt. 1903, pag. 355.
Ders., Spezifität der Antikörperbildung. G. Fischer, Jena 1904.
Ders., Uber die Kellingsche Karzinomtheorie, Internationale Konferenz für Krebsforschung zu Heidelberg-Frankfurt a. M. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 41, pag. 2029.
Ehrenroth, E., Über praktische Bedeutung der Alexinfixation (Komplementablenkung) für die forensische Blutdifferenzierung. Vierteljahrsschr. für gerichtl. Med. etc. 1906, Heft 12.
Ehrlich, On Immunity with special reference to Cell-Life. Croonian lecture. Proceed of the Royal Society 1900, Vol. LXV, pag. 424.
Ehrlich, Neisser und Sachs, Bericht über das Neisser-Sachssche Verfahren zur forensischen Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Klin. Jahrbuch. 1908, Bd. XIX.
Eisenberg, Beiträge z. Kenntnis der spez. Präzipitationsvorgänge. Bull. acad. de soc. de biol. Mai 1902.
Ders., Untersuchungen über spez. Präzipitationsvorgänge. Centralbl. f Bakt. usw. 1902, I. Abt. Bd. XXXI, Nr. 15.
Ders., Weitere Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination u. Präzipitation I u. II. Centralbl. für Bakt. usw. Abt. Originale. Bd. XLI, Heft I u. III.
Eisenberg und Volk, Untersuchungen über Agglutination. Zeitschr. für Hygiene 1902 u. Wiener klin. Wochenschr. 1901, pag. 1221.
v. Eisler, Über die Konservierung präzipitierender Sera auf Papier. Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 17.
Ewing, Differentiation of moonkey and human blood by the serum test. Proc. New-York, path. soc. IV. S., Vol. III, pag. 14—22, 1903.
Ewing und Strauss, Linits of the specific reaktion in the serum test for blood. New-York path. soc. 1903.
Falloise, Contribution à l'étude des sérums précipitants. Ann de l'Inst. Pasteur 1902.
Farnum, The biological test for semen. Transaktions of the Chicago path. soc. 1901, 9. Derember. Bd. V, Nr. 3.
Ders., The journ. of the Americal Medial Association 1901.
Farrai, Sulla diagnosi specif. del sangue col metodo biologica in medicino legale. Estrato da Bolletino della R. Accademia Medica de Genova Ann. 1901, Bd. XVI, Nr. 7.
Ferreira da Silva und Alberto d'Aguiar, L'examen Médico-légal des taches de sang et spécialement la Méthode d'Uhlenhuth, Lisbonne, XV. Congrès internat. de médecine 1906. 19.—26. Avril.
*Fiehe, J., Über den Nachweis von Pferdefleisch in Fleisch- und Wurstwaren mittels der Präzipitinreaktion. Zeitschr. für die Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel 1907, Bd. XIII, pag. 744.
Fischer, B., Jahresbericht d. chem. Untersuchungsamtes d. Stadt Breslau 1901/02. J. Springer, Berlin 1903.
Fish, Studies on lactoserum and other Cell-sera. Courier of med. St. Louis 1900. Febr.

Fleischmann, P. und Michaelis, L., Die Formulierung der Präzipitinreaktion nach Hamburger und Arrhenius. Biochemische Zeitschr. 1907, Bd. III, Heft 5 u. 6.
Fornet, W., Über den Nachweis des Bakterienpräzipitinogens im Organismus. Centralbl. für Bakteriologie 1907, Bd. XLIII. Originale.
Forssner, Über die Möglichkeit isolierte Eiweiweißkörper bzw. eiweißhaltige Flüssigkeiten, welche aus einem und demselben Organismns stammen, durch die Präzipitinreaktion zu differenzieren. Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 19.
*Frassi, A., Zum Nachweis des Glykogens in den Pferdemuskeln. Clin. Veterinaria 1905, pag. 265.
Ders., Sitzungsbericht d. kgl. preuß. Akad. d. Wissenschaften zu Berlin, Bd. XXXV.
Friedberger, Zur forens. Eiweißdifferenzierung auf Grund der hämolytischen Methode mittels Komplementablenkung nebst Bemerkungen über die Bedeutung des Präzipitats für dieses Phänomen. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 15.
Ders., Weitere Versuche über die Reaktion auf Blutsverwandtschaft. Berliner klin. therap. Wochenschr. 1904, Nr. 12.
Frieudenthal, Über einen experimentellen Nachweis von Blutsverwandtschaft. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1900. Sitzungsbericht der Kgl. preuß. Akad. der Wissenschaften zu Breslau, Bd. XXXV.
Fuhrmann, Über Präzipitine u. Lysine. Hofmeisters Beitr. z. chem. Phys. u. Path. 1903, Bd. III.
Fuld, Über das Bordetsche Laktoserum. Hofmeisters Beitr. z. chem. Phys. u. Path. 1902, Bd. II.
Gaffky und Wassermann, Bericht über das Neisser-Sachssche Verfahren zur forensischen Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Klin. Jahrbuch. Bd. XIX., 1908.
Galli-Valerio, Die Agglutination d. roten Blutkörperchen des Menschen durch homologe u. heterologe Sera u. ihre Verwendung in der gerichtl. Med. Allgem. Med. Central-Zeituug 1905, Nr. 3.
Ganghofer und Sanger, Über die Verwertbarkeit des Phänomens der Komplementablenkung zum Nachweis von artfremden Eiweiß im Blut. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 17.
Gasis, D., Über die Unterscheidung verschiedener Pflanzeneiweißarten mit Hilfe spezifischer Sera. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 7.
Gengou, Sur les substances sensibilatrices des sérums actifs contre les substances albuminoides. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Bd. XVI, pag. 25.
Graham-Smith, The biological or precipitin test for blood considered mainly from its medico legal aspect. Journ. of hygiene 1903, Vol. III, pag. 354—363.
Graham-Smith und Sanger, ibid. pag. 258—290.
Grigorjew, Zur Frage der Technik bei d. Untersuchung von Blut- und Samenflecken in gerichtl. med. Fällen. Vierteljahrschr. für gerichtl. Med. u. öffentl. Sanitätswesen 1902, Bd. XXIV, Heft 1.
*Gröning, Nachweis des Pferdefleisches durch ein spezifisches Serum. Zeitschr. für Fleisch- u. Milchhygiene 1902, 13. Jahrgang. Heft 1.
*Ders., Berliner tierärztl. Wochenschr. 1903, Nr. 12.
Grund, G., Über organspez. Präzipitine und ihre Bedeutung. Deutsche Arch. für klin. Medizin 1906, Bd. LXXXVII.
Grünbaum, Note on the „Blood-Relationsship" of man and the anthropoid apes. The Lancet, 1902, Jan., pag. 143.
Händel und Hüne, Über die Konservierung agglutinierender Sera. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1908, Bd. XXIX, Heft 1.
Hahn und Tromsdorff, Über Agglutinine. Münchener med. Wochenschr. 1900, Nr. 13.
Halban und Landsteiner, Über Unterschiede des fötalen u. mütterl. Blutserums u. über eine agglutinations- und fällungshemmende Wirkung d. normalen Serums. Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 21.
Dies., Zur Frage der Präzipitationsvorgänge. Centralbl. für Bakt, Bd. XXXII, Nr. 2. Original.
Hamburger, F., Biologisches über die Eiweißkörper d. Kuhmilch und über Säuglingsernährung. Wiener klin. Wochenschr. 1900, Nr. 49.
Ders., Zur Frage der Immunisierung gegen Eiweiß. Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 45.
Ders., Arteigenheit und Assimilation. Wien 1903.
Ders., Zur Differenzierung des Blutes (Eiweiß) biologisch verwandter Tierspezies. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 6.

Hamburger und Moro, Über die biolog. nachweisbaren Veränderungen des menschl. Blutes nach Seruminjektion. Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 15.
Hammerl, Untersuchungen über einige den Blutnachweis störende Einflüsse. Vierteljahrschr. für gerichtl. Med. 1892.
Hauser, Über einige Erfahrungen bei Anwendung der serodiagnostischen Methode für gerichtl. Blutunters. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 7.
Ders., Über die Leistungsfähigkeit des Uhlenhuthschen serodiagnostischen Verfahrens bei Anwendung der Kapillarmethode. Festschrift für J. Rosenthal 1906.
Ders., Entgegnung auf den Artikel A. Wassermann: „Gibt es ein biologisches Differenzierungsverfahren für Menschen- und Tierblut mittels der Präzipitine. Deutsche med. Wochenschr. 1904.
Hewlett und Rowland, A new quantitative method for serum diagnosis. Transaktions ot the Path. Soc. of London. Vol. LV, pag. 138.
Honl, Über d. biol. Untersuchungen v. verschiedenen Blutarten. Wiener klin. Rundschau 1901, Nr. 27.
v. Horn, Über d. Einfluß der Temperatur auf die Präzipitinreaktion. Inaug.-Diss. Würzburg 1903.
*Hüne, Die Anwendung des biologischen Verfahrens zum Eiweißnachweis in Fettgewebe und ausgelassenem Fett (Schmalz). Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1908, Bd. XXVIII, Heft 3.
Jacobsthal, Über trockene Konservierung agglutinierender u. präzipitierender Sera. Arch. für Hygiene 1904, Bd. XLVIII.
Jde, Über Antikörper d. chem. reinen Eiweißes. Fortschr. d. Med. 1901, Bd. XIX.
Ders., Hémolyse et Antihémoglobine. La cellule, Tome XX, 2a fascicule, 27. Juli 1902.
van Jtallie, „On the differentiation of fluids of the body, containing proteid." Koninklyke Akademie van westenschappen te Amtserdam; Bericht d. deutschen pharm. Gesellsch. 1906, Bd. XVI, Heft 2, pag. 60.
Ders., „On catalases of the blood". Ibid. 1906.
Jeserich, Untersuchung mit Blutserum. Vortrag auf der 8. ordentl. Hauptversammlung des Verb. selbständiger öffentl. Chemiker 28.—29. Sept. 1903 zu Hannover.
*Jess, Anleitung zum Nachweis von Wurstverfälschungen mit Pferdefleisch für gerichtliche Zwecke durch das biologische Eiweißpräzipitierungsverfahren. Berliner tierärztl. Wochenschr. 1903, Nr. 23.
Kamen, Über die biologische Methode des forens. Blutnachweises. Wiener med. Wochenschr. 1904, Heft 33—35.
Katayama, Über das forens. wichtige Verhalten von Blutspuren etc. Vierteljahrschr. für gerichtl. Med. 1888, Bd. LIX.
Kister und Weichardt, Weiterer Beitrag zur Frage des biologischen Blutnachweises. Zeitschr. für Medizinalbeamte 1902, Nr. 20.
Kister und Wolff, Zur Anwendbarkeit des serodiagnost. Blutprüfungsverfahrens. Zeitschr. für Hygiene 1902, Bd. 41.
Dies., Zur Anwendung der Uhlenhuthschen Reaktion. Zeischr. für Med. Beamte 1902, Heft 7.
Klein, A., Zur Kenntnis d. Agglutinine und gewisser Präzipitine. Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 5/6.
Ders., Zur Frage d. Antikörperbildung. Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 29.
Ders., Wiener klin. Rundschau 1904, Nr. 24.
Ders., Über Erythropräzipitin u. andere Immunprodukte einzelner Bestandteile des Blutes. Zentralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXIX, Heft 3 u. 4.
Ders., Über die Spezifität d. Erythropräzipitine. Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 41.
Kluck und Jnada, Deutsches Arch. für klin. Med. Bd. LXXXI, pag. 411.
Kobert, Das Wirbeltierblut in mikrokristallographischer Hinsicht 1901.
Kockel, in Schmidtmanns Handbuch d. gerichtl. Medizin. Verlag Hirschwald, Berlin 1905, pag. 763 ff.
Körber, Die Differenzen des Blutfarbstoffes. Inaug.-Diss. Dorpat 1866.
Kowarski, Über den Nachweis von pflanzl. Eiweiß auf biol. Wege Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 27.
Kratter, Über den forens. Wert der biol. Methode zur Unterscheidung v. Tier- u. Menschenblut. Arch. für Kriminalanthrop. u. Kriminalstatistik 1902, Bd. X; Wiener klin. Wochenschr. 1901. Naturforscher-Versammlung, Breslau 1904 (Diskussion).
Kraus, R., Über spez. Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera-Typhus-Pestbazillenkulturen, erzeugt d. homol. Serum. Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 32.
Ders., Über spezifische Niederschläge. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann.

KRAUS, R., Über biologische Reaktionen. Monatschr. für Gesundheitspflege 1902, Nr. 7 und 8.
Ders., Über die diagnostische Verwertbarkeit der spez. Niederschläge. Wiener klin. Wochenschr. 1901, Nr. 29.
Ders., Zur Theorie der Agglutination. Zeitschr. für Heilkunde 1902.
KRAUS und EISENBERG, Über Immunisierung mit Immunsubstanzen. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXI, Nr. 5.
KRAUS und JOACHIM, Über Beziehungen d. präzipitinogenen Substanz zum Agglutinogen d. Bakterien. Centralbl. für Bakteriologie.
KRAUS und LEVADITI, Sur l'origine des précipitinins. Comp. rend. des seances de l'ac. der sc. 1904.
KRAUS und v. PIRQUET, Weitere Untersuchungen über spezifische Niederschläge. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII.
KRAUS und SCHIFFMANN, Sur l'origine des anticorps Précipitines et Agglutinines. Ann. de l'Inst. Pasteur 1906, Tome XX, pag. 225—239.
KRÜCKOW, Über eine neue Methode zur Unterscheidung des Blutes von Menschen und Tieren. Vortrag in d. Gesellschaft v. Freunden d. Naturkunde 1901.
LAMB, On the precipitin for cobra venom . . . The Lancet, Vol. II, pag. 431—435.
LANDSTEINER, K., Über Serumagglutinine, Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 40.
Ders., Über Beziehungen zwischen den Blutserum u. den Körperzellen. Ibid. 1903, Nr. 42.
LANDSTEINER und CALVO, Zur Kenntnis der Reaktionen des normalen Pferdeserums. Centralbl. f. Bakt. 1902, Bd. XXXI.
LANDSTEINER und v. EISLER, Über die Präzipitinreaktionen d. menschl. Harns. Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 1.
LANDSTEINER und RICHTER, Über die Verwertbarkeit individuellei Blutdifferenzen für die forens. Praxis. Zeitschr für Medizinalbeamte 1903, Heft 3.
LANDSTEINER und JAGIC, Über die Verbindungen und die Entstehung von Immunkörpern. Münchener med Wochenschr. 1903, Nr. 18.
LAYTON, The medico legal test of blood stains. Trans. of the Chicago path. soc., Vol. V, pag. 217—222.
LEBLANC, Contribution à l'étude de l'immunité acquise. La Cellule 1901, 31. Mai, Tome XVIII, 2 fasc.
Ders., Nouvelle méthode pour la diagnose de sang humaine en méd. lég. (Réaktion Bordet-Uhlenhuth) (Monographie.) Paris, Vigot frères, éditeurs, 1903.
LECLAINCHE und VALLÉE, Notes sur les anticorps albumineux. La sém. méd. 1904, Nr. 4 u. Compt. rend. de la soc de biol. 1901, Jan.
LEERS, O., Methoden und Technik der Gewinnung, Prüfung und Konservierung des zur forensischen Blut- bzw. Eiweißdifferenzierung dienenden Antiserums. Verlag von R. Schoetz. Berlin 1908.
LEVENE, On the biological relationship of proteid. Med. news (New-York), Vol. XL, pag. 981—982; Deutsche med. Wochenschr. 1903.
LEVY und BRUNS, Berliner klin. Wochenschr. 1897, Nr. 23.
LEWIN und ROSENSTEIN, Untersuchungen über d. Häminprobe. Virchows Archiv, Bd. CXLII.
LIEFMANN, H., Über die Komplementablenkung bei Präzipitationsvorgängen. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 15.
LIEPMANN, W., Über ein für menschl. Plazenta spez. Serum. Deutsche med. Wochenschrift 1902, Nr. 51; 1903, Nr. 5 u. 22.
BASTERO LERGA, Conferencia teorica-practica dada en la facultad. de med. de Zaragoza, 19. Maja 1902.
LINOSSIER und LEMOINE, Sur les substances précipitantes des albumines (précipitins contenuses dans certains sérums spécifiques). Compt. rend. de le soc. de biol. 1902, pag. 85.
Dies., Sur la spécifité des sérums précipitantes. Ibid. 1902, 8. März.
LISLE, The identification of human blood. New-York med. Journ. Nr. 81, pag. 456.
LOCHTE, Demonstration des Nachweises von Menschenblut; Göttinger psychologisch-forenische Vereinigung 1. Nov. 1907. Monatsschrift für Kriminalpsychiatrie u. Strafrechtsreform 1907.
LOELE, Über die Anwendung von Formalin bei dem UHLENHUTHschen Verfahren. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 22.
LÖFFLER, Über ein neues Verfahren z. Gewinnung von Antikörpern. Deutsche med. Wochenschr. 1904, Bd. LII.
Ders., Diskussionsbemerkung zu dem Vortrage von WEIDANZ: Über die Konservierung präzipitierender Sera. 2. Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie in Berlin 1908. Centralbl. für Bakt. usw. 1. Abt. Referate. Bd. XLII, Beiheft 1908.

Löffler und Uhlenhuth, Bericht über das Neisser-Sachssche Verfahren zur forensischen Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Klin. Jahrbuch 1908, Bd. XIX.
Löwenstein, Über die Bedeutung d. cellulären Immunität. Prager med. Wochenschr. 1901, pag. 374.
Magnus und Friedenthal, Ein experimenteller Nachweis natürlicher Verwandtschaft bei Pflanzen. Berichte der Deutsch. Bot. Gesellschaft 1906, Bd. XXIV, H. 6.
Maragliano, Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 27.
Martin, Ed., Isoagglutination beim Menschen, nebst einer Bemerkung zur Marx-Ehrenroothschen Blutdifferenzierungsmethode. Centralbl. für Bakt. etc. Abt. Origin., Bd. XXXIX, Heft 6.
Ders., Versuche über den Einfluß einer intravenösen Injektion von Plazentarsubstanz auf den eigenen Organismus beim Kaninchen. Monatsschrift für Geburtshilfe und Gynäkologie, Bd. XXIV, Heft 5.
Marx und Ehrenrooth, Eine einfache Unterscheidung von Menschen- und Säugetierblut. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 7 u. 16.
Marx, Der forens. Blutnachweis. Berliner klin. Wochenschr. Nr. 10.
Ders., Demonstration eines Verfahrens zur forenischen Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. XXI. Hauptversammlung d. Preuß. Med. Beamtenvereins. Zeitschrift für Med. Beamte.
Ders., Praktikum der gerichtl. Medizin. Verlag v. A. Hirschwald, Berlin 1907.
Mertens, Ein biolog. Nachweis für die Herkunft des Albumins in Nephritisharn aus dem Blute. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 11.
Ders., Beiträge zur Immunitätsfrage, Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 24.
Ders., Die neue Methode des Menschenblutnachweises. Wiener klin. Rundschau 1902, Nr. 9.
Merkel, Über die Verwertung der Präzipitin-Reaktion. Münchener med. Wochenschr. 1904.
Ders., Über die Verwendung v. Formalinlösungen bei der Uhlenhuthschen Blutuntersuchung. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 31.
Ders., Kleinere technische Winke für die Praxis der Uhlenhuthschen Blutuntersuchung. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 18.
Metalnikoff, Über hämolytisches Serum d. Blutfütterung. Centralbl. für Bakt. etc. 1901, Bd. XXIX.
Metschnikoff, L'immunité, Paris 1902.
Meyer, Über die biologische Untersuchung von Mumienmaterial vermittels der Präzipitinreaktion. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 15.
Meyer und Aschoff, Über die Rezeptoren der Milcheiweißkörper. Berliner klin. Wochenschr. 1901, Bd XXIX.
Michaelis, L., Untersuchungen über Eiweißpräzipitine. Verhandl. d. Vereins f. innere Med. 1901/02; Centralbl. für Bakt. Bd. XXXII; Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 41; Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 21.
Ders., Über Hemmungen der Präzipitinreaktion, Hofmeisters Beiträge z. Phys. u. Path. 1903.
Ders., Inaktivierungsversuche mit Präzipitinen. Centralbl. für Bakt. Bd. XXII, pag. 458.
Ders., Die Bedeutung d. Präzipitinreaktion f. d. Ernährungsphysiol. Zeitschr. für diät. u. physikal. Ther. 1902/03. Bd. VI, Heft 10.
Ders., Weitere Untersuchungen über d. Eiweißpräzipitine. Zeitschr. für klin. Med. Bd. LVI, Heft 5 u. 6.
Ders., Die Bedeutung d. Präzipitine, Hämolysine u. Cytotoxine für d. Klinik. Die deutsche Klink 1905, pag. 347.
Michaelis und Oppenheimer, C., Über Immunität gegen Eiweißkörper. Arch. f. Anat. u. Phys. 1902. Supplementband.
Michaelis und Fleischmann, Über die angebliche präzipitinogene Eigenschaft d. Harns. Fortschr. d. Medizin 1904, Nr. 35.
Dies., Über Bindungsverhältnisse zwischen Präzipitin u. präzipitabler Substanz. Zeitschr. für exper. Path. u. Therapie 1905, Bd. I.
Michaelis, Weitere Untersuchungen über Eiweißpräzipitin. Deutsche med. Wochenschrift 1904, pag. 1240.
Ders., Die Eiweißpräzipitine. Biochem. Zentralbl. Bd. III, pag. 693.
*Miessner und Herbst, Die Serumagglutination und ihre Bedeutung für die Fleischuntersuchung 1902, Bd. XXVIII, Heft 3 u. 4.
Minovici, St., Über Blutdifferenzierung v. gerichtl. Standpunkte. Dtsch. med. Wochenschrift 1902, Nr. 24. Verhandl. d. V. intern. Kongresses für angew. Chemie, Berlin 1903, Bericht IV, pag. 99—115. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 40.

MIRTO, Sul valore del metodo biologico. Riforma med. 1901, Vol. II, Nr. 222 u. 223.
MODICA, Communicazione alla R. Accademia di Medicina di Torino. Sedula del 31. Maggio 1901.
MOLL, Über Blutveränderungen nach Eiweißinjektionen. Hofmeisters Beiträge z. chem. Phys. u. Path. 1903, Bd. V, Heft 12.
Ders., Über künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin. Ebd. 1903, Bd. IV, Heft 12.
MORESCHI, La clin. med. ital. 1902.
Ders., Zur Lehre v. den Antikomplementen. Berliner klin. Wochenschr. 1905 Nr. 37.
Ders., Zur Lehre von den Antikomplementen. 2. Mitteilung. Berliner klin. Wochenschrift 1906, Nr. 4.
MORGENROTH, Über die Bindung hämolytischer Ambozeptoren. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 2.
MORO, Biolog. Beziehungen zwischen Milch u. Serum. Wiener klin. Wochenschr. 1901, Nr. 44.
MOSER, Hämoglobinkristalle zur Unterscheidung v. Menschen- u. Tierblut. Vierteljahrschr. für gerichtl. Med. 1901.
MÜLLER, P. TH., Vergleichende Studien über die Gerinnung d. Kaseins durch Lab und Laktoserum. Münchener med. Wochenschr. 1902, pag. 272. Vorl. Mitteil.
Ders., Arch. für Hygiene 1902, Bd. XIV, pag. 126.
Ders., Weitere Studien über die Fällung d. Kaseins durch Lab und Laktoserum. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII, pag 521.
Ders., Technik der serodiagnostischen Methoden. G. Fischer. Jena 1908.
MYERS, Über Immunität gegen Proteïde. Centralbl. für Bakt. 1900, Bd. XXVIII; „On immunity against proteids". The Lancet, Vol. II, pag. 98—100.
NAGELSCHMIDT, F., Gibt es latente Präzipitine? Centralbl. für Bakt. etc. Abt. Orig., Bd. XXXV, Nr. 5, 1904.
NEISSER und SACHS, Ein Verfahren z. forens. Nachweis d. Herkunft d. Blutes. Berliner klin. Wochenschr. 1905. Nr. 44.
Dies., Die forens. Blutdifferenzierung d. antihämolyt. Wirkung. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 3.
Dies., Bemerkungen z. d. Arbeit v. Prof. UHLENHUTH über Komplementablenkung u. Bluteiweißdifferenzierung. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 39.
NICOLLE, Recherches sur la substance agglutinée. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Mars.
DE NOBELE, Ann. de la soc. de Grand 1901, pag. 331.
*NOETEL, Über ein Verfahren z. Nachweis v. Pferdefleisch. Zeitschr. für Hygiene u. Infektionskrankh. 1902, Bd. XXXIX.
NOGUCHI, Centralbl. für. Bakt. Bd. XXXIII, Nr. 5.
NOLF, Contribution à l'étude des sérums antihématiques. Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, Bd XIV, pag. 297.
*NUTTALL, On the formation of specific antibodies etc. Journ. of hyg. 1901, Vol. I, pag. 367—387, 1. Juli.
Ders., The new biological test for blood in relation to zoological classification. Proceedings of the Royal Society 1901, Nr. 69. British med. Journ. 1901, 11. Mai, 14. Sept.
Ders., Progress report upon the biological test for blood etc. Brit. med. Journ. 1902. 5. April.
Ders., Further observations upon the biological test for blood (Read 20 January 1902). Proceedings of the Cambridge Philosophicsl Society, Vol. XI, Pt. V.
Ders., Blood immunity and blood relationship etc. Cambridge. University Press.
NUTTALL und JNCHLEY, An improved Method of measuring the amount of precipitum in connection with tests with precipitating antisera. Journ. of hyg. 1904, Vol. IV, Nr. 2.
NUTTALL u. DINKELSPIEL, On the formation of specific antibodies etc. Journ. of hyg. 1901, Vol. I, pag. 367—387.
NEUMANN, A., Die Erkennung des Blutes bei gerichtlichen Untersuchungen 1869.
OBERMEYER und PICK, Biologisch-chem. Studien über das Eiklar. Wiener klin. Rundschau 1902, Nr. 15.
Ders., Über den Einfluß physikalischer u. chem. Zustandänderungen präzipitinogener Substanzen auf die Bildung von Immunpräzipitinen. Ref. in Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 22.
Ders., Beiträge zur Kenntnis d. Präzipitinbildung. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 10.
Dies., Über die chem. Grundlagen d. Arteigenschaften d. Eiweißkörper. Wiener klin. Wochenschr. 1906, pag. 327.

Oberndorffer, Zur Technik der Blutentnahme. Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 16, pag. 778.

Ogier, Über die Wassermann-Uhlenhuthsche Methode des Blutnachweises. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 26.

Ogier und Herscher, Moyen de connaître la présence du sang-humain dans une tache de sang. Ann. d'hyg. publique et de méd. lég. 1901. Vol. XLVI, pag. 538.

Okamoto, Untersuchungen über den forensischen praktischen Wert der serumdiagnostischen Methode. Vierteljahrsschr. für gerichtl. Med. 3. Folge. Nr. 24.

Ollendorff, Beitrag zur Technik des Marx-Ehrenroothschen Verfahrens zur forenischen Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Zeitschr. für Med. Beamte 1905, Nr. 14.

Oppenheimer, Über Einwirkung des Trypsins auf die Präzipitinreaktion. Hofmeisters Beiträge zur chemischen Physiol. und Pathol. 1903.

Ders., Über das Schicksal der mit Umgehung des Darmkanals eingeführten Eiweißkörper im Tierkörper. Ebenda 1903.

Oppenheimer und Michaelis, L., Vortrag. Ref. Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 32.

Ottolenghi, Estratto dagli atti della Accademia dei Fisiocritici. Siena 1902, Serie IV, Nr. 14.

Ders., Über die Konservierung der präzipitierenden Sera. Wiener klin. Wochenschrift 1906, Nr. 29.

*Ostertag, Zum Nachweis des Pferdefleisches nach den Ausführungsbestimmungen zum Reichsfleischbeschaugesetz. Zeitschr. für Fleisch- und Milchhygiene 1906, Heft 11, 16. Jahrg.

Paltauf, Über Agglutination und Präzipitation. Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 50.

Palleske, Eine neue Methode des Blutnachweises. Vierteljahrsschr. für gerichtl. Med. 1905, pag. 331.

Patek und Bennet, The new antiser. method of differentiating human from other blood etc. Americ. Medicine, Vol. IV, pag. 734—377.

Pfeiffer, H., Erfahrungen mit der Marx-Ehrenroothschen Methode zur forensischen Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Deutsche med. Wochenschrift 1904, Nr. 30.

Ders., Über den Entwicklungsgang, über neue Ergebnisse und Bestrebungen der Präzipitinforschung. Arch. für Kriminalanthropologie 1906, Bd. 22.

Ders., Beiträge zur Lösung des biologisch-forensischen Problems der Unterscheidung von Spermaeiweiß gegenüber den anderen Eiweißarten derselben Spezies durch die Präzipitinmethode. Verhandl. deutscher Naturforscher und Ärzte in Meran 1905, Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 24.

Pfeiffer und Wagner, Erfahrungen mit der Blutdifferenzierungsmethode nach van Itallie. Verhandl. der deutschen Gesellsch. für gerichtl. Medizin in Stuttgart 1906. Vierteljahrsschr. für gerichtl. Med. 1907. Suppl.

*Pflüger, Die Ausführungsbestimmungen zum Reichsfleischbeschaugesetz vom 30. Mai 1902, betreffend den Nachweis des Pferdefleisches, müssen schleunigst geändert werden. Pflügers Archiv 1906.

Phisalix und Bertrand, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1894, pag. 111.

Pick, Zur Kenntnis der Immunkörper. Hofmeisters Beiträge zur chemischen Physiol. und Pathol. 1901, Nr. 1 und 1902, Nr. 2.

*Pietrini, Beitrag zur Unterscheidung der Fleischsorten mittels präzipitierender Sera. La Clin. vet. 1904, II. Teil, pag. 165.

Piorkowski, Die spezifischen Sera. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXI.

Ders., Berliner tierärztl. Wochenschr. 1902, Nr. 10.

Ders., Bericht der deutschen pharm. Gesellschaft 1902, Heft 1.

Ders., Ein einfaches Verfahren zur Blutdifferenzierung. Ebenda 1906, Heft 6.

Pieri, Clinica moderna 1904, Nr. 21. Referiert im biochemischen Centralbl., Bd. III, pag. 34.

Popp, G., Erfahrungen mit dem biologischen Eiweiß-Differenzierungsverfahren bei Wurstuntersuchungen. Zeitschr. für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel usw. 1907, Bd. XIV, Heft 1 und 2.

Puppe, Die gerichtlich-medizinischen Untersuchungsmethoden, Festschrift zur Feier des 25jährigen Bestehens des Preußischen Medizinalbenmten-Vereins. 1908. Verlag Fischers med. Buchhandlung.

Praum, La différenciation du sang de l'homme et des animaux à l'aide de serums specifiques. Ann. d'hygiène et de méd. légale 1906.

RANZI, E., Uber Komplementablenkung des Serum in Organen. Wiener klin. Wochenschrift 1906, Nr. 51.

RICHTER, MAX, Über Hämoglobinkrystalle. Vierteljahrsschr. für gerichtl. Med. 1900, Nr. 20.

Ders., Der mikroskopische Nachweis von Blut zu gerichtlich-medizinischen Zwecken. Friedreichs Blätter für gerichtliche Medizin 1900.

RICHTER, ED., Gangränöse Pachymeningitis und Wasserstoffsuperoxyd Merck zum Blutnachweis. Monatsschr. für Ohrenheilk. 1904, Nr. 7.

RICKMANN, W., Beitrag zur biologischen Eiweißdifferenzierung. Zeitschr. für Fleisch- und Milchhygiene 1907, Heft 6, pag. 197 und Arbeiten a. d. Königl. Institut für experimentelle Therapie Frankfurt a. M. Jena 1907, Heft 3.

v. RIEGLER, Die Serodiagnose in der Untersuchung der Nahrungsmittel. Österreich. Chemikerztg. 1902, Nr. 5.

*RIEVEL, Refraktometrische Untersuchungen von Fleisch und Milch. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1905, Nr. 12.

ROBIN, Philadelphia med. Journ., Vol. 7.

RODET und LAGRIFONT, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1903.

ROSENBERG, Archiv für Kriminalanthrop. und Kriminalistik. Okt. 1902.

RÖMER, P. und MUCH, H., Antitoxin und Eiweiß. Jahrbuch für Kinderheilkunde, Bd. LXIII, Heft 6.

ROSTOSKI, Über den Wert der Präzipitinreaktion als Unterscheidungsmittel für Eiweiß. Münchener med. Wochenschr. 1902 und Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 5.

Ders., Zur Kenntnis der Präzipitine. Würzburg 1902. Huberts Verlag.

Ders., Über Albumosen- und Peptonpräzipitine. Phys.-med. Gesellschaft Würzburg 1902.

Ders., Die Serumdiagnostik. Würzburger Abhandl. aus dem Gesamtgebiet der prakt. Medizin 1903.

Ders., Über die Bindung von Präzipitin und Eiweiß im Tierkörper. Salkowski Festschrift.

*RUPPIN, Zum Nachweis von Pferdefleisch. Zeitschr. für Untersuchung der Nahrungsmittel 1902, Nr. 8.

*RUSCHE, W., Kann Pferdefleisch durch die quantitative Glykogenanalyse mit Sicherheit nachgewiesen werden? Inaug.-Diss. Ref. in der Zeitschr. für Fleisch- und Milchhygiene 1907, Heft 7.

SACHS und BAUER, Über die Differenzierung des Eiweißes in Gemischen verschiedener Eiweißarten. Arbeiten aus dem Kgl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. 1907, Heft 3.

SACHS, H., Über die komplementablenkende Funktion des normalen Serums. Centralbl. für Bakt. etc., Orig., Bd. XL, pag. 388.

Ders., Über das Zusammenwirken normaler und immunisatorisch erzeugter Amhozeptoren bei der Hämolyse. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 18.

Ders., Diskussionsbemerkung zu dem Vortrage von WEIDANZ: Über die Konservierung präzipitierender Sera. 2. Tagung der Freien Vereinigung für Mikroblologie in Berlin 1908. Centralbl. für Bakt. usw. 1. Abt. Referate. Bd. XLII. Beiheft 1908.

SACCONACHI, Über die Präzipitine der Verdauungsprodukte. Zeitschr. für klin. Med. 1903, Bd. LI, Heft 3 und 4.

SANGER, Biolog. test for blood from its medico legal aspect Thesis.

SCHLOSSMANN, Zeitschr. für phys. Chemie 1896, Bd. XXII, pag. 197.

SCHLOSSMANN und MORO, Zur Kenntnis der Arteigenheit der verschiedenen Eiweißkörper in der Milch. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 14.

*SCHMIDT, W. A., Untersuchung über die Erzeugung hochwertiger Muskeleiweiß-Antisera für die Fleischdifferenzierung. Biochemische Zeitschr. 1907, Bd. V, Heft 5 und 6.

Ders., Chemische und biologische Untersuchungen von ägyptischen Mumienmaterial nebst Betrachtungen über das Einbalsamierungsverfahren der alten Ägypter. Zeischr. für allgem. Physiol. 1907, Bd. VII, Heft 2 u. 3.

Ders., On the application of the serum precipitin test in meat examination. Cairo Scientific Journal. Vol. II, Nr. 18, March 1908.

SCHMORL, Pathologisch-histologische Untersuchungsmethoden. Leipzig 1901. 2. Aufl.

Schulz, A., Zum Kapitel des biologischen Blutnachweises. Zeitschr. für Med.-Beamte 1902, Nr. 18.

Ders., Über quantitativen Blutnachweis. Vierteljahrsschr. für gerichtl. Med. 1905, Heft 1.

Ders., Die Technik quantitativer Eiweißbestimmung mit Hilfe der Präzipitinreaktion. Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel 1906, Bd. XII, Heft 5.

Schulz, Werner, Über Isohämolysine und Hämagglutinine beim Kaninchen. Deutsches Archiv für klin. Med. 1905, Bd. LXXXIV.

Schur, Über die praktische Verwertbarkeit der spezifischen Präzipitation. Kolle u. Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen 1904, Bd. IV, pag. 630—639.

Schütze, Über ein biologisches Verfahren zur Differenzierung der Eiweißstoffe verschiedener Milcharten. Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. XXXVI.

Ders., Weitere Beiträge zum Nachweis verschiedener Eiweißarten auf biologischem Wege. Ebenda 1901, Bd. XXXVIII.

Ders., Experimenteller Beitrag zur Wassermannschen Serodiagnostik bei Lues. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 5 und 1906, Nr. 7. — Mediz. Klinik 1906, Nr. 18.

*Ders., Über die Anwendung der Ablenkung hämolytischer Komplemente zum Nachweis von Pferdefleisch. Med. Klinik 1906, Nr. 18.

Ders., Über Antilaktoserum (Antipräzipitine). Vereinsbl. der Deutschen med. Wochenschrift 1902, Nr. 1.

Ders., Festschrift für v. Leyden 1902: „Zur Kenntnis der Präzipitine".

Ders., Über weitere Anwendung der Präzipitine. Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 45.

Ders., Über die Unterscheidung von Menschen- und Tierknochen. Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 4.

Ders., Über den forensischen Wert des Neisser-Sachsschen Verfahrens der Komplementablenkung. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 52.

Schwabe, Beitrag zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Wassermann-Schütze-Uhlenhuthschen Serumprobe auf Menschenblut. Zeitschr. für Med.-Beamte 1902, Nr. 6.

Sick, Über die Herkunft und Wirkungsweise der Hämagglutinine. Deutsches Arch. für klin. Med. 1904, Bd. LXXX.

Sieradzki, Przeglad lekarski 1901, Nr. 25 u. 26. Ref. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 28.

Sion und Laptes, Die hygienische Differenzierung der Marktmilch und deren Derivate auf biologischem Wege. Zeitschr. für Fleisch- und Milchhygiene 1902, 13. Jahrg., Heft 1 u. 2.

Strassmann, Lehrbuch der gerichtlichen Medizin 1895.

Stern, Über den Nachweis des menschlichen Blutes durch ein Antiserum. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 9.

Stockis, Ann. de la Soc. médico-chirurg. de Liège 1901. Mai.

Stoenescu, La différenciation du sang par le sérum spécifique. Ann. d'hygiène et de méd. lég. 1902. Sept.

Strassmann, Schulz und Marx, Bericht über das Neisser-Sachssche Verfahren zur forensischen Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Klin. Jahrbuch 1908, Bd. XIX.

Strauch, Der serodiagnostische Nachweis von Menschenblut vor Gericht. Vortrag auf der 77. Naturforscher-Versammlung in Meran. Ärztl. Sachverst.-Ztg. 1905, Nr. 21.

Strube, Beitrag zum Nachweis von Blut und Eiweiß auf biologischem Wege. Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 24.

Tarchetti, Di un nuovo metodo par differenziare il sangue umano. Gaz. degli ospedali 1901, Nr. 60.

Tchistovitch, Études sur l'immunisation contre le sérum d'anguille. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII, pag. 406.

Uhlenhuth, P., Neuer Beitrag zum spezifischen Nachweis von Eiweiß auf biologischem Wege. Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 46. 15. November.

Ders., Vortrag im Greifswalder med. Verein. 1. Dezember 1900. Ref. Münchener med. Wochenschr. 1901, Nr. 8.

UHLENHUTH, P., Eine Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Blutarten, im besonderen zum differential-diagnostischen Nachweis des Menschenblutes. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 6. 7 Februar.

Ders., Vortrag im Greifswalder med. Verein. März 1901. Ref. Münchener med. Wochenschr. 1901, Nr. 14.

Ders., Über eine neue forensische Methode zum Nachweis von Menschenblut. Archiv für Kriminalanthropologie und Kriminalistik 1901.

Ders., Weitere Mitteilungen über meine Methode zum Nachweis von Menschenblut. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 17.

Ders., Vortrag im naturwissenschaftlichen Verein für Neuvorpommern und Rügen. Juni 1901. Ref. Verhandl. des naturwissensch. Vereins 1901.

Ders., Weitere Mitteilungen über die praktische Anwendung meiner forensischen Methode zum Nachweis von Menschen- und Tierblut. Deutsche med. Wochenschrift 1901, Nr. 30.

Ders., Neue Ergebnisse meiner weiteren Untersuchungen über die Unterscheidung der verschiedenen Blutarten. Vortrag im Greifswalder med. Verein. Juli 1902. Ref. Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 37.

*Ders., Die Unterscheidung des Fleisches verschiedener Tiere mit Hilfe spezieller Sera und die praktische Anwendung der Methode in der Fleischbeschau. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 45.

Ders., Bemerkungen zu dem Aufsatz von KRATTER: Über den forensischen Wert der biologischen Methode zur Unterscheidung von Tier- und Menschenblut. Archiv für Kriminalanthropologe und Kriminalistik, Bd. X.

Ders., Praktische Ergebnisse der forensischen Sero-Diagnostik des Blutes. Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 37 u. 38.

Ders., Zur historischen Entwicklung meines forensischen Verfahrens zum Nachweis von Blut und Fleisch mit Hilfe spezifischer Sera. Deutsche tierärztliche Wochenschr. 1903, Nr. 16. 11. Jahrgang und tierärztliche Wochenschr. 1903, Nr. 25.

UHLENHUTH und BEUMER, Praktische Anleitung zur gerichtsärztlichen Blutuntersuchung mittels der biologischen Methode. Zeitschr. für Med.-Beamte 1903, Nr. 5 und 6.

UHLENHUTH, Vortrag im Greifswalder med. Verein. Dezember 1902. (Ref.) a) Demonstration der Laktoserumreaktion. — b) Demonstration eines Dotterantiserum. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 4 und Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 5.

Ders., Ein neuer biologischer Beweis für die Blutsverwandtschaft zwischen Menschen- und Affengeschlecht. Vortrag, gehalten auf der 35. Versammlung der deutschen anthropologischen Gesellschaft in Greifswald. 3. bis 6. August 1904. Korrespondenzbl. der deutschen anthropologischen Gesellschaft 1904, Nr. 10. Die Umschau 1904, Nr. 39.

Ders., Präzipitine, Eulenburgs encyklopädische Jahrbücher der gesamten Heilkunde. Neue Folge 1904, Bd. II.

Ders., Zur Lehre von der Unterscheidung verschiedener Eiweißarten mit Hilfe spezifischer Sera. Festschrift für Robert Koch. (60. Geburtstag. 11. Dezember 1903.)

Ders., Diskussion zu dem Vortrage von MINOVICI: Über Blutdifferenzierung vom gerichtlichen Standpunkt. Verh. des V. intern. Kongr. f. angew. Chemie. Berlin 1903.

Ders., Der forensische Blutnachweis. Vortrag gehalten auf der 76. Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte zu Breslau 1904.

Ders., Der forensische Blutnachweis. Fortschritte der Med. 1904, Nr. 3.

Ders., Der forensische Blutnachweis. Wiener med. Wochenschr. 1904, Nr. 43 u. 44.

Ders., Über die Bestimmung der Herkunft von Mumienmaterial mit Hilfe spezifischer Sera. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 6.

Ders., Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen- und Tierblut etc. G. Fischer. Jena 1905.

Ders., Fine Methode zur Unterscheidung nahe verwandter Blutarten. Verhandl. der 77. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Meran 1905.

Ders., Über den Stand der forensischen Bluntuntersuchung. Mediz. Klinik 1905, Nr. 22.

Ders., Über die Verwertbarkeit der Komplementablenkung für die forensische Praxis und die Differenzierung verwandter Blut- und Eiweißarten. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XXXVIII. Referat.

Ders., Komplementablenkung und Bluteiweißdifferenzierung. Deutsche med. Wochenschrift 1906, Nr. 31.

Ders., Komplementablenkung und Bluteiweißdifferenzierung, Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 51.

Ders., Verhandl. des XV. internat. med. Kongresses, Lissabon 1906 (April).

Uhlenhuth, Der biologische Nachweis der verschiedenen Blutarten und die Blutsverwandtschaft unter den Tieren. Vortr. in der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde. Februar 1907. (Verhandl. der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde.)

Ders., Über die Entwicklung und den jetzigen Stand der biologischen Blutdifferenzierung. Beiheft zur Med. Klinik 1907, Heft 9.

Ders., Diskussionsbemerkung zu dem Vortrage von Weidanz: Über die Konservierung präzipitierender Sera. 2. Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie in Berlin 1908. Centralbl. für Bakt. 1. Abt. Referate. Bd. XLII. Beiheft 1908.

*Uhlenhuth, Weidanz u. Wedemann, Über Technik und Methodik des biologischen Verfahrens zum Nachweis von Pferdefleisch. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1908, Bd. XXVIII, Heft 3.

Uhlenhuth, Weidanz u. Angeloff, Über den biologischen Nachweis der Herkunft von Blut in blutsaugenden Insekten. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitamte 1908, Bd. XXVIII, Heft 3.

Umber, Zur Chemie u. Biologie der Eiweißkörper. Berl. klin. Wochenschr. 1902, pag. 657.

Vallée und Nikolas, Les sérums précipitants. Bull. de la Soc. centr. de méd. vét. Tome XXI, pag. 293—297.

Vogel, Deutsches Archiv für klin. Med., Bd. LXXII, pag. 291.

Wassermann, A., Verhandl. d. Kongr. für innere Medizin. Wiesbaden 1900, pag. 501.

Ders., Hämolysine, Cytotoxine und Präzipitine. Samml. klin. Vorträge v. Volkmann. Verlag von Breitkopf & Härtel, Leipzig 1902.

Ders., Über Agglutinine u. Präzipitine. Zeitschr. für Hyg. u. Inf. 1902, Bd. LXII.

Ders., Über die biol. Mehrleistung des Organismus usw. Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 1.

Ders., Über das biol. Eiweißdifferenzierungsverfahren. Verhandl. d. V. intern. Kongresses für angew. Chemie. Berlin 1903. Bericht IV, pag. 123.

Ders., Anleitung für die Ausführung d. biol. Eiweißdifferenzierungsmethode.

Ders., Gibt es ein biol. Differenzierungsverfahren für Menschen- u. Tierblut mittelst der Präzipitine? Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 12.

Ders., Zeitschrift für Hygiene u. Infektionskrankheiten der Haustiere 1906, Bd. I.

Wassermann und Schütze, Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 30.

Dies., Über eine neue forens. Methode z. Untersuchung v. Menschen- u. Tierblut. Berliner klin. Wochenschr. 1901, Nr. 7. Phys. Gesellsch. Berlin. 8. Febr. 1901.

Dies., Über die Entwicklung d. biol. Methode zur Unterscheidung von menschl. u. tier. Eiweiß mittels Präzipitine. Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. 27.

Dies., Über d. Spezifität d. Eiweißpräzipitinsera u. deren Wertbemessung für die Praxis. Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 11.

Wegner, Monatschr für Unfallheilkunde 1902.

Weichardt, Recherches sur l'antispermatoxine. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Nr. 11, pag. 832.

Ders., Über die Syncytiotoxine. Hygienische Rundschau 1903, pag. 491.

Ders., Über den biol. Blutnachweis, Verhandl. d. V. intern. Kongresses für angew. Chemie Berlin 1903, Bericht IV, pag. 119.

Ders., Der Nachweis individueller Blutdifferenzen. Hygien. Rundschchau 1903, Nr. 15. Vierteljahrschr. für gerichtl. Med. usw. 1905.

Ders., Zur Frage des Nachweises individueller Blutdifferenzen. Vierteljahrsschr. für gerichtl. Medizin u. öffentl. Sanitätswesen, 3. Folge, Bd. XXIX, Heft 1.

*Weidanz u. Borchmann, Vergleichende Untersuchungen über die praktische Verwertbarkeit der Präzipitinreaktion und der Komplementbindungsmethode zum Nachweis von Pferdefleisch. Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1908, Bd. XXVIII, Heft 3.

*Weidanz, Die Anwendung des biologischen Verfahrens zum Nachweis von Pferdefleisch. Zeitschr. für Fleisch- und Milchhygiene 1907, 18. Jahrg., Heft. 3.

Ders., Zur Technik der sterilen Filtration. Centralbl. für Bakt. etc., Orig., 1908, Bd. XLVI, Heft 6.

Ders., Über die Konservierung präzipitierender Sera. Vortrag in der freien Vereinigung für Mikrobologie zu Berlin 1908 am 13. Juni und Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1908, Bd. XXIX, Heft 2.

Ders., Über den biologischen Nachweis der Herkunft von Blut in blutsaugenden Insekten. Demonstration a. d. freien Vereinigung für Mikrobiol. zu Berlin 1908. Centralbl. für Bakt. usw. 1. Abt. Referate. Bd. XLII. Beiheft 1908.

Ders., Zur Technik und Methodik der biologischen Eiweißdifferenzierung. Vortrag gehalten am 23. September 1908 auf der 80. Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte zu Köln.

WELSH und CHAPMAN, On the Main Source of Precipitable Substance and the Rôle of the Homologues Proteid in Precipitin Reaktions. Reprinted from the Proceedings of the Royal Society B. 1906, Vol. LXXVIII.
WELSH und CHAPMANN, Precipitin antisera and their standardisation. The journ. of Hyg. 1906, Tome VI, Nr. 3.
Dies., Precipitin reactions in relation to state medizine and the public health. Verlag W. F. Schmith, Bridge-Street. Sydney 1907.
Dies., A Note on Precipitins. Australasian Medical Gazette. Jan. 1906.
WHITNEY, Boston med. and surg. Journ. Nr. 146, pag. 429.
WHITTIER, American Med. Vol. III, pag. 96.
WILDE, Ref. Münchener med. Wochenschr. 1901, Nr. 51.
WOOD, The serum test for blood. Boston med. and surg. Journ. Nr. 145, pag. 533.
ZIEMKE, Zur Unterscheidung von Menschen- u. Tierblut mit Hilfe eines spez. Serums. Deutsche Med. Wochenschr. 1901, Nr. 26.
Ders., Weitere Mitteil. über die Unterscheidung von Menschen- u. Tierblut usw. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 42.
Ders., Über die ungleiche Resistenz d. Blutfarbstoffes verschiedener Tiere gegenüber Alkalien usw. Vierteljahrschr. für gerichtl. Med. usw. 1901, Nr. 22.
ZÜLZER, Zur Frage d. biol. Reaktion auf Eiweiß in Blut und Harn. Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 14.

XXXIII.

Über Bakterienpräzipitine.

Von

Dr. M. v. Eisler

in Wien.

I. Einleitung.

Nachdem durch Gruber und Durham das Phänomen der Agglutination bekannt geworden war, und kurz darauf diese Reaktion von Widal als wertvolles diagnostisches Hilfsmittel erkannt wurde, gelang es R. Kraus im Jahre 1897 zu zeigen, daß durch Injektion von Cholera-, Typhus- und Pestbakterien erzeugte Immunsera nicht nur die betreffenden Bakterienaufschwemmungen agglutinieren, sondern daß diese Sera auch imstande sind, in den Filtraten der betreffenden Kulturen, und zwar nur in den homologen Filtraten, zuerst eine Trübung und dann einen Niederschlag zu erzeugen. Diese Immunkörper wurden von Kraus wegen ihrer Eigenschaft, spezifische Niederschläge zu erzeugen, Präzipitine genannt.

Diese von Kraus entdeckte Reaktion, deren diagnostische Verwertbarkeit in einer späteren Arbeit von ihm nachgewiesen wurde, erlangte eine noch größere und allgemeinere Bedeutung dadurch, daß Bordet und Tschistowitsch auch mit Seris von Tieren, welche mit Blutserum und Milch vorbehandelt waren, in den zur Injektion verwendeten Flüssigkeiten dieselben spezifischen Niederschläge erzeugen konnten; ja selbst für eiweißartige Substanzen pflanzlichen Ursprungs konnte die Fähigkeit, Präzipitine zu bilden, nachgewiesen werden. Auf Grund der Versuche von Bordet und Tschistowitsch kamen dann später Uhlenhuth und Schuetze sowie Wassermann dazu, eine Methode zur Differenzierung tierischen Eiweißes anzugeben, welche heute in der forensischen Praxis bereits allgemeine Verbreitung gefunden hat, so daß die Bildung spezifischer Niederschläge auch eine große praktische Bedeutung erlangt hat.

Das von Kraus zuerst für Cholera, Typhus, Pest gefundene Phänomen wurde in den folgenden Jahren bei einer Reihe anderer Bakterien nachgewiesen und zugleich die Spezifizität der Reaktion bestätigt. In diesen von verschiedener Seite ausgeführten Untersuchungen wurden auch die

Bedingungen, unter denen die Reaktion sich vollzieht und die Natur der beiden aufeinander ragierenden Körper genauer studiert. Dabei zeige sich eine so weit gehende Analogie zwischen dem Vorgange der Agglutination und Präzipitation, daß von PALTAUF eine Identität dieser beiden Vorgänge angenommen wurde. Durch weitere Versuche von KRAUS und v. PIRQUET, ferner von WASSERMANN wurde die Theorie PALTAUFS über die Identität der beiden Vorgänge gestützt und wird wohl jetzt ziemlich allgemein angenommen. Ein Unterschied zwischen Agglutination und Präzipitation der Bakterien besteht nur insofern, als sich der erste Vorgang an den Bakterienleibern als solchen vollzieht und deren Ausflockung herbeiführt, während wir es bei der Präzipitation nur mehr mit den in Lösung übergegangenen Bakterienbestandteilen zu tun haben, die mit dem Präzipitin in der Weise reagieren, daß in der klaren Lösung eine Trübung resp. ein Niederschlag gebildet wird, was eben auch durch Ausfällung dieser gelösten Bestandteile bewirkt wird.

KRAUS und v. PIRQUET zeigten in ihren Versuchen, daß bei Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse, ein Umstand, der in den Untersuchungen von RADCZIEWSKY und BALL nicht genügend beachtet wurde, und daher diese Autoren zur Annahme einer Verschiedenheit von Agglutininen und Präzipitinen führte, auch Bakterienfiltrate Agglutinin binden, daher in diesen Filtraten eine agglutinable Substanz, die identisch mit der der Bakterien ist, enthalten sei. Auch WASSERMANN kommt auf Grund seiner in dieser Richtung angestellten Versuche dazu, Agglutination und Präzipitation für denselben Vorgang zu halten. Er machte die Beobachtung, daß nur bei genügendem reichlichem Zusatz von Kulturfiltrat zum Serum auch dessen Agglutinationskraft stark abnimmt oder verschwindet. Bei geringem Zusatz von Kulturfiltrat zum Serum bleibt dessen Agglutinintiter erhalten, da zur Agglutination offenbar weit geringere Mengen ausreichen als zur Präzipitation. Außer der Substanz, die bei der Agglutination innerhalb der Bakterienzellen gefällt wird, dürften in alten Kulturfiltraten noch andere Bestandteile der Bakterienleiber enthalten sein, so daß die früher erwähnte Substanz nur einen Teil des Präzipitats bildet. Auf diese Weise läßt sich auch die von E. P. PICK auf Grund chemischer Unterschiede angenommene Differenz zwischen Agglutininen und Präzipitinen erklären.

In den folgenden Abschnitten sollen die beiden Körper, durch deren Einwirkung aufeinander der spezifische Niederschlag, das Präzipitat entsteht, deren Gewinnung und Reindarstellung, der Verlauf und die Bedingungen zum Zustandekommen dieser Reaktion sowie auch ihre diagnostische Verwertbarkeit besprochen werden. Vorher sei nur noch angeführt, daß die beiden an der Reaktion beteiligten Körper von den einzelnen Autoren verschieden benannt wurden. Die zur Immunisierung verwendete, in den Bakterienleibern enthaltene Substanz, früher allgemein präzipitierbare Substanz, wurde von NICOLLE Substance agglutinable, von E. P. PICK Coagulin genannt. Sie wird von KRAUS als präzipitinogene Substanz bezeichnet. Der bei der Injektion des Präzipitinogens entstehende Immunkörper, die präzipitierende Substanz, wurde von NICOLLE Substance agglutinante genannt. Die von KRAUS gewählten Bezeichnungen sollen im folgenden beibehalten werden, schon aus dem von ihm angegebenen Grunde, um nämlich über die Rolle der beiden Körper bei der Reaktion nichts zu präjudizieren. Denn mit der Bezeichnung präzipitierende Substanz oder Substance agglutinante würde diesem Körper die aktive Rolle für das Zustandekommen des Niederschlags zugewiesen.

Auf Grund chemischer Untersuchungen des Präzipitats aber sowie des Umstandes, daß das Immunserum hauptsächlich den Niederschlag liefert, da der zweite Körper selbst in außerordentlich starken Verdünnungen noch einen Niederschlag erzeugt, ist man jetzt allgemein geneigt, gerade diesem Körper, dem Präzipitinogen, die aktive Rolle bei dem Vorgange der Präzipitation zuzuschreiben.

II. Präzipitinogen.

a) Gewinnung.

Um aus Bakterien jene Substanz zu gewinnen, welche die Eigenschaft besitzt, in den Tierkörper injiziert Präzipitin zu erzeugen und andererseits mit diesem Immunkörper typische Niederschläge zu liefern, kann man sich verschiedener Methoden bedienen. Das von Kraus zuerst gebrauchte Verfahren besteht darin, das Präzipitinogen aus älteren Bouillonkulturen, in denen ja ein großer Teil der Bakterienleiber zerfallen ist, zu gewinnen. Am besten läßt man Bouillonkulturen 1—2 Monate im Brutschrank bei 37 ° C stehen und schickt dann die Bouillon durch eines der gebräuchlichsten Bakterienfilter (Pukall, Berkefeldt, Reichelt). Wichtig ist es dabei, neue, wenigstens noch nicht ausgeglühte Filter zu verwenden, da bereits öfter gebrauchte Filter sehr große Mengen des Präzipitinogens zurückhalten, so daß man eventuell ganz unwirksame Filtrate erhält. Bei Beobachtung dieser Vorsichtsmaßregel kann man aus den Bouillonkulturen der meisten Bakterien, für die Präzipitation nachgewiesen wurde, wirksame Filtrate erhalten. Allerdings kommen auch Ausnahmen vor, welche an der betreffenden Stelle erwähnt werden sollen. Ferner hat Kraus Leiber von Cholerabakterien die aus Bouillon oder Agarkulturen gewonnen waren, mit Glassand vermengt und unter einem Druck von 300 Atmosphären ausgepreßt. Die gepreßte Masse würde dann mit Bouillon verdünnt und filtriert. Das Auspressen unter hohem Druck ist dabei überfüssig, denn Kraus konnte auch in folgender Weise Präzipitinogen aus den Bakterien gewinnen. Zweitägige Agarkulturen wurden abgeschabt, bei 37 ° C getrocknet, in schwach alkalischer Bouillon gelöst und filtriert.

Ein anderes von E. Pick angegebenes einfaches Verfahren, das Präzipitinogen aus den Bakterien zu gewinnen, besteht darin, diese mit Kochsalz zu extrahieren, ein Verfahren, welches rasch zum Ziele führt und sich daher dann empfehlen dürfte, wenn man keine älteren Bouillonkulturen zur Verfügung hat und nicht so lange warten will. Zur Gewinnung derartiger Kochsalzagarfiltrate legt man Kulturen auf Agar in größerer Menge an — zu diesem Zwecke eignen sie entweder die Kolleschen Doppelschalen oder auch größere rechteckige Flaschen, deren eine Fläche mit Agar beschickt ist — und läßt sie 24—48 Stunden bei Bruttemperatur wachsen. Hierauf werden die Bakterienrasen mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült und einige Stunden eventuell bis zum nächsten Tage noch im Brutschrank gehalten. Um eine größere Menge gelöster Bakterienbestandteile in die Kochsalzlösung zu bekommen, kann man sich mit Vorteil eines Schüttelapparates bedienen, ferner statt der physiologischen Kochsalzlösung destilliertes Wasser zur Extraktion verwenden. Zur Entfernung der Bakterien werden die Extrakte durch Bakterienfilter geschickt.

Ganz einfach, und ohne Bakterienfilter zu verwenden, gelingt es häufig auf folgende Weise das Präzipitinogen zu erhalten. Man schwemmt den Inhalt eines Agarröhrchens in ca. 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung auf und macht diese Aufschwemmung schwach sauer oder alkalisch (auf 10 ccm Aufschwemmung 2—3 ccm $^1/_4$ Normalsalzsäure oder $^1/_4$ Normalnatronlauge) und kocht hierauf durch 15—20 Minuten. Bei diesem Prozeß geht ein Teil der Bakterienleiber in Lösung, da das Eiweiß hydrolysiert wird. Nach dem Kochen wird neuralisiert, wobei sich ein Niederschlag bildet. Dieser wird abfiltriert, zu welchem Zwecke ein gewöhnliches Papierfilter genügt. Die durch Filtration erhaltene klare Flüssigkeit enthält Präzipitinogen.

Es gelingt also auf verschiedene Weise, das Präzipitinogen aus Bakterien zu gewinnen. Das Wesentliche dabei ist, daß Bestandteile der Bakterienleiber in Lösung gehen. Bei Aufbewahrung solcher Präzipitinogen enthaltender Flüssigkeiten ist darauf zu achten, daß dieselben vor Licht und Wärme geschützt sind, da unter deren Einfluß das Präzipitinogen soweit verändert werden kann, daß es seine Fällbarkeit verliert. Dagegen kann man diese Filtrate behufs Erhaltung ihrer Sterilität, ohne eine Schädigung fürchten zu müssen, mit Karbol versetzen, so daß der Gehalt an Karbolsäure 0,5 % beträgt.

Je nach der Art der Gewinnung, Bouillonfiltrate oder Kochsalzagarfiltrate, lassen sich im allgemeinen auch zwei verschiedene Präzipitinogene unterscheiden, und zwar ein thermostabiles, welches Erwärmen auf 62° ohne Einbuße seiner Fällbarkeit verträgt, in den Bouillonfiltraten, und ein thermolabiles, das durch Erwärmen auf 62° unkoagulierbar wird, in den Kochsalzagarfiltraten. Das thermostabile Präzipitinogen aus Bouillonfiltraten zeichnet sich außerdem durch seine Alkoholfällbarkeit aus, während das thermolabile Präzipitinogen der Kochsalzagarextrakte zum großen Teil in Alkohol löslich ist. Diese charakteristischen Merkmale der beiden Präzipitinogene sind aber nicht ganz konstant, da sich in den diesbezüglichen Untersuchungen von Kraus und Joachim gezeigt hat, daß sowohl betreffs des Verhaltens gegen Erwärmen als auch gegen Alkohol Ausnahmen von dem oben beschriebenen Verhalten vorkommen, indem die beiden Autoren auch in manchen Kochsalzfiltraten thermostabiles und durch Alkohol fällbares Präzipitinogen und umgekehrt in Bouillonfiltraten nicht hitzebeständiges Präzipitinogen fanden.

b) Reindarstellung und Eigenschaften.

Für die Reindarstellung dieser beiden Präzipitinogene hat E. Pick folgendes Verfahren benützt. Die alkoholfällbare Substanz der Bouillonfiltrate wird in der Weise erhalten, daß man eine bestimmte Menge des Filtrates mit dem 6fachen Volumen 95 %igen Alkohol versetzt. Der durch den Alkohol erzeugte Niederschlag wird abfiltriert, gut abgepreßt und bei Zimmertemperatua getrocknet. Die so erhaltene braungelbe Substanz ist wasserlöslich und es wird die wässerige Lösung derselben mit festem Ammonsulfat bis zur Sättigung versetzt. Der vorhandene Niederschlag wird abfiltrirt wieder in Wasser gelöst und ausgesalzen, der Niederschlag der zweiten Füllung auf dem Filter mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und nach Abpressen in Wasser gelöst. Von dem überschüssigen Ammonsulfat wird diese wässerige Lösung durch wiederholten fraktionierten Zusatz von 95 %igen Alkohol befreit und dann durch einen großen Überschuß von Alkohol ein sich in klebrig schleimigen Massen absondernder Körper gefällt, der das gereinigte alkoholfällbare Präzipiti-

nogen, von Pick Koagulin A genannt, darstellt. Das andere Präzipitinogen, nach Pick Koagulin K, das alkohollöslich ist, wird aus der Kochsalzaufschwemmung von Agarkulturen mit einem Überschuß von Bleizucker gefällt. Befufs weiterer Reinigung wird der Niederschlag solange mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat keine Biuretreaktion mehr gibt. Der so gewaschene Niederschlag wird mit schwacher Sodalösung digeriert, wobei der größte Teil desselben in Lösung geht; der ungelöst bleibende Anteil wird abfiltriert und die opaleszente Lösung gegen Wasser dialysiert. Dabei bleibt die wirksame Substanz zum größten Teile im Dialysierschlauch zurück.

Diese beiden Präzipitinogene sind, nach den eben beschriebenen Methoden rein dargestellt, hohen Temperaturen gegenüber sehr resistent. Beide Substanzen vertragen 5—10 Minuten langes Kochen über freier Flamme, ohne etwas von ihrer Wirksamkeit zu verlieren. Auch Fäulnis oder Einwirkung von Alkohol und Äther schädigt diese Substanzen nicht oder nur sehr wenig. Ferner konnte Pick konstatieren, daß auch eine mehrere Wochen währende Verdauung durch Pepsinsalzsäure oder Trypsinsodalösung die Wirksamkeit dieser Präzipitinogene nicht herabsetzte. Schon aus diesen Versuchen geht hervor, daß diese beiden Substanzten nur in sehr entferntem Zusammenhang mit Eiweißkörpern stehen können, respektive nur ziemlich niedere Spaltungsprodukte derselben sein können. So gibt das von Pick aus Bouillonfiltraten rein dargestellte Präzipitinogen keine Biuretreaktion mehr, allerdings aber noch die nach Millon. Eine noch geringere Verwandtschaft zu den Eiweißkörpern zeigte ein Präzipitinogen, das von Pick durch Extraktion mittels Kochsalzlösung aus 3 tägigen Typhusagarkulturen dargestellt hatte. Diese Substanz gab weder Biuretreaktion noch auch die nach Millon und Molisch. Wegen dieser hohen Resistenz des Bakterienpräzipitinogens verglich Pick dasselbe mit Körpern, die, als Vorstufen der labilen Fermente, ebenfalls hohe Resistenz besitzen.

Näheres über die chemische Natur dieser Körper läßt sich derzeit, sowie bei den andern Immunkörpern, nicht aussagen. Die von Nicolle gefundene Löslichkeit der präzipitinogenen Substanz in Alkohol-Äther und die diesem Befunde widersprechende Angabe von Winterberg lassen sich ungezwungen mit der von Pick gefundenen, von Kraus und Joachim bestätigten Tatsache des Vorhandenseins zweier in bezug auf Alkohollöslichkeit verschiedener Präzipitine erklären.

Eine andere Methode, um die Agglutinin respektive Präziptin erzeugende Substanz aus Bakterien rein darzustellen, wurde von Brieger angegeben. Allerdings haftet dieser Methode nach Kraus und Joachim der Nachteil an, daß die Koagulabilität des nach ihr dargestellten Präzipitinogens vermindert oder zuweilen ganz aufgehoben ist. Briegers Versuche wurden mit Typhusbakterien gemacht. Er verwendet reinstes krystallinisches Ammonsulfat in Substanz, welches, da es seiner sauren Reaktion wegen für den vorliegenden Zweck unbrauchbar ist, durch tropfenweisen Zusatz einer äußerst verdünnten Lösung von Ammoniumkarbonat unter fortwährendem Schütteln soweit abgestumpft wird, daß das Magma schwach aber deutlich alkalisch reagiert und ein leichter Ammoniakgeruch bemerkbar ist. Darauf gießt man die von der Oberfläche einer 3—4 tägigen Agarkultur abgekratzten und mit Aqua dest. abgespülten möglichst virulenten Typhusbakterien. Dieses Gemenge wird einigemal kräftig geschüttelt, wobei der leichte Ammoniakgeruch verschwindet. Ein Teil des Ammonsulfats muß ungelöst bleiben, die Typhus-

bakterien ballen sich dann zusammen. Nach ruhigem 1—4 tägigem Stehen im dunklen nicht erwärmten Raume werden die Bakterien abfiltriert, wobei das Hineingeraten von Salzteilchen zu vermeiden ist. Der zwischen Filtrierpapier gut abgepreßte Niederschlag wird in Wasser, dem einige Tropfen sehr verdünnter Natronlauge zugesetzt werden, suspendiert und dann im Schüttelapparat eine halbe Stunde geschüttelt. Die früher zusammengeballten Bakterien verteilen sich dabei gleichmäßig in der Flüssigkeit, wobei die Reaktion häufig sauer wird. Man muß aber darauf achten, daß die Reaktion alkalisch bleibt, weil bei saurer Reaktion das aktive Präzipitinogen leicht zerstört wird. Hierauf werden die Bakterien abfiltriert und die restierende gelbe Flüssigkeit wird zweimal durch Pukallfilter geschickt. Die filtrierte Flüssigkeit gibt, Tieren injiziert, Agglutinine und Präzipitine, wenn auch schwächere als die Bakterien selbst, weil in den Bakterien nach dieser Behandlung noch Agglutinin und Präzipitin bildende Substanz zurückbleibt. Durch Immunisierung von Kaninchen mit diesem Filtrate konnte SCHUETZE ein Serum gewinnen, das Typhusbakterien bis zur Verdünnung 1:1200 agglutinierte und das in dem Filtrate innerhalb einer halben Stunde bei 37° C ein deutliches Präzipitat lieferte. Das von BRIEGER dargestellte Agglutinogen resp. Präzipitinogen gibt die MILLONsche Reaktion, läßt sich mit Ammonsulfat aussalzen, ist leicht löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol. Wie bereits erwähnt, hatte BRIEGER gefunden, daß bei dem eben geschilderten Verfahren ein beträchtlicher Teil der Agglutinin und Präzipitin bildenden Substanz in den Bakterienleibern zurückbleibt. In einer späteren Arbeit mit MAYER gelang es ihm, durch eine Modifikation seines ersten Verfahrens eine weit bessere Ausbeute des Agglutinogens aus den Bakterien zu erreichen. Die nach diesem modifizierten Verfahren gewonnene Flüssigkeit enthielt Agglutinogen, aber kein Präzipitinogen. Die Verfasser erklären dieses Verhalten damit, daß zur Präzipitation größere Mengen Immunkörper nötig sind als zur Agglutination (WASSERMANN) oder daß die starke Verdünnung der Substanz im Wasser die Ursache sei.

Flüssigkeiten, welche das Präzipitinogen nur in starker Verdünnung enthalten, kann man konzentrieren, indem man dieselben im Vacuum einengt. Da man dieses Einengen bei verhältnismäßig niederer Temperatur vornehmen kann, wird die Koagulabilität des Präzipitinogens nicht geschädigt. Statt des Einengens im Vacuum kann man auch die wirksame Substanz durch Sättigung mit Ammonsulfat aussalzen und den gut abgepreßten Niederschlag in einem geeigneten Volumen Wasser lösen.

Da KRAUS und JOACHIM in ihren Versuchen nachweisen konnten, daß das Bakterienpräzipitinogen durch Erhitzen seine Koagulierbarkeit verliert, seine Bindungsfähigkeit für das Präzipitin aber behält, so nahmen sie auch für diese Substanz eine thermolabile fällbare Gruppe und eine resistente bindende an und nannten das nicht mehr fällbare Präzipitinogen Präzipitoid der präzipitinogenen Substanz. In neueren Untersuchungen von PORGES zeigte sich, daß das Agglutinogen der Bakterien durch Erhitzen auf 60—70° derartige Zustandsänderungen erleidet, daß es seine Fällbarkeit einbüßt, was er auf die Bildung eines Hemmungskörpers (Nuklein, das durch Erhitzen aus dem Nukleoproteid entsteht) zurückführt. Durch weiteres Erhitzen bis auf 100° werden die Bakterien wieder fällbar. PORGES sieht das Wesentliche bei der Agglutination und Präzipitation in der Bindung der Immunkörper, während die Ausflockung einen davon unabhängigen, durch verschiedene sekundäre Umstände beeinflußbaren Vorgang darstellt. Durch Erhitzen in der beschriebenen

Weise modifiziertes Präzipitinogen wäre also als das Präzipitoid der präzipitinogenen Substanz anzusprechen.

III. Präzipitin.

a) Erzeugung und Vorkommen.

Die Eigenschaft des Tierkörpers, auf die Einführung gewisser Substanzen mit der Bildung spezifischer Immunkörper zu reagieren, führt auch zur Bildung des Präzipitins. Die Einverleibung von Präzipitinogen in den tierischen Organismus zur Erzeugung von Präzipitin kann sowohl in Form von Filtraten (Bouillon oder Kochsalzagarfiltraten) als auch in Form lebender oder abgetöteter Bakterien geschehen. Selbstverständlich gelingt es auch mit dem nach der Methode von Pick oder Brieger dargestellten Präzipitinogen zu immunisieren. Diese Versuche haben aber wohl nur theoretisches Interesse. Für praktische Zwecke wird man, um ein präzipitierendes Serum zu gewinnen, die Injektion von Bakterien als das einfachste und bequemste Mittel benützen. Zur Injektion kann man sowohl Bouillon als auch Agarkulturen verwenden. Die Bouillonkulturen werden als solche injiziert, von Agarkulturen bereitet man sich eine Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung, indem man in ein Agarröhrchen 5—10 ccm Kochsalzlösung gibt und die Oberfläche des Agars mit einem Spatel abschabt. Vorteilhafter ist es, statt der Bouillonkulturen Aufschwemmungen von Agarkulturen zu verwenden, weil dabei eine genauere Dosierung des Impfmaterials möglich ist. Es empfiehlt sich statt lebender Kulturen solche, die durch einstündiges Erhitzen auf 60° abgetötet sind, zu verwenden, da dadurch eine Vermehrung der eingebrachten Bakterien verhindert wird und der Eingriff von den Tieren leichter ertragen wird. Die Injektion erfolgt entweder subkutan oder intraperitoneal, oder intravenös. Die subkutane Applikation ist für die Tiere am schonendsten. Infiltrate oder Abszesse sind, wenn man steril arbeitet, nicht zu befürchten. Zur Gewinnung agglutinierender und präzipitierender Sera kommen hauptsächlich Kaninchen, von größeren Tieren Ziegen und Pferde in Betracht. Für subkutane Injektionen wählt man bei Kaninchen und Ziegen am besten die Rückenhaut, bei Pferden gewöhnlich die Gegend des Halses. Natürlich muß die betreffende Hautstelle vor der Injektion rasiert und desinfiziert werden. Bei Kaninchen injiziert man 5—10 ccm Bouillonkultur oder Kochsalzagaraufschwemmungen und wiederholt die Injektion nach 4—8 Tagen. Gewöhnlich genügen schon 3—4 Injektionen, um ein brauchbares Serum zu erhalten. Bei größeren Tieren (Ziege, Pferd) müssen natürlich entsprechend größere Mengen injiziert werden. Bei Kaninchen kann man die Bakterien auch intraperitoneal oder intravenös einbringen. In diesem Falle injiziert man kleinere Mengen, bei intravenöser Injektion z. B. einen Kubikzentimeter einer Kochsalzaufschwemmung. Durch die intravenöse Injektion kann man recht hochwertige Sera erhalten, doch unterliegt die Bildung von Präzipitinen ebenso wie die der anderen Antikörper nicht unbeträchtlichen Schwankungen, die zum großen Teile von der Individualität der betreffenden Tiere abhängig sind. Wenn die Tiere eine genügende Anzahl von Injektionen erhalten haben, wovon man sich durch einen Probeaderlaß überzeugen kann, entnimmt man 8—10 Tage nach der letzten Injektion dem Tiere Blut, denn um diese Zeit hat der Präzipitingehalt des Serums seinen Höhepunkt erreicht. Derselbe bleibt noch kurze Zeit auf derselben Höhe und fällt dann in der nächsten Zeit

mehr oder weniger rasch wieder ab, ebenso wie man es auch bei den anderen Antikörpern beobachtet. Im allgemeinen scheint es zur Erzeugung von Präzipitinen einer längeren Immuniserung zu bedürfen als zur Gewinnung von Agglutininen, das ja auch mit der Anschauung von Wassermann übereinstimmt, daß zur Erzeugung von Präzipitaten weit größere Mengen von Immunkörpern notwendig seien als zur Agglutination. Im Übrigen unterscheidet sich nach Belajeff ein präzipitierendes Serum weder in bezug auf spezifisches Gewicht, Gefrierpunkt, Brechungskoeffizienten noch auf Alkaleszenz von einem Normalserum. Die Fähigkeit der Präzipitation ist also im Serum nicht mit einer Veränderung der gewöhnlichen physikalischen Eigenschaften verbunden.

Um präzipitierendes Serum für nicht allzulange Zeit aufzubewahren genügt es, dasselbe in der Kälte (Eisschrank) und vor Licht geschützt stehen zu lassen. Nach einiger Zeit nimmt allerdings das Serum an Wirksamkeit ab. Wenn man es also für längere Zeit unverändert aufbewahren will, muß man es trocknen und zwar bei Temperaturen, welche die Eiweißkörper nicht schädigen, also bis 36°. Man kann entweder im Vacuum trocknen, oder in ganz einfacher Weise so, daß man das Serum in dünner Schicht in Glasschalen in den Brutschrank stellt und eintrocknen läßt, was nicht mehr als 24 Stunden erfordert. Allerdings gibt das auf diese Weise getrocknete Serum bei der Auflösung im Wasser keine ganz klare Flüssigkeit mehr, sondern bewirkte eine oft ziemlich beträchtliche Opaleszenz der Losung. Um diese bei der Ausführung der Reaktion unangenehme Erscheinung zu vermeiden, ist es besser, das Serum auf Papier zu trocknen, weil sich solches Serum leicht und ohne Trübung löst. Getrocknetes Serum kann man, vor dem Einflusse von Licht und Feuchtigkeit geschützt lange Zeit aufbewahren, ohne eine Einbuße seiner Wirksamkeit befürchten zu müssen.

Präzipitine für Bakterien, wen nauch nur in geringer Menge, kommen jedenfalls auch im normalen Serum vor. Das Vorhandensein von Agglutininen im Normalserum ist ja nachgewiesen. Der Vorgang der Präzipitation mit Bakterien und normalem Serum läßt sich aber nicht so leicht feststellen, wegen der geringen Mengen von normalen Bakterienpräcipitinen.

Außerdem ist zum Eintreten auch Präzipitinogen in reichlicher Menge nötig. Besonders Rinderserum besitzt die Fähigkeit in konzentrierten Bakterienextrakten (Typhus, Cholera) Niederschläge zu erzeugen. Bail und Weil haben zuerst auf diese Eigenschaft des normalen Rinderserums aufmerksam gemacht. Außer mit Rinderserum konnte Hocke auch mit normalem Blutserum vom Schafe, Schweine und Pferde, nicht aber vom Kaninchen, Meerschweinchen und der Ratte in Typhus- und Choleraextrakten Fällungen erzeugen. In eigenen Versuchen konnte ich weder mit Bouillonfiltraten, noch mit wässerigen Extrakten aus Agarkulturen, welche durch Berkefeldkerzen geschickt waren, selbst bei Verwendung eingeengter Lösungen positive Reaktionen erzielen. Noris erhielt in Bouillonfiltraten weder mit normalem Kaninchen- noch Rinderserum Fällungen. Auch Bail und Hocke geben an, daß sie in Bouillonfiltraten niemals Fällungen erhalten haben und daß ihre Extrakte nach Filtration durch Berkefeldkerzen entweder ganz unwirksam geworden oder mindestens sehr abgeschwächt waren. Die beiden Autoren haben zur Gewinnung brauchbarer Extrakte die Kulturmassen einer Kolleschen Schale mit 5—15 ccm Wasser oder Kochsalzlösung abgespült und die Aufschwemmung 1—4 Stunden auf 45—60° C im Wasserbade erwärmt. Um mög-

lichst viel Bakterienbestandteile in Lösung zu bekommen, wurde die Bakterienaufschwemmung nach der Erwärmung 24 Stunden lang geschüttelt. Noch reichlicher war die Ausbeute, wenn das Schütteln zwei bis drei Tage lang fortgesetzt wurde. Zur Vermeidung von Verunreinigungen kann man einige Tropfen Toluol zusetzen. Mit solchen Extrakten wurden reichliche Fällungen erzielt, welche sich in ihrem Aussehen nicht von den durch Immunserum erzeugten unterscheiden. Die auf die erwähnte Weise hergestellten Extrakte vertragen vierstündiges Erwärmen auf 60° und einstündiges auf 70—80° ohne Schädigung ihrer Fällbarkeit, dagegen nimmt diese mit zunehmendem Alter ab und zwar in ganz unregelmäßiger Weise. Das Präzipitin im normalen Rinderserum verhält sich so, wie ein Immunpräzipitin bezüglich der Abschwächung durch höhere Temperatur und längeres Aufbewahren. Auf 62° C erhitztes Rinderserum hemmt die Präzipitation durch frisches normales Rinderserum. Bail und Hocke sind geneigt, die Fällung der Typhus- und Choleraextrakte durch Normalserum als nicht spezifisch anzusehen, weil z. B. Rinderserum nach Versetzen mit Typhusextrakt auch seine fällende Eigenschaft für Cholera verloren hat oder wenigstens eine beträchtliche Abschwächung erfahren hat. Genaue quantitative Versuche dürften aber vielleicht doch zu einer Differenzierung führen.

Günstiger liegen die Verhältnisse für Zoopräzipitine, deren Vorhandensein im normalen Serum von Kraus und auch von Jacoby nachgewiesen wurde. Auch bei allen Infektionskrankheiten, bei denen Agglutinine im Organismus gebildet werden, dürfte es in gleicher Weise auch zur Produktion von Präzipitinen für die betreffenden Bakterien kommen, nur ist eben der Nachweis derselben, wie bereits angeführt wurde, nicht so leicht wie für die Agglutinine. Trotzdem konnte Wladimiroff bei rotzkranken Pferden spezifische Präzipitine nachweisen, die im Serum normaler Pferde nicht vorhanden sind und beim Typhus abdominalis sollen nach einer Angabe von Fickfr ebenfalls Präzipitine entstehen.

Über die Bildungsstätte der Präzipitine läßt sich derzeit noch kein sicheres Urteil äußern. Die bisher am meisten verbreitete Anschauung nimmt an, daß die Leukocyten die Präzipitine erzeugen, wofür namentlich Versuche von Kraus und Levaditi zu sprechen scheinen. In letzter Zeit haben Kraus und Schiffmann Versuche mitgeteilt, auf Grund deren sie das Blutgefäßsystem und zwar die Endothelien als Bildungsstätte der Agglutinine und Präzipitine annehmen. Lokale Präzipitinbildung im Auge haben v. Dungern und Roemer beobachtet.

b) Reindarstellung und Eigenschaften.

Was die Isolierung und Reindarstellung des Präzipitins, betrifft so sind die Chancen dafür viel ungünstiger als beim Präzipitinogen, da die Präzipitine viel weniger widerstandsfähig sind als das Präzipitinogen und jedes Verfahren, welches eine Trennung des Präzipitins vom Eiweiß bezweckt, zugleich auch eine Zerstörung dieses Antikörpers bewirkt. Die Präzipitine werden bei Fällung des Serums mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewöhnlich im Euglobulinniederschlag erhalten. Weitere Versuche zur Isolierung des Präzipitins hatten aber keinen Erfolg. Sowohl Säuren als Alkalien und auch andere Substanzen (Harnstoff, Formaldehyd), die Veränderungen des Eiweißes bewirken, schädigen auch das Präzipitin, so daß dieses bei längerer Einwirkung der genannten Körper seine fällende

Wirkung verliert. Auch Fermente, als Pepsinsalzsäure und andere, die mit gutem Erfolge zur Reindarstellung des Präzipitinogens verwendet wurden, sind hier nicht anwendbar, denn auch sie zerstören das Präzipitin, wenngleich verschiedene Präzipitine sich in ihrer Resistenz gegen Fermentwirkungen unterscheiden. Nach Versuchen von E. PICK [7]) hebt das Erhitzen von Serum auf 60° dessen fällende Eigenschaft für Bakterien auf. KRAUS und v. PIRQUET wiesen nach, daß durch Erhitzen des Serums auf 60° bloß die Fähigkeit zu fällen zerstört wird, die Bindungsfähigkeit aber noch erhalten bleibt. Die Verfasser nahmen daher nach der EHRLICHschen Anschauung eine thermolabile koagulierende und eine thermostabile bindende Gruppe an und nannten das seiner koagulierenden Fähigkeit beraubte Präzipitin Präzipitoid. Die bereits besprochenen Untersuchungen von KRAUS und JOACHIM, durch welche die Existenz zweier in ihrem Verhalten gegen Erhitzen verschiedener Präzipitinogene gezeigt wurde, haben auch den Nachweis erbracht, daß nicht in jedem Serum ein einheitliches Präzipitin vorhanden ist, sondern daß man häufig außer dem bei 60° inaktivierbaren Präzipitin noch ein zweites auch nach Erhitzen auf 80° noch koagulierendes Präzipitin findet. Nach diesen Untersuchungen reagiert das thermolabile Präzipitin mit dem thermostabilen Präzipitinogen der Bouillonfiltrate und das thermostabile Präzipitin mit dem thermolabilen Präzipitinogen der Kochsalzagarfiltrate.

Ganz anders ist das Verhalten des Präzipitins gegen höhere Temperaturen, wenn dasselbe zuerst bei niederen Temperaturen getrocknet würde. Solches getrocknetes Präzipitin kann nach EISENBEG, ohne eine Schädigung zu erleiden, $^1/_2$ Stunde auf 100° erhitzt werden. Erst bei Erhitzen auf 130°, bei welcher Temperatur die Eiweißkörper denaturiert werden, wird auch das Präzipitin geschädigt. Außer durch den Einfluß hoher Temperaturen verlieren präzipitierende Sera schon durch längeres Aufbewahren ihre fällende Eigenschaft, zwar nehmen KRAUS und JOACHIM es als wahrscheinlich an, daß zuerst das thermolabile Präzipitin diese Eigenschaft verliert, da sie in einem zwei Jahre alten, durch Injektion von Typhusbakterien erzeugten Immunserum nur mehr mit Präzipitinogen aus Kochsalzagarfiltraten reagierendes, also thermostabiles Präzipitin fanden.

Was die Erzeugung von Antipräzipitinen anbelangt, so ist nach den Versuchen von KRAUS und EISENBERG wohl die Annahme erlaubt, daß es für Bakterienpräzipitine nicht gelingt Antipräzipitine zu erzeugen.

Denn die von diesen Autoren angestellten Versuche durch Injektion von Typhusagglutininen Antiagglutinine zu erhalten, führten zu einem negativen Ergebnis und wegen der weitgehenden Übereinstimmung zwischen Bakterienagglutininen und Präzipitinen ist es wohl gestattet, diesen Befund auch für die Präzipitine gelten zu lassen.

IV. Reaktion.

a) Verlauf und Niederschlagsbildung.

Zur Beobachtung von Bakterienpräzipitaten ist es notwendig, daß die beiden zur Verwendung gelangenden Flüssigkeiten, die das Präzipitinogen und die das Präzipitin enthaltende, steril sind, da die Bakterienpräzipitate für gewöhnlich nicht so rasch auftreten, wie es bei hochwertigen Serumpräzipitinen der Fall ist, und dieser Umstand eine längere Beobachtungszeit notwendig macht; meistens läßt man die Proben 24 Stunden im Brutschrank stehen, in welcher Zeit durch Bakterienentwicklung eine

Trübung entstehen kann, die zu Täuschungen Anlaß geben könnte. Die beiden Flüssigkeiten, Serum und Bakterienfiltrat, müssen natürlich auch vollkommen klar sein. Nur bei genauer Beobachtung dieser Bedingungen kann man einwandfreie Resultate erhalten. Zur Ausführung der Reaktion füllt man mittels steriler Pipetten bestimmte Mengen des Bakterienfiltrates (einige Kubikzentimeter) in sterile Röhrchen und setzt hierauf verschiedene Mengen des Immunserums zu, z. B. auf je 5 ccm Filtrat 1, 0,5, 0,2 ccm Serum. Selbstverständlich ist es unbedingt notwendig, Kontrollproben mit Bakterienfiltrat + Kochsalzlösung und Immunserum + Kochsalzlösung aufzustellen, welche natürlich bis zum Ende der Beobachtungszeit vollkommen klar bleiben müssen. Nachdem die Röhrchen in der besprochenen Weise beschickt sind, werden sie auf 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Gewöhnlich tritt in den Röhrchen, welche das entsprechende Präzipitinogen und Präzipitin enthalten, nach einigen Stunden Trübung auf, die mit der Zeit an Intensität zunimmt. Bis zum nächsten Tage ist es dann zur Bildung eines Niederschlages gekommen, der sich am Boden des Röhrchens abgesetzt hat, während die darüber stehende Flüssigkeit klar ist. Beim Schütteln läßt sich dieser Niederschlag in Form kleiner Flöckchen aufbeuteln. Mikroskopisch besteht derselbe aus amorphen Häufchen, die zum größten Teile aus Körnchen zusammengesetzt sind.

Der eben geschilderte Verlauf der Reaktion ist der typische. Zuweilen ist auch noch eine längere Beobachtungszeit als 24 Stunden nötig, da auch noch nach 48 Stunden ein positiver Ausfall der Reaktion eintreten kann. Unter besonders günstigen Bedingungen, reichlichem Gehalt des Bakterienfiltrats an Präzipitinogen und hochwertigen Immunserum kann die Reaktion auch viel rascher verlaufen. So erhielt ich z. B. mit einem hochwertigen Ozaenaserum schon nach 5 Minuten eine Trübung und nach 2 Stunden bereits einen Niederschlag. E. Pick beobachtete, allerdings bei Verwendung seines rein dargestellten Präzipitinogens, schon nach einer halben Stunde massige Niederschläge.

Besonders schnell und ausgiebig fällt die Präzipitation bei schwach saurer Reaktion aus, auch bei neutraler Reaktion verläuft der Vorgang günstig; verhältnismäßig geringe Alkaleszenzgrade genügen jedoch schon, um die Reaktion zu beeinträchtigen. Der gebildete Niederschlag, das Präzipitat, ist nach Untersuchungen von E. Pick jedenfalls ein Eiweißkörper, der sich durch das Fehlen einer Kohlenhydratgruppe durch die Unlöslichkeit in Mineralsalzen und Soda und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Fermenten auszeichnet. Zur Erklärung dieser Resistenz gegen Fermente nimmt Pick an, daß sich das Bakterienkoagulin (Präzipitinogen) mit dem Serumpräzipitin derart verbindet, daß dadurch die Stelle, wo sonst die Fermente angreifen, besetzt wird. Ob das Präzipitat ein Alkalialbuminat ist, wurde durch die Untersuchungen von Pick nicht festgestellt. Die schwere Löslichkeit in Soda und die Unverdaulichkeit durch Trypsin und Pepsin ist mit einem solchen Eiweißkörper nicht gut in Einklang zu bringen. Da das von Pick dargestellte Präzipitinogen so gut wie eiweißfrei war, so muß das im Präzipititate enthaltene Eiweiß vom Immunserum stammen. Für diese Annahme spricht auch der Umstand, daß zum positiven Ausfall der Reaktion so geringe Mengen Präzipitinogen notwendig sind, daß von ihm wohl nur zum geringsten Teile das Material zum Niederschlage geliefert werden kann.

b) Quantitative Verhältnisse und Hemmungen der Reaktion.

Um ein positives Resultat zu erzielen, muß man auch auf die quantitativen Verhältnisse zwischen Präzipitin und Präzipitinogen Rücksicht nehmen, da es durch verschiedene Untersucher (MICHAELIS, EISENBERG, ROSTOCKI, MOLL, SCHUR) sicher gestellt ist, daß bei einem Überschuß von Präzipitinogen eine Hemmung der Niederschlagsbildung oder Lösung des bereits gebildeten Niederschlages auftritt, wofür sich zahlreiche Analogien bei Kolloiden, auch bei anorganischen finden, denn auch hier tritt bei der Einwirkung zweier sich fällender Kolloide aufeinander durch den Überschuß des einen eine Hemmung der Ausflockung ein. Auch sogenannte Präzipitoide des Präzipitinogens, d. i. bindungsfähiges, aber nicht fällbares Präzipitinogen, dürfte auch bei Bakterienpräzipitinen Hemmung verursachen. Für die Serumpräzipitine wurde dieses Phänomen von EISENBERG nachgewiesen und eine erhöhte Aktizität des inaktiven Präzipitinogens zum Präzipitin gefolgert, so daß dieses nicht an das intakte Präzipitinogen gebunden wird. Genauer studiert wurde die Hemmung durch das seines Fällungsvermögens beraubte Bakterienpräzipitin von E. PICK sowie von KRAUS und v. PIRQUET und von diesen beiden Autoren auch für das so veränderte Präzipitin ein erhöhtes Bindungsvermögen für das Präzipitinogen angenommen. Bei Berücksichtigung dieser Befunde ist es daher notwendig, da man ja im Voraus nicht wissen kann, wieviel intaktes Präzipitin resp. Präzipitinogen in den aufeinander reagierenden Flüssigkeiten enthalten ist, die quantitativen Verhältnisse von Präzipitin und Präzipitinogen zu einander zu variieren, um nicht durch eine der früher angeführten Hemmungen einen negativen Ausfall der Reaktion zu erhalten. Nach den Versuchen von KRAUS und v. PIRQUET sind diese durch sogenannte Präzipitoide verursachten Hemmungen spezifisch, da sie ja durch ein spezifisches erhöhtes Bindungsvermögen verursacht werden.

Der Vollständigkeit halber sei ganz kurz auch auf nicht spezifische Hemmungen der Reaktion durch normale Sera hingewiesen. (LANDSTEINER und HALBAN, MICHAELIS u. a. Selbstverständlich sind so wie bei andern Ausflockungsvorgängen auch für die Präzipitation die Salze von allergrößter Bedeutung und bewirkt deren Fehlen ein Ausbleiben der Niederschlagsbildung.

c) Diagnostische Verwertbarkeit.

In zahlreichen Untersuchungen hat sich gezeigt, daß der Präzipitinreaktion bei Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse eine ebensolche Spezifität zukommt wie der Agglutination. Diese Spezifität ist also ebenso wie bei der Agglutination keine ganz absolute, da ein Immunserum, erzeugt mit einem Bakterium, auch in dem Filtrate einer verwandten Art einen positiven Ausfall der Reaktion hervorbringen kann, jedoch kommt es in dem nicht homologen Filtrat gewöhnlich nur zum Auftreten einer Trübung und selbst wenn ein Niederschlag entsteht, tritt dieser später und viel spärlicher auf als im homologen Filtrate, so daß bei Berücksichtigung dieser Umstände und namentlich bei Zusatz entsprechend geringer Mengen des Immunserums noch immer eine Differenzierung möglich ist. Auf dieses letztere Moment ist, wie aus den Untersuchungen von KRAUS hervorgeht, das Hauptgewicht zu legen. In größeren Mengen erzeugt ein Immunserum zwar auch in den Filtraten nahe verwandter Arten Niederschläge; bei Auswertung des Immunserums

kommt man aber zu einem Grenzwerte, bei dem das präzipitierende Serum im homologen Filtrate noch typische Niederschläge hervorbringt, nicht mehr aber in den Filtraten der zur selben Gruppe gehörigen Arten. Es liegt somit kein Grund vor, der Präzipitinreaktion die Artspezifität abzusprechen, wie es Zupnik tut, und sie für eine der ganzen Gruppe gemeinsame Reaktion zu erklären. Die Resultate Zupniks, die ihn zu dieser Auffassung führten, sind eben dadurch zu erklären, daß dieser Autor die quantitativen Verhältnisse nicht genügend berücksichtigte, d. h. so große Mengen Immunserum verwendete, daß er auch in den Filtraten der verwandten Arten starke Reaktionen erhielt. War doch den Versuchen von Zupnik das Verhältnis vom Serum zu den Filtraten 1:2 oder 1:4, während z. B. in den Versuchen von Kraus über die diagnostische Verwertbarkeit der Präzipitine dieses Verhältnis nur 1:10 und 1:50 betrug. Und gerade bei diesem Verhältnis kam erst die Artspezifität der Reaktion zum Ausdruck. Bei nicht zu nahe verwandten Bakterien unterliegt aber die Differenzierung gar keinen Schwierigkeiten, da das im homologen Filtrate typische Niederschläge erzeugende Präzipitin, in den anderen Filtraten gar keine Reaktion hervorruft. Für die praktische Anwendung wird im allgemeinen die Agglutination den Vorzug verdienen, da ihre Ausführung wesentlich einfacher und rascher ist. In einzelnen Fällen jedoch, wo, wie z. B. bei den Kapselbakterien, die Agglutination gewissen Schwierigkeiten unterliegt und die Präzipitation uns gute Resultate lieferte, und ferner als Ergänzung der Agglutination ist die Methode der spezifischen Niederschlagsbildung gewiß ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel.

Eine neue praktische Verwendbarkeit der Präzipitinreaktion schlägt Fornet vor. Der Verfasser gibt an, daß es ihm gelungen sei, mittels eines von Kaninchen gewonnenen Typhus-Immunserums im Blutserum von Typhuskranken, ferner auch in dem Harne eines solchen Patienten, eine typische Niederschlagsbildung hervorzubringen, d. h. also Präzipitinogen der Typhusbakterien nachzuweisen. Diese Reaktion gewänne hauptsächlich dadurch an praktischem Wert, daß sie bereits in den ersten Krankheitstagen, in denen die Gruber-Widalsche Reaktion noch negativ ist, einen positiven Ausfall geben soll. Allerdings gab nach den Versuchstabellen von Fornet auch normales Kaninchenserum mit Typhuspatientenserum Flockenbildung, die jedoch ein anderes Aussehen hatte, als die vom spezifischen Serum erzeugte. Im Wiener Institute schon vor einiger Zeit in derselben Richtung angestellte Versuche ergaben ein negatives Resultat.

Auch neuerdings führten diesbezügliche Versuche von Russ zu negativen Ergebnissen. Ein Serum (Pferd), welches in Filtraten aus Typhusbouillonkulturen typische Niederschläge erzeugte, ließ Serum von Typhuskranken (positiver Widal) vollkommen klar. Nach Zusatz von 1 bis 2 ccm des Pferdeserums zu 1—2 ccm Serum der Kranken blieb die Flüssigkeit nach 24 Stunden bei 37° klar. Gegen die Versuche von Russ wendet allerdings Fornet ein, daß die meisten der von ersterem gewählten Patientensera zum Nachweise des Präzipitinogens nicht geeignet waren, da sie aus einer zu späten Krankheitsperiode stammten. Das Präzipitinogen soll sich nach Fornet nur ganz im Beginne der Erkrankung im Blutserum der Patienten vorfinden. Die Fälle von Russ gaben aber zumeist schon positiven Ausfall der Gruber-Widalschen Reaktion. Außer beim erkrankten Menschen hatte Fornet auch im Serum von Kaninchen, welche 10—20 Stunden vorher mit einer reichlichen Menge

von Typhuskultur injiziert worden waren, Präzipitinogen nachgewiesen. Bei der Nachprüfung dieses Versuches durch RUSS ergab sich, daß die nach Zusatz von Typhus-Immunserum zum Blutserum der infizierten Kaninchen auftretenden Häufchen auf Agglutination der im Serum der Kaninchen vorhandenen lebenden Typhusbazillen, welche sich während des mehrstündigem Aufenthaltes der Röhrchen im Brutschrank noch vermehrt hatten, zurückzuführen seien. Nach der Angabe von FORNET waren in seinen Kaninchenseris weder mikroskopisch, noch kulturell Typhusbakterien nachweisbar, außerdem waren seine Sera mit Formalin 1:5000 bis 1:10000 versetzt. Eine Nachprüfung der FORNETschen Angaben durch MEYER ergab bei Typhuspatienten absolut negative Resultate. Bei Kaninchen, welche intraperitoneal mit Bazillen injiziert und auf der Höhe der Krankheit getötet wurden, hat MEYER positive Resultate gehabt. Möglicherweise hat es sich auch in diesen Versuchen um Agglutination von Typhusbazillen gehandelt. Wenn auch die FORNETschen Angaben zu Recht bestehen sollten, so dürfte die praktische Verwendbarkeit der Reaktion doch gewissen Schwierigkeiten unterliegen, da, wie FORNET übrigens selbst angibt, Kaninchenserum auch mit normalem Menschenserum häufig Niederschläge gibt, welche leicht zu Irrtümern Anlaß geben könnten.

Anhangsweise soll hier noch erwähnt werden, daß FORNET, SCHERESCHEWSKY und ihre Mitarbeiter von derselben Überlegung ausgehend auch im Blutserum von frisch erkrankten Luetikern ein spezifisches Präzipitinogen nachweisen zu können behaupten. Als Präzipitin wurde zu diesen Untersuchungen das Serum älterer Lueserkrankungen und von Paralytikern verwendet*). Über ähnliche Untersuchungen bei Masern und Scharlach hat in jüngster Zeit SCHERESCHEWSKY berichtet.

Im folgenden möchte ich noch kurz die bisher auf Präzipitation untersuchten Bakterien und die dabei erzielten Resultate anführen.

Vibrionen.

KRAUS[26]) konnte sowohl in verschieden alten Bouillonkulturen oder in 2tägigen Agarkulturen des KOCHschen Vibrio, die in Bouillon oder Kochsalz gelöst waren, mit Choleraserum typische Niederschläge erzeugen. Dagegen wurde in Filtraten von Vibrio Paris, jetzt NASIK, FINKLER-PRIOR, DENEKE, METSCHNIKOFF, DANUBICUS und ELVERS von Cholera-Serum entweder gar kein Niederschlag oder nur ganz spärliche Flocken gebildet, welches Resultat vollkommen mit der agglutinierenden Wirkung des Choleraserums auf die betreffenden Stämme übereinstimmte, da dieses Serum die früher genannten nicht spezifischen Vibrionen gar nicht oder nur in hohen Konzentrationen agglutinierte. Als Ergänzung zu diesen Befunden konnte ich in Versuchen mit Cholerafiltraten, ferner mit Filtraten der El Torstämme, welche von Choleraserum ebenso stark wie echte Cholera agglutiniert werden und mit dem Filtrate eines durch Choleraserum nicht agglutinablen Vibrio 21 zeigen, daß auch für diese Stämme vollständige Übereinstimmung zwischen Agglutination und Präzipitation besteht. Es wurden nämlich von Choleraserum sowohl in Cholerafiltrat als auch in Filtraten von 2 verschiedenen El Torstämmen ungefähr gleich starke Niederschläge gebildet. Ebenso verhielten sich die beiden durch Immunisierung mit den 2 El Torstämmen

*) Bei der Nachprüfung konnte die von den Autoren angegebene Spezifität der Reaktion nicht bestätigt werden.

hergestellten Immunsera. Dagegen gaben diese beiden Sera und das Choleraserum keine Niederschläge in Filtraten des Vibrio 21. Das durch Immunisierung mit Vibrio 21 hergestellte Serum wiederum erzeugte im Filtrate dieses Vibrio typische Niederschläge, nicht aber in denen der Cholera und der El Torstämme.

C. Noris erhielt durch Immunisierung von Kaninchen mit dem Choleravibrio und dem Vibrio Metschnikoff ebenfalls Präzipitine für diese beiden Vibrionen, und zwar erzeugte das Choleraimmunserum sowohl in Cholerafiltraten als auch in denen des Vibrio Metschnikoff Niederschläge, wenngleich in den letzteren etwas schwächer als in den homologen Filtraten. Allerdings waren die Mengen des Filtrates zum Serum in diesen Versuchen wie 5:5, 5:2,5 und 5:1, also noch immer verhältnismäßig große Serummengen, resp. Verdünnungen, die zu nieder waren, um eine Differenzierung zweier so nahe verwandten Arten einer Gruppe zu ermöglichen. Bei den gleichen quantitativen Verhältnissen erhielt Noris durch das Serum des Vibrio Metschnikoff im homologen Filtrate auch mit 0,1 ccm Serum auf 0,5 ccm Filtrat noch einen reichlichen Niederschlag, während dieselbe Serummenge in 0,5 ccm Cholerafiltrat keine Reaktion mehr hervorbrachte.

Bacterium coli.

Da aus den Untersuchungen von Radziewsky und Rothberger hervorgeht, daß nicht alle Colistämme von einem Immunserum im gleichen Maße agglutiniert werden, wurden von Kraus ähnliche Untersuchungen für die Filtrate verschiedener Colistämme angestellt. Auch hier zeigte sich, daß diejenigen Colistämme, welche von dem betreffenden Immunserum nur schwach agglutiniert wurden, auch nur ganz spärliche Niederschläge lieferten. Zu denselben Resultaten gelangte Kraus auch bei der Prüfung verschiedener Paracolistämme.

Bacterium typhi.

In einer großen Versuchsreihe wurden von Zupnik unter anderen auch Filtrate von Typhus und typhusähnlichen Stämmen auf Präzipitation untersucht. Der Verfasser gelangte durch diese Untersuchungen zu dem Schlusse, daß man mit Hilfe der Präzipitation ebenso wenig wie mit der Agglutination die einzelnen Arten dieser Gruppe unterscheiden könne und bezeichnet daher, wie bereits erwähnt, diese Reaktion nicht als eine artspezifische, sondern als eine Gruppenreaktion. Die Erklärung für dieses Versuchsergebniß wurde bereits gegeben. In meinen eigenen Untersuchungen wurden zu 2 ccm Filtrat 0,3 und 0,1 ccm Serum gegeben, es verhielt sich also die Menge des Präzipitins zu der des Filtrates wie 3:20 oder 1:20. Ich verwendete also viel geringere Serummengen als Zupnik und konnte unter solchen quantitativen Verhältnissen eine sichere Spezifität in dem schon früher definierten Sinne feststellen, d. h. es gelingt mit Hilfe der Präzipitation den homologen Stamm von einem derselben Gruppe angehörigen zu unterscheiden. Ich untersuchte Filtrate 14—15 tägiger Bouillonkulturen von Typhus abdominalis, Paratyphus A und B und Mäusetyphus mittels eines Typhusimmunserums und eines für Mäusetyphus. Es zeigte sich in diesen Versuchen, der selbst 0,1 cm³ des Typhusserums im Filtrat von Typhus noch einen typischen Niederschlage erzeugte; diese Menge des Typhuspräzipitins brachte in den übrigen drei Filtraten eine kaum mehr deutlich wahrnehmbare Trübung hervor. Erst 0,3 ccm dieses Serums machten in den

Filtraten von Mäusetyphus und Paratyphus B Trübungen. Im gleichen Sinne fielen die Versuche mit Mäusetyphusserum aus; denn auch mit diesem wurden nur im homologen Filtrate von 0,1 ccm. Serum Niederschläge erzeugt.

Auch Versuche von Noris mit der Typhus-Coli-Gruppe zeigen zur Genüge, wie wichtig die Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse zur Differenzierung der verschiedenen Arten einer Gruppe ist. Noris erhielt durch ein Immunserum erzeugt, mit einem Bakterium dieser Gruppe, bei niederen Verdünnungen auch in den Filtraten anderer Stämme der Typhus-Coli-Gruppe, Niederschläge; bei höheren Verdünnungen jedoch präzipitierte ein solches Immunserum nur mehr das homologe Filtrat, oder wenigstens dieses viel rascher und reichlicher als das verwandter Stämme.

Bacterium pestis.

Die Präzipitine für Pest wurden, wie bereits erwähnt, von Kraus bei seinen ersten Untersuchungen über spezifische Niederschläge sowohl in Bouillon- als auch in Agarfiltraten gefunden. Weitere Versuche betreffs der Spezifität dieser Reaktion sind noch von Markl gemacht worden.

Bacillus dysenteriae.

In Versuchen von Noris erzeugten Dysenterieimmunsera in ganz niederen Verdünnungen auch in Coli- und Typhusfiltraten Präzipitate, in höheren nicht mehr. Das Dysenterieserum gab mit dem homologen Stamm eine viel stärkere Reaktion als mit den anderen Stämmen der Dysenteriegruppe.

Dopter hingegen kommt auf Grund seiner Versuche zum Schlusse, die verschiedenen Stämme der Dysenterie-Gruppe für identisch zu halten. Seine Präzipitationsversuche ergaben ihm, daß ein Shiga-Immunserum auch für die anderen Arten der Dysenteriebazillen Präzipitine enthält. Daß bei so nahe verwandten Arten Mitagglutinine respektive Mitpräzipitine in hohem Maße auftreten, ist ja bekannt; nichtsdestoweniger tritt auch hier bei entsprechend hohen Verdünnungen eine Differenz der einzelnen Arten zu Tage. Gibt doch Dopter selbst an, daß die durch das Shigaserum erzeugten Niederschläge in den Filtraten von Flexner und den Pseudodysenteriestämmen weniger reichlich auftreten als im Filtrate des Bak. Shiga-Kruse.

Versuche, die ich sowohl mit Bouillon- als auch Kochsalzagarfiltraten der beiden verschiedenen Typen der Dysenteriegruppe, dem Bakterium Kruse-Shiga und dem Bakterium Flexner machte, ergaben dasselbe Resultat wie die Agglutination dieser beiden Stämme. Als Präzipitin wurde das Serum von Pferden verwendet, von dem eines mit Kruse-Shiga-Kulturen, das zweite mit Flexner-Kulturen, das dritte sowohl mit Kruse-Shiga, als auch Flexner-Kulturen immunisiert war. In Kruse-Shiga-Filtraten gab das Kruse-Serum massige Niederschläge, weniger reichlich das Kruse- und Flexner-Serum; das Flexner-Serum erzeugte in Filtraten von Kruse-Shiga gar keinen Niederschlag. In Flexner-Filtraten bildeten alle drei Sera, am stärksten allerdings anscheinend das Flexner-Serum typische Niederschläge.

Bacillus prodigiosus, pyocyaneus und proteus.

Durch Immunisierung von Kaninchen mit Prodigiosusagarkulturen oder Filtraten von Bouillonkulturen erhielt Noris Immunsera, die im

Filtrate von Prodigiosus Niederschläge bildeten. In ähnlicher Weise erhält man nach Wassermann Präzipitine für Pyocyaneus.

Schwache Präzipitine konnte Noris durch Immunisierung von Kaninchen auch für Proteus vulgaris erhalten. $^1/_4$ und $^1/_{10}$ ccm des Immunserums zu 1 ccm Filtrat zugesetzt, gaben nach 5 Stunden noch keine Reaktion, nach 24 Stunden war in der Probe mit $^1/_4$ ccm Serum ein reichlicher Niederschlag, in der mit $^1/_{10}$ ccm Serum nur ein leichter Bodensatz.

Kapselbakterien.

Nachdem in letzter Zeit wieder von verschiedenen Autoren (Bertarelli, Porges, Streit) die Agglutination der Kapselbakterien studiert worden war und es namentlich durch Benützung der von Porges angegebenen Methode des Erwärmens der Bakterien mit Säure aussichtsvoll erschien, mittels der Agglutination zu einer Differenzierung der einzelnen Arten innerhalb dieser Gruppe zu gelangen, haben Porges und ich es unternommen, auch mit Hilfe der bisher für Kapselbakterien noch nicht verwendeten Präzipitationsmethode, zu demselben Ziele zu gelangen, umso mehr, als die sehr wechselnde Agglutinabilität verschiedener Stämme der Kapselbakterien für die Differentialdiagnose gewisse Schwierigkeiten bildet. Untersucht wurden Bacterium pneumoniae Friedländer, Rhinosklerom und Ozaena. Die betreffenden Immunsera wurden von Kaninchen durch subkutane Injektion von Kochsalzagaraufschwemmungen gewonnen. Es wurde jedesmal der Inhalt eines Agarröhrchens injiziert. Nach 4—5 Injektionen lieferten die Tiere meistens ein brauchbares Serum. Das Präzipitinogen wurde sowohl aus ca. ein Monat alten Bouillonkulturen als auch aus Kochsalzagarfiltraten gewonnen. Die Bouillonfiltrate gaben reichlichere Niederschläge als die Kochsalzagarfiltrate. Auf diese Weise wurde für alle drei erwähnten Arten der Kapselbakterien deutliche Präzipitation festgestellt und konnten dieselben bei Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse ohne weiteres von einander unterschieden werden. Das Verhältnis des Serums zum Filtrat wurde in allen Versuchen wie 3:20 oder 1:20 gewählt. Friedländer-Serum gab mit dem homologen Filtrat starke Niederschläge, mit Rhinosklerom bloß Trübung, mit Ozaena gar keine Reaktion, Ozaena-Serum mit Ozaena-Filtrat mäßige Niederschläge, mit Rhinosklerum nur leichte Trübung, mit Friedländer nicht einmal Trübung. Das Rhinosklerom-Serum endlich mit dem homologen Filtrate wieder deutliche Niederschläge, mit Friedländer nur spärliche Flocken, mit Ozaena keine Reaktion. Bei der Agglutination ergaben sich ungefähr dieselben Resultate, es war häufig Mitagglutination zu beobachten, jedoch wurde der homologe Stamm in höheren Verdünnungen agglutiniert als der verwandte.

Bacterium mallei.

Wladimiroff erhielt mit dem Serum rotzkranker Pferde in 46tägigen glyzerinfreien Filtraten von Rotzkulturen Niederschläge noch in Verdünnungen in denen das Serum normaler Pferde unwirksam war. Da sich jedoch mit verschiedenen Rotzkulturen ungleiche Resultate ergaben, lassen sich nach seiner Meinung keine bestimmten Normen wie für die Agglutination aufstellen.

Nach Untersuchungen von Bonome[33]) finden sich Agglutinine und Präzipitine im Serum rotzkranker Pferde, Katzen und Meerschweinchen.

Bouillonfiltrate von Rotzkulturen enthalten nur geringe Mengen von Präzipitinogen. Größere Mengen davon finden sich in dem aus frischen Organen (Milz) hergestellten Plasma rotzkranker Katzen und in wässerigen Glyzerinextrakten aus frischen oder getrockneten Agarkulturen. BONGME nimmt zur Erklärung dieses Verhaltens an, daß in den Bouillonfiltraten des Rotzes vorwiegend Toxine und wenig Proteine enthalten sind; diese letzteren finden sich reichlicher in wässerigen Glyzerinextrakten aus mit Glassand zerriebenen zentrifugierten und filtrierten Rotzkulturen.

Bacillus diphtheriae.

Nach Versuchen von SCHWONER[34]) gelingt es nicht leicht, aus Diphtheriebakterien, obwohl deren Agglutination keinen Schwierigkeiten unterliegt, Präzipitinogen zu gewinnen, da dasselbe sehr fest an den Bakterienleibern zu haften scheint. In zwei Fällen konnte aber SCHWONER sowohl in Bouillon- als in Kochsalzagarfiltraten Niederschläge erhalten.

Für die Pseudodiphtheriebakterien fand SCHWONER[35]) nur in Kochsalzagarfiltraten nicht aber in Bouiltonfiltraten Präzipitation und zwar überall dort, wo auch Agglutionation auftrat. WASSERMANN[36]) injizierte Kaninchen statt der Diphtheriebakterien 0,1 $^0/_0$ Äthylen-Diamin-Extrakte aus Bakterien, die bei 60° getrocknet und dann pulverisiert wurden. Die toxischen Eigenschaften dieser Extrakte hob er durch Zusatz von Antitoxin auf. Der Vorteil dieser Methode liegt nach WASSERMANN darin, daß man dem Tiere größere Mengen von Präzipitinogen einführen kann. Ein mit diesen Extrakten gewonnenes Immunserum erzeugte in dem klaren Äthylen-Diaminauszug der Bakterien eine Trübung und nach einiger Zeit einen Niederschlag.

Säurefeste Bakterien.

Um in Kulturfiltraten von Tuberkulose spezifische Niederschläge zu erhalten, hat KITAJAMA[37]) folgendes Verfahren angewendet. Er kultiviert Tuberkulose in neutraler 0,75 bis 1 $^0/_0$iger neutraler Lösung von Liebigs Fleischextrakt mit 1,5 $^0/_0$igem Peptonzusatz. Diese Kulturen bleiben 4—5 Wochen lang im Brutschrank. Nach dieser Zeit werden die Kulturen eine Stunde im KOCHschen Topf erhitzt und dann filtriert. Zum Filtrat wird 0,5 $^0/_0$iges Karbol zugesetzt. Zum Gebrauche wird die Stammflüssigkeit mit 0,85 $^0/_0$iger Kochsalzlösung, die 0,5 $^0/_0$iges Karbol enthält, 5fach verdünnt, so daß sie fast farblos wird. Setzt man zu dieser Flüssigkeit das zu untersuchende Serum, so entsteht nach einige Minuten langem bis 24stündigem Aufenthalt im Brutofen ein Niederschlag. Dieser Niederschlag ist nach dem Verfasser der Agglutination gleichzustellen.

Bisher nicht veröffentlichte Untersuchungen von SCHWONER und LÖWENSTEIN, die zum Nachweise von Präzipitinen für die säurefesten Bakterien unternommen wurden, hatten keinen positiven Erfolg. Zu diesen Untersuchungen wurden mehrere Monate alte Glyzerinagarkulturen von menschlicher Tuberkulose, Rindertuberkulose und anderen säurefesten Bakterien (MOELLER, RABINOWITSCH usw.) zerrieben, in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und durch Reicheltkerzen filtriert. Zur Gewinnung des Präzipitins wurden Ziegen mit den betreffenden Bakterien vorbehandelt. Diese Immunsera agglutinierten zwar die betreffenden Bakterien, erzeugten aber in den Filtraten derselben keine Niederschläge, offenbar weil zu wenig für die Reaktion notwendige Bakterienbestandteile darin gelöst waren.

Dagegen gibt Bonome an, daß er bei Tuberkulose gute Resultate mittels der Präzipitation erhalten habe und auf diese Weise sogar menschliche und Rindertuberkulose mit Sicherheit unterscheiden konnte. Zur Gewinnung des Präzipitinogens verfuhr er folgendermaßen: Frische Tuberkeln wurden im Mörser mit Glassand verrieben, mit 5 proz. Glycerin haltigem Wasser extrahiert, die Aufschwemmungen kräftig zentrifugiert und hierauf durch Berkefeldkerzen filtriert. Das präzipitierende Serum wurde von tuberkulösen Menschen und Rindern, ferner von Kaninchen und Meerschweinchen, welche mit menschlicher oder Rindertuberkulose infiziert worden waren, gewonnen. Das Serum der tuberkulösen Menschen gab stärkere Fällung mit Menschentuberkelextrakt als mit Rindertuberkelextrakt. Das Serum tuberkulöser Rinder verhielt sich umgekehrt.

Normales menschliches Serum enthielt Spuren von Präzipitin sowohl für Menschen- als Rindertuberkelextrakt nicht aber normales Rinderserum. Nach Absättigung der Sera von tuberkulösen Menschen mit Rindertuberkulose waren noch Präzipitine für menschliche Tuberkel vorhanden, und umgekehrt. In einer anderen Versuchsreihe wurde das Präzipitinogen aus Reinkulturen von Tuberkelbazillen gewonnen. Gut entwickelte Kulturen wurden von der Oberfläche des Nährbodens abgekrazt und auf gutgereinigte ausgeglühte Deckgläschen ausgebreitet, zwischen sterilen Uhrgläsern eingeschlossen und bei 35° C 12—15 Tage getrocknet. Die Deckgläschen mit der eingetrockneten Masse wurden unter Zusatz von Glassand im Mörser möglichst fein zerrieben und mit 5 proz. Glyzerin enthaltendem Wasser extrahiert. Die leicht opaleszierende Flüssigkeit wird zentrifugiert und dann durch Berkefeldkerzen geschickt. Auch mit diesen Extrakten erhielt Bonome ähnliche Resultate wie bei Herstellung des Präzipitinogens aus den Tuberkeln.

Kokken.

Die Präzipitation bei Kokken unterliegt gewissen Schwierigkeiten, da es nicht immer ohne weiteres gelingt, das Präzipitinogen aus den Kokkenleibern frei zu machen. Bei Streptokokken und Meningokokken konnte ich weder in Bouillon- noch in Kochsalzagarfiltraten einen Niederschlag erhalten. Auch Versuche durch Kochen mit Säure oder Lauge aus den Kokkenleibern Präzipitinogen in Lösung zu bringen, waren ohne Erfolg, selbst nach Konzentrierung der Flüssigkeiten. Höchstens konnte ich bei Streptokokken nach Konzentrierung des Filtrates das Auftreten leichter Trübungen konstatieren.

Dagegen ist es Kraus gelungen (die Versuche sind noch nicht publiziert), in Filtraten älterer Bouillonkulturen von Meningokokken sowohl mit Pferde- als auch Ziegenimmunserum Niederschläge zu erzeugen. Aus diesen Versuchen scheint ein Paralellismus zwischen Agglutination und Präzipitation hervorzugehen, insofern, als nur die agglutinablen Meningokokkenstämme Filtrate lieferten, welche mit dem Immunserum Niederschläge geben.

Aronson konnte in den Filtraten von Bouillonkulturen des Streptokokkus auch keine Präzipitation erzielen, jedoch gelang es ihm, durch Extraktion der Kokken mit 1 %iger Aethylendiaminlösung positive Resultate zu erzielen. Die Aethylendiaminlösung wurde durch Papier filtriert, bis sie klar war. In einer solchen Lösung machte das Immunserum, im Verhältnis 1 : 10 zugesetzt, in mehreren Stunden einen Niederschlag.

Bei Staphylokokken erhielt Noris mit Kaninchenimmunserum in Filtraten von Bouillonkulturen Niederschläge.

Mit Staphylokokken gelang es auch mir, positive Resultate zu erzielen. Das Präzipitin wurde von einer Ziege durch Injektion von auf 60° erhitzten Bouillonkulturen gewonnen. Dieses Serum agglutinierte Staphylokokken bis 1:200 und erzeugte in Bouillonfiltraten dieser Kokken deutliche Niederschläge.

Für Pneumokokkenpräzipitation liegen zahlreiche Versuche vor. Neufeld bewirkte durch frische Galle eine Lösung der Pneumokokkenleiber, indem er zu mehreren Kubikzentimetern Bouillonkultur einen Tropfen Galle zusetzte. In einer solchen Lösung gab ein Pneumokokken agglutinierendes Kaninchenserum typische Niederschläge. Normales Kaninchenserum war wirkungslos. Wodsworth hat nicht nur durch Zusatz von Galle zu Pneumokokkenkulturen, sondern auch mit filtrierten Kochsalzextrakten Niederschläge erhalten. Nach seiner Angabe erzeugen auch verschiedene Normalsera Niederschläge.

Panichi immunisierte Tiere mit Pneumokokkenkulturen, die in Tizzonischer Bouillon gewachsen waren. Das Serum dieser Tiere gab mit Filtraten von Pneumokokkenkulturen aus Tizzonischer oder gewöhnlicher Bouillon Niederschläge. Die gewöhnliche Bouillon eignet sich jedoch für Präzipitationsversuche aus Pneumokokken besser als die Tizzonische, weil die sauere Reaktion der gewöhnlichen Bouillon die Präzipitation befördert, während in der Tizzonischen Bouillon die Reaktion alkalisch bleibt. Das präzipitierende Serum wird von Kaninchen, Hammeln und Eseln gewonnen.

Heyrowsky kultivierte zum Zwecke der Präzipitation Pneumokokken in 1 % Traubenzuckerbouillon. Er ließ solche Kulturen 12—20 Stunden im Brutschrank und hierauf einige Tage bei Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Zeit löst sich die diffuse Trübung der Bouillon auf Zusatz von wenig Natronlauge vollständig, während sie bei einer zwölfstündigen Kultur auch durch große Mengen Lauge nicht gelöst wird. Die so behandelte Bouilloukultur wird mit Salzsäure neutralisiert. Mit dieser klaren Lösung gelang die Präzipitation leicht. Auch klare Filtrate von Traubenzuckerbouillon-Kulturen geben die Reaktion, wenn auch die Niederschläge weniger voluminös ausfielen. Bei Filtraten aus gewöhnlichen Bouillonkulturen gelang die Präzipitation nicht.

Hefe.

Schuetze teilte im Jahre 1901 mit, daß es ihm gelungen sei mittels Hefe Präzipitine zu erzeugen. Er versuchte hierauf verschiedene Hefearten durch die Präzipitation zu unterscheiden. Schuetze verwendete zur Immunisierung nicht Preßsäfte aus Hefe, weil in diesen durch die Enzyme das Eiweiß verdaut wird, sondern er rührte die Hefe mit Kochsalz und $^1/_4$ %ige Sodalösung zu einer dicken Pasta an, die er dann mit feinem Glasstaub und Seesand verrieb. So bekam er aus der dicken Masse eine leichtflüssige Emulsion. Diese wurde eine halbe Stunde geschüttelt und hierauf zentrifugiert, so daß über dem, die zusammengeballten Zellmembranen und den Glasstaub enthaltenden Bodensatz, eine stark eiweißhaltige Flüssigkeit gewonnen wurde, die mikroskopisch keine zellulären Elemente mehr enthielt. Von einer solchen Emulsion wurden Kaninchen zirka 100 ccm im Verlaufe von zwei Monaten injiziert. Das Immunserum wurde zu der zur Immunisierung benützten Flüssigkeit zugesetzt. Es wurde mit vier verschiedenen Hefearten, Ge-

treide, Kartoffel, Ober- und Untergähriger Hefe immunisiert. Jedes Immunserum gab aber mit allen vier Hefearten Niederschläge, so daß eine Differenzierung auf diesem Wege nicht möglich war. Normale Kaninchensera brachten keine Reaktion hervor. Auch mittels der Agglutination konnte Schuetze die genannten vier Hefearten nicht unterscheiden.

Trypanosomen.

Zur Vervollständigung der bisher angeführten Ergebnisse mit Bakterienpräzipitinen seien noch die Versuche von M. Mayer über Präzipitine bei Trypanosomen angeführt. Die Technik dieser Versuche war folgende: Ein Tsetse-Hund wurde am 5. Krankheitstage entblutet, das Blut durch Zusatz von Natrium citricum ungerinnbar gemacht, die Trypanosomen durch fraktioniertes Centrifugieren, wobei sich dieselben in der oberen Partie des Blutkörperchensediments absetzen, rein gewonnen und in Kochsalzlösung aufgenommen. Diese Trypanosomenaufschwemmung wird 4 Tage lang mit Trypsin verdautbehufs besserer Auflösung der Trypanosomen, besonders der Kernsubstanz, und dann filtriert. Das Serum eines Tsetse-Hundes erzeugte in einem solchen Filtrate Trübung und darauf einen dichtflockigen Niederschlag; bei Zusatz eines Mal de Caderas - Hundeserums blieb das Filtrat vollkommen klar, so daß die Reaktion als spezifisch anzusehen ist.

Literatur.

(Ausführliches über Bakterienpräzipitine siehe R. Kraus: Über spezifische Niederschläge im Handbuch von Kolle und Wassermann.)

Aronson, Untersuchungen über Streptokokken- und Antistreptokokkenserum. Berliner klin. Wochenschr. 1902, pag. 979.
Bail, Versuche über Typhusagglutinine und -Präzipitine. Archiv für Hygiene 1902, Bd. XLII.
Bail und Hocke, Archiv für Hygiene, Bd. XLIV.
Bail und Weil, Centralbl. für Bakt. 1906.
Beljaeff, Über die Bedingungen der Bildung spezifischer Krausscher Niederschläge. Centralbl. für Bakt., Bd. XXXII.
Bonome, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII und Padova, Tip. Prosperini 1905.
Ders., Centralbl. für Bakt. 1907.
Brieger und Mayer, Über die Darstellung einer spezifisch wirkenden Substanz aus Typhusbazillen. Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 18.
Brieger und Schütze, Über die Darstellung einer spezifisch wirkenden Substanz aus Typhusbazillen. Deutsche med. Wochenschr. 1902.
Dopter, La dysenterie bacillaire. Bulletin de l'Inst. Pasteur 1906, 15 et 30 janvier.
v. Dungern, Bindungsverhältnisse bei der Präzipitinreaktion. Centralblatt für Bakteriol. 1903.
Ders., Die Antikörper. Jena 1903. Verlag von G. Fischer.
v. Eisler, Wiener klin. Wochenschr. 1907.
v. Eisler und Porges, Über die Differenzierung der Kapselbakterien mittels Agglutination und Präzipitation. Centralbl. für Bakt. 1906.
Eisenberg, Untersuchungen über spezifische Präzipitationsvorgänge. Centralbl. für Bakt. 1906.
Ficker, Über ein Typhusdiagnostikum. Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 45.
Fornet, Die Präzipitinreaktion. Münchener med. Wochensshr. 1906, pag. 1862.
Ders., Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLIII.
Halban und Landsteiner, Über Unterschiede des fötalen und mütterlichen Blutserums über agglutinations- und fällungshemmende Wirkung des normalen Serums. Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 21.
Heyrowsky, Ein Beitrag zur Biologie und Agglutination des Diptococcus pneumoniae. Centralbl. für Bakt. 1905.
Hocke, Wiener klin. Wochenschr. 1907.

KITAYAMA, Eine neue Reaktion über Tuberkuloseserum. Mitteilung der Mediz. Gesellschaft zu Tokio 1902, Bd. XVI.
KRAUS, R., Über spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera-Typhus-Pestbazillenkulturen erzeugt durch homologes Serum. Wiener klin. Wochenschrift 1897, Nr. 32.
Ders., Über die diagnostische Verwertbarkeit der spezifischen Niederschläge. Wiener klin. Wochenschr. 1901, Nr. 24.
KRAUS und EISENBERG, Über Immunisierung mit Immunsubstanzen. Centralbl. für Bakt. 1902, Nr. 5.
KRAUS und JOACHIM, Über Beziehungen der präzipitinogenen Substanz zum Agglutinogen der Bakterien. Centralbl. für Bakt. 1904.
KRAUS und LEVADITI, Sur l'origine des précipitines. Compt. rend. des séances de l'Acad. des sciences 1904.
KRAUS und v. PIRQUET, Weitere Beiträge über spezifische Niederschläge. Centralbl. für Bakt. 1902.
KRAUS und SCHIFFMANN, Sur l'origine des anticorps, précipitines et agglutinines. Ann. de l'Inst. Pasteur 1906.
MARKL, Zur Agglutination der Pestbazillen. Centralbl. für Bakt. 1901.
MAYER, M., Experimtelle Beiträge zur Trypanosomeninfektion. Zeitschr. für exper. Pathologie und Therapie 1905, Heft 3.
MEYER, Berliner klin. Wochenschr. 1907, pag. 322. Gesellschaft deutscher Charité-Ärzte.
MICHAELIS, Über Hemmungen der Präzipitinreaktion. Hofmeisters Beiträge 1903.
NICOLLE, Recherches sur la substance agglutinée. Ann. de l'Inst. Pasteur 1898.
NEUFELD, Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination. Zeitschr. für Hyg. 1902, Bd. XLVI.
NORIS, C., The bacterial precipitins. The Journal of infections descases 1904. Vol. I, Nr. 3.
OBERMAYER und PICK, Über den Einfluß physikalischer Zustandsänderungen usw. Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 22.
PALTAUF, R., Über Agglutination und Präzipitation. Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 50.
PANICHI, Centralbl. für Bakt., Bd. XLIII. Originale.
PICK, E. P., Zur Kenntnis der Immunkörper. Hofmeisters Beiträge, Bd. I.
PORGES, Über den Einfluß des Bakterienproteins auf die Agglutination und Präzipitation. Zeitschr. für exper. Pathologie und Therapie 1905.
RADZIEWSKY, Beiträge zur Kenntnis des Bact. coli. Zeitschr. für Hyg., Bd. XXXIV.
RÖMER, Arch. für Ophthalmologie 1901, Bd. LII.
ROTHBERGER, Zeitschr. für Hyg. 1900.
RUSS, V., Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLIII.
SCHÜTZE, Über weitere Anwendung der Präzipitine. Deutsche med. Wochenschr. 1902, pag. 804.
Ders., Zur Frage der Differenzierung einzelner Hefearten mittels Agglutination. Zeitschr. für Hyg. 1903, Bd. XLIV.
SCHWONER, J., Über Differenzierung der Diphtheriebazillen durch Agglutination. Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 48.
Ders., Ein Beitrag zur Kenntnis der Pseudodiphtheriebazillen. Wiener klin. Wochenschrift 1903.
WADSWORTH, Journal of medic. Research. 1903, Vol. X.
WASSERMANN, Über Agglutinine und Präzipitine. Zeitschr. für Hyg. 1902.
Ders., Zeitschr. für Hyg. 1903, Bd. XLII.
Ders., Über eine neue Art von Diphtherieserum. Deutsche med. Wochenschrift 1902, pag. 785.
WINTERBERG, Untersuchungen über das Typhusagglutinin und die agglutinisierbare Substanz der Typhusbazillen. Zeitschr. für Hyg. 1899.
WLADIMIROFF, Über Agglutination bakterienfreier Filtrate von Rotzkulturen. St. Petersburger med. Wochenschr. 1898 und 1900 und Kolle-Wassermann, Handb. der pathog. Mikroorganismen.
ZUPNIK, L., Über gattungsspezifische Immunitätsreaktionen. Zeitschr. für Hyg. 1905, Bd. XLIX.
Ders., Zeitschr. für Hyg. 1906.

XXXIV.

Die Anaphylaxie.

Von

R. Doerr

in Wien.

Die Forschung der letzten Jahre hat zu der Erkenntnis geführt, daß die körperfremden Eiweißarten besondere, bisher unbekannte Antigene enthalten, welche durch ihre höchst eigentümlichen immunisatorischen Wirkungen scharf charakterisiert sind. (Im Interesse einer einheitlichen Nomenklatur würde es sich empfehlen, diese Stoffe mit einem gemeinsamen Namen zu belegen, wozu sich zweifellos der von Besredka geschaffene Ausdruck „Sensibilisinogene" am besten eignet.)

Führt man nämlich in den Organismus eines Warmblüters artfremdes Eiweiß ein, und zwar auf parenteralem Wege — die enterale Einverleibung hat nur in Ausnahmefällen Erfolg —, so entwickelt sich nach einiger Zeit eine spezifische Überempfindlichkeit (Hypersensibilität), d. h. ein derart vorbehandeltes Tier reagiert auf die neuerliche Injektion derselben Eiweißlösung, auch wenn diese an sich völlig atoxisch ist, mit stürmischen Krankheitserscheinungen und verendet oft nach wenigen Minuten. Diesen Zustand der Überempfindlichkeit nennen wir seit Richets grundlegenden Arbeiten **Anaphylaxie**.

Die Lehre von der Anaphylaxie hat sich in raschestem Tempo zu einem selbständigen Zweig der Immunitätsforschung entwickelt. Dabei blieb aber die kausale Kontinuität nicht immer gewahrt. — Vielfach wurden Nebenfragen auf Kosten prinzipiell wichtiger Punkte bis in weitgehende Details bearbeitet; auch haben die verschiedenen Autoren eine verschiedene Methodik verwendet, welche den Vergleich ihrer Ergebnisse erheblich erschwert. Endlich ist es bisher nicht gelungen, eine allen Einzeltatsachen in gleicher Weise gerecht werdende Hypothese aufzustellen. Die vorliegenden Erklärungsversuche des anaphylaktischen Phänomens befriedigen nur partiell und können nicht als leitende Ideen für eine Darstellung des Gesamtgebietes benützt werden.

Bei dieser Sachlage läßt sich ein Verständnis für den gegenwärtigen Stand der Frage nur dann erreichen, wenn man die historischen Grundlagen kennt, aus welchen er sich seit den sechs Jahren entwickelt hat, die auf Richets erste Publikation (1902) gefolgt sind.

Zunächst sei aber ausdrücklich betont, daß sich die folgenden Ausführungen lediglich auf jene Formen der Überemfindlichkeit beziehen, welche nach der Vorbehandlung mit heterologen Eiweißarten (Blutsera) entstehen.

Die Überempfindlichkeit gegen bakterielle Toxine wurde nicht berücksichtigt. Sie verdankt ihre Entdeckung v. BEHRING, der bei der Immunisierung größerer Tiere mit Diphtherietoxin schon 1893 die Wahrnehmung machte, daß trotz eines hohen Gehaltes des Blutes und der Gewebssäfte an Antitoxin doch eine außerordentliche Empfindlichkeit gegen dieses Gift bestehen kann. Als Beweis führte er (mit KITASHIMA) die Krankengeschichte eines Pferdes an, das infolge einer Injektion von Diphtherietoxin einging, trotzdem sein Blut reich an Antitoxin war, und ebenso sah BRIEGER eine Ziege an typischem Tetanus verenden, bei der die Milch und das Blut große Mengen des korrespondierenden Antitoxins enthielt.

Hierher gehört auch die von SALOMONSEN und MADSEN zuerst hervorgehobene und zahlenmäßig bewiesene Tatsache, daß gegen Diphtherie immunisierte Pferde auf Toxinquantitäten mit Krankheitserscheinungen reagieren, welche durch die Antitoxinmengen in ihrem Blute überkompensiert werden müßten, sowie das „paradoxe Phänomen" von KRETZ, der zeigen konnte, daß normale Tiere auf äquilibrierte Toxin-Antitoxingemische nicht reagieren, wohl aber aktiv immunisierte.

KNORR, namentlich aber v. BEHRING und KITASHIMA haben diese Toxinüberempfindlichkeit experimentell an kleineren Versuchstieren weitergeprüft und nachgewiesen, daß besonders Meerschweinchen bei aktiver Immunisierung mit Tetanus- oder Diphtheriegift hochgradig hypersensibel werden. Behandelt man diese Tiere z. B. mit wiederholten Injektionen kleinster Diphtherietoxindosen, so gehen sie schließlich auf $^1/_{700}$—$^1/_{800}$ der Dosis letalis minima ein, wobei eine Kumulativwirkung schon deshalb ausgeschlossen ist, weil die Gesamtmenge des einverleibten Giftes $^1/_{400}$ der tödlichen Dosis nicht übersteigt (v. BEHRING und KITASHIMA, zit. nach OTTO.)

v. BEHRING deutete diese paradoxe Überempfindlichkeit immunisierter Tiere gegen das betreffende Toxin als histogene Überempfindlichkeit und WASSERMANN adaptierte diese Vorstellung der EHRLICHschen Theorie, indem er annahm, daß die Avidität der im Blute kreisenden Antitoxine zum Toxin eine unveränderliche Größe darstellt, während die an den Zellen sitzenden Rezeptoren durch den Immunisierungsprozeß eine höhere Verwandtschaft zum Toxin erwerben; diese gesteigerte Gewebsavidität bei gleichbleibender Avidität der im Serum zirkulierenden Schutzstoffe betrachtet er als ausreichende Erklärung für die Tatsache, „daß Individuen an einem Toxin sterben können, trotzdem sie das entsprechende Antitoxin reichlich in ihrem Blute haben".

Es ist nun mehr als fraglich, ob man schon heute ein Recht besitzt, diese Toxinüberempfindlichkeit mit der Eiweißanaphylaxie ohne weiteres in Parallele zu setzen und beide als im Wesen identische Vorgänge zu betrachten.

Zwar haben neuerlich NICOLLE und POZERSKI bewiesen, daß das Serum von Meerschweinchen, die sie eine Zeitlang mit kleinsten Dosen ($^1/_{50}$ der Dos. let.) von Tetanus- oder Diphtherietoxin behandelt hatten, und die schließlich geringen, subletalen Giftmengen erlagen, also überempfindlich waren, mit der korrespondierenden Giftlösung eine spezifische Komplementablenkung nach BORDET-GENGOU lieferte, ebenso wie das

Serum der gegen Eiweiß anaphylaktischen Tiere mit der betreffenden Eiweißlösung.

Doch scheinen diese Versuche wenig zu beweisen. Man injiziert ja den Tieren nicht Toxin, sondern eine Giftbouillon, in der gelöste Bakterienleiber, Pepton, Albumosen, also Stoffe enthalten sind, welche auch Eiweißanaphylaxie auslösen. Noch entscheidender ist das Faktum, daß das Serum der gegen Toxin hypersensiblen Tiere Antitoxin enthält (s. o.), d. h. andere normale Tiere gegen die Vergiftung schützt, während das Serum der gegen Eiweiß anaphylaktischen Individuen gegen Eiweiß überempfindlich macht. Das ist denn doch ein fundamentaler Unterschied, auf den ich übrigens schon einmal hingewiesen habe.

Eine andere Stellung nimmt vielleicht die Tuberkulinüberempfindlichkeit ein, welche R. Koch bereits i. J. 1890 gefunden hat. Bei ihr sind die Analogien mit der Eiweißanaphylaxie viel ausgeprägter. Doch hat dieses Thema schon in anderen Kapiteln des Handbuches (Löwenstein, v. Pirquet) eine eingehende Bearbeitung erfahren; zudem ist der Nachweis der passiven Übertragung der Tuberkulinüberempfindlichkeit noch nicht erbracht (die Arbeit von Yamanouchi stellt nur einen ersten, vorläufig unbestätigten Versuch dar) und wäre es demnach verfrüht, theoretische Erwägungen über das Verhältnis dieser Art der Hypersensibilität zur Serumanaphylaxie anzustellen.

Ebensowenig kann hier auf die Überempfindlichkeit gegen Reinfektionen, insbesondere auch gegen die Revaccination eingegangen werden. Über die Anaphylaxie gegen Bakterieneiweiß siehe weiter unten.

Den Beginn der Untersuchungen über Eiweißanaphylaxie kann man mit Recht auf Richet zurückführen.

Otto zitiert allerdings in seiner jüngsten zusammenfassenden Darstellung zwei einschlägige Beobachtungen aus früherer Zeit. Nach Morgenroth hat nämlich Magendi schon im Jahre 1839 bemerkt, daß Kaninchen, welche eine zweimalige intravenöse Injektion von Eiweiß ohne Schaden vertragen hatten, bei einer weiteren, nach einer Reihe von Tagen ausgeführten Injektion sofort erlagen. Ferner soll Flexner (nach Lewis) 1894 konstatiert haben, daß Tiere zwar eine einmalige Einspritzung von Hundeserum vertragen, bei der zweiten, nach Tagen oder Wochen vorgenommenen jedoch verenden, und zwar nach Dosen, welche für die Kontrollen nicht tödlich waren.

Endlich hat Richet selbst in Gemeinschaft mit Héricourt schon 1898 die Tatsache festgestellt, daß bei der Immunisierung von Hunden mit giftigem Aalserum statt Immunität Überempfindlichkeit eintritt und daß die Tiere nach wiederholten Injektionen zugrunde gehen.

Doch blieben diese Angaben sowie viele spätere vereinzelte Mitteilungen aus dem Zeitraum zwischen 1902—1905 (Menzer, Batelli, Rostoski, Dehne und Hamburger, Saeli) unbeachtet; das Gesetzmäßige der Erscheinung wurde jedenfalls zuerst von Richet erkannt.

Richet arbeitete gemeinschaftlich mit Portier mit einem hochgiftigen Eiweißkörper, den er aus den Tentakeln von Aktinien durch Mazeration gewann. Er erhielt auf diese Art eine Flüssigkeit, von welcher 0,2 g pro kg Körpergewicht Hunde nach einem bis zwei Tagen bei intravenöser Injektion töteten. Kleinere Dosen, z. B. 0,1 g, riefen bei normalen Hunden nur geringfügige krankhafte Symptome hervor; dagegen erwiesen sich solche mit subletalen Mengen vorbehandelte Tiere

nach einem Zeitraum von drei Wochen gegen eine neuerliche Injektion so kleiner Dosen äußerst empfindlich, bekamen schon nach wenigen Sekunden Dyspnoe, Diarrhöe, Erbrechen und verendeten innerhalb der ersten Stunde.

Richet erkannte, daß diese Erscheinungen im prinzipiellen Gegensatz zu den prophylaktischen oder Schutzwirkungen stehen, welche man bisher bei der Immunisierung mit giftigen Antigenen zu sehen gewohnt war, und nannte sie daher anaphylaktische.

Es gelang später Richet, das anaphylaktisierende Prinzip aus den Tentakeln der Aktinien in konzentrierter Form zu gewinnen.

Zu diesem Zwecke wurden die Tentakel teils in ganzem, teils in zerriebenem Zustande mit 10 % NaFl-Lösung durch 4—5 Tage mazeriert, die obenstehende klare Flüssigkeit dekantiert, durch Papier filtriert und die klaren Filtrate mit dem 4fachen Volumen 95 %igen Alkohols gefällt. Das Präzipitat wurde mit etwas Sodalösung (5:1000) zerrieben, wobei ein Teil in Lösung ging. Die Lösung wurde neuerlich mit Alkohol gefällt und das resultierende zweite Präzipitat über H_2SO_4 getrocknet. Es stellte ein weißes, vollkommen wasserlösliches Pulver dar und wurde von Richet selbst noch als unrein, weil Asche und Peptone enthaltend, bezeichnet.

Diese Substanz nannte Richet Kongestin. Sie zeigte gewisse Charaktere der Eiweißkörper, war durch Alkohol fällbar und so toxisch, daß die Dos. let. min. pro Kilogramm Hund 0,0042 g, pro Kilogramm Kaninchen 0,009 g betrug. Die Vergiftungssymtome bestanden in Erbrechen, Diarrhöe und fortschreitender Respirationslähmung, der anatomische Befund der verendeten Tiere ergab eine hochgradige, bis zu ausgedehnten Hämorrhagien gesteigerte, kongestive Hyperämie der Wände des Verdauungstraktes (daher die Bezeichnung „Kongestin").

Das Kongestin war nun der Träger der anaphylaktisierenden Wirkung. Mit subletalen Dosen vorbehandelte Hunde konnten schon durch 0,002 g, anaphylaktisierte Kaninchen durch 0,003 g getötet werden.

Richet stellte ferner für das Aktinieneiweiß mehrere Gesetze fest, welche heute allgemeine Giltigkeit für sämtliche anaphylaktische Erscheinungen erlangt haben und zwar:

1. Die Notwendigkeit eines entsprechenden Zeitintervalles zwischen der ersten (sensibilisierenden) und der zweiten Injektion, durch welche das Bestehen der Anaphylaxie geprüft wird.

2. Die überraschend lange Dauer der Hypersensibilität (bis zu 7 Wochen).

3. Den raschen Eintritt und den beschleunigten Ablauf der Symptome beim überempfindlichen Tiere.

4. Die Unabhängigkeit der anaphylaktisierenden Wirkung von der Größe der ersten Dosis.

5. Die Tatsache, daß die anaphylaktisierende Substanz des Aktinienextraktes, welche er Kongestin nannte, durch Eiweißfällung (mit Alkohol) aus ihren Lösungen gewonnen werden kann, also wohl an Eiweiß gebunden ist.

Daß es sich aber hier um Wirkungen handle, welche allen körperfremden Eiweißarten zukommen, entging Richet völlig. Auch bargen seine Versuche eine Fehlerquelle, welche durch die Wahl eines primär hochtoxischen Eiweißkörpers bedingt war. Das Aktinieneiweiß stellt nämlich ein komplexes Antigen dar, welches neben dem spezifischen sensibilisierenden Eiweiß ein besonderes immunisierendes Toxin enthält.

Dementsprechend mußten auch die Immunvorgänge komplizierter Natur sein und Interferenzerscheinungen von antitoxischer Immunität gegen die giftige Komponente und von Anaphylaxie gegen das artspezifische Eiweiß aufweisen.

Allerdings hat RICHET schon in seinen ersten Arbeiten den Versuch gemacht, die Toxizität und die anaphylaktisierende Fähigkeit des Kongestins zu trennen.

Erhitzte RICHET wässerige Lösungen der Substanz durch 10 Min. auf 105° C, so stieg die Dos. let. min. pro Kilogramm Hund von 4 auf 15 mg, pro Kilogramm Kaninchen von 9 auf 26 mg. Nichtsdestoweniger setzte die Vorbehandlung mit dem erhitzten, wenig toxischen Präparat (Metakongestin) dieselbe Überempfindlichkeit gegen die Reinjektion subletaler Kongestindosen wie der primäre, nicht erhitzte, stark toxische Körper.

RICHET warf damals die Frage auf, ob mit Kongestin anaphylaktisierte Tiere nicht auch gegen die erhitzte Substanz sensibilisiert werden können, blieb aber die experimentelle Antwort leider schuldig.

Die Verhältnisse bei giftigen Eiweißarten wurden erst viel später durch neuere Versuche RICHETS mit Aktiniengift, besonders aber durch DOERR und RAUBITSCHEK beim Aalserum festgestellt.

Inzwischen wurde aber eine klarere Auffassung der anaphylaktischen Prozesse durch die Entdeckung von ARTHUS angebahnt, der nachwies, daß die Fähigkeit, eine spezifische Anaphylaxie zu erzeugen, ein generelles Charakteristikum aller heterologen, auch der ungiftigen Eiweißkörper, darstellt.

Das Phänomen von ARTHUS.

ARTHUS zeigte, daß Pferdeserum Kaninchen weder bei subkutaner, noch intraperitonealer oder intravenöser Injektion schädigt, daß aber wiederholte Einspritzungen krankhafte Symptome auszulösen vermögen.

Bei subkutanen, in sechstägigen Intervallen ausgeführten Injektionen wurde das Serum nur die ersten drei Male binnen einigen Stunden resorbiert, nach der vierten Injektion entstand ein weiches, 2—3 Tage persistierendes Infiltrat, nach der fünften ein härteres, fünf Tage währendes, nach der siebenten Injektion, bisweilen auch früher, wurde die Haut an der betreffenden Stelle gangränös, und nach der langsamen Sequestration blieb ein tiefes, schwer vernarbendes Geschwür zurück.

Wurden aber subkutan oder intraperitoneal vorbehandelten Kaninchen 2 ccm Pferdeserum in eine Ohrvene injiziert, so traten fast augenblicklich schwere Symptome auf, in vielen Fällen der Exitus.

Schon nach einer Minute wurden die Tiere ängstlich, unruhig, legten sich auf den Bauch, die Respirationsfrequenz stieg auf 200—250, es wurden reichlich fäkale Massen entleert, endlich legten sich die Tiere auf die Seite, zogen den Kopf nach hinten, machten Laufbewegungen und verendeten nach vier oder fünf tiefen terminalen Atemzügen. Das Intervall zwischen Reinjektion und Exitus betrug 2—3 Min.

Doch sah ARTHUS, daß sich manche Tiere, die bereits für verloren gehalten wurden, in überraschend kurzer Zeit erholten und erst nach Wochen an fortschreitender Kachexie eingingen.

Auch das Meerschweinchen und die Ratte ließen sich mit und für Pferdeserum anaphylaktisieren.

Mit entfetteter und bei 110° sterilisierter Kuhmilch konnte ARTHUS gleichfalls Kaninchen überempfindlich machen, wobei ganz analoge Symptome auftraten. Dies gelang aber nur wieder für Kuhmilch; Pferdeserum hatte bei mit Kuhmilch vorbehandelten Kaninchen keine Wirkung und umgekehrt.

Die Serumanaphylaxie war also nach ARTHUS spezifisch.

Ähnliche Beobachtungen wie ARTHUS machte auch WOLFF bei wiederholten Injektionen von Pferdeserum.

Fast gleichzeitig mit ARTHUS veröffentlichten v. PIRQUET und SCHICK eine vorläufige Mitteilung, in welcher sie den Satz aufstellten, daß der mit gewissen pathogenen Substanzen vorbehandelte Organismus für längere Zeit die Fähigkeit behält, auf eine nochmalige Einwirkung desselben Agens schneller mit Krankheitserscheinungen zu antworten, bzw. den ganzen Prozeß in kürzerer Zeit durchzumachen. Unter diesen pathogenen Substanzen führen sie ausdrücklich das artfremde Serum an.

Zu diesen Schlüssen gelangten v. PIRQUET und SCHICK durch Beobachtungen an Menschen, welche wiederholt Injektionen von Pferdeserum erhalten hatten.

Wie bekannt reagieren viele Individuen schon auf die einmalige Einspritzung der antitoxischen Heilsera mit Fieber, Exanthemen, besonders Urticaria, Arthralgien, Odemen, Drüsenschwellungen usw. Daran ist nicht die antitoxische Komponente, sondern das Pferdeserum als solches schuld, da die Sera gesunder Pferde ähnliche Krankheitserscheinungen auszulösen vermögen (BOKAY, JOHANNESEN). v. PIRQUET und SCHICK haben den nach Injektion von Pferdeserum auftretenden Symptomenkomplex als „Serumkrankheit“ bezeichnet. Er entwickelt sich bei Erstinjizierten nur ausnahmsweise in unmittelbarem Anschlusse an die Injektion, gewöhnlich erst nach einer Latenz- oder Inkubationsperiode von 8—12 Tagen. Da von zahlreichen Personen, welche man mit dem gleichen Serum und gleichen Mengen behandelt, stets nur ein Teil erkrankt, so scheint die Serumkrankheit der Erstinjizierten auf einer individuellen Disposition zu beruhen, die man mit FREY als natürliche (angeborene?) Serumanaphylaxie oder Idiosynkrasie bezeichnen kann (siehe übrigens pag. 869).

Ganz anders verläuft die Serumkrankheit, wenn man ein Individuum ein zweitesmal mit Pferdeserum injiziert, und wenn das Intervall zwischen erster und zweiter Injektion nicht weniger als 12 Tage beträgt.

Bei einem Teil der Reinjizierten entwickeln sich die Symptome fast unmittelbar nach der Einverleibung des Serums. Schon nach einer Viertelstunde können Urticaria, Ödeme, Brechreiz, Kollapserscheinungen auftreten. Diese Form haben v. PIRQUET und SCHICK als sofortige Reaktion bezeichnet.

Nach dem Abklingen der sofortigen Reaktion vergeht ein freies Intervall von einigen Tagen. Am fünften oder sechsten Tage treten dann neuerliche Erscheinungen, wie Ödeme und Urticaria auf. v. PIRQUET und SCHICK nennen diese Attacke die beschleunigte Reaktion, da sie sich schon um den sechsten Tag post injectionem einstellt, während die Serumkrankheit der Erstinjizierten durch ein 8—12tägiges Latenzstadium charakterisiert ist.

Doch ist nicht jede Reinjektion von Pferdeserum von einer sofortigen und einer beschleunigten Reaktion gefolgt; nach einer neueren Zusammenstellung (v. PIRQUET) scheint diese Doppelreaktion sogar relativ selten zu sein, da sie in 91 Fällen nur 12mal zur Beobachtung

kam. In der Regel tritt nur eine Form auf und zwar soll es vom Intervall zwischen erster und zweiter Seruminjektion abhängen, ob sich die sofortige oder beschleunigte Reaktion entwickelt. v. Pirquet gibt darüber zahlenmäßige Aufschlüsse:

Intervall zwischen erster und zweiter Injektion	Reaktionen		
	nur sofortige	sofortige und beschleunigte	nur beschleunigte
10 Tage bis zu einem Monat	21	3	—
unter 6 Monaten	21	7	5
über 6 Monate	2	2	30

Die Umstimmung, welche der Organismus durch die Vorbehandlung mit pathogenen Substanzen erfährt, und welche sich in der geänderten Reaktion bei nochmaliger Zufuhr derselben ausdrückt, nannte v. Pirquet Allergie. Die Serumkrankheit der Reinjizierten gehört also in das Gebiet der allergischen Phänomene; die Allergie ist dabei nicht nur eine zeitliche (Verkürzung der Inkubation), sondern auch eine quantitative, d. h. die Reaktion tritt bei Reinjizierten auch schon nach kleinen Serummengen häufiger auf als bei Erstinjizierten (90% gegen 20%) und ist oft viel intensiver.

Klinisch findet man neben den erwähnten Allgemeinerscheinungen, welche zuweilen einen sehr bedrohlichen Charakter annehmen können, auch lokale Ödeme, jedoch nur bei der sofortigen Reaktion. Die durch die Injektion des Serums gesetzte Schwellung verschwindet nicht, sondern nimmt beständig zu, wobei eine Proportion zwischen einverleibter Serummenge und Ausdehnung der ödematösen Schwellung nicht besteht. Schon nach Injektion von 1 ccm in den Unterarm können sich äußerst schmerzhafte Ödeme binnen 12—20 Stunden entwickeln, welche bis über das Ellbogengelenk reichen. Nach 24 Stunden ist das Maximum erreicht; die Detumeszenz dauert 2—5 Tage. Manchmal findet sich auch eine geringe Schwellung und Empfindlichkeit der regionären Lymphdrüsen. Zu lokalen Nekrosen kommt es nur ganz ausnahmsweise.

Überblicken wir das Gesagte, so findeu wir eine fast völlige Analogie zu den Erfahrungen von Arthus an Kaninchen.

Die sofortige Lokalreaktion ist beim reinjizierten Menschen gleich den lokalen Ödemen der mehrfach mit Serum behandelten Kaninchen, die sofortige Allgemeinreaktion korrespondiert mit den stürmischen Symptomen bei intravenöser Seruminjektion der immunisierten Tiere. Nur der Serumkrankheit des erstinjizierten Menschen ähnliche Erscheinungen fehlen beim Kaninchen gänzlich.

Der weitere experimentelle Ausbau der Lehre von der Anaphylaxie erfolgte merkwürdigerweise nicht auf der von Arthus geschaffenen Basis, sondern durch die Analyse des sogenannten

Phänomens von Theobald Smith.

Theobald Smith hatte die Wahrnehmung gemacht, daß Meerschweinchen, welche vor einigen Wochen ein Gemenge von Diphtherie-

toxin + Antitoxin (also Pferdeserum) erhalten hatten und sich scheinbar wieder in völlig gesundem Zustande befanden, mit schweren Krankheitserscheinungen, ja plötzlichem Exitus reagierten, wenn man ihnen einige Kubikzentimeter normales Pferdeserum subkutan injizierte, während normale Tiere diesen Eingriff ohne jede sichtbare Störung vertragen.

Diese Tatsache wurde von allen Seiten bestätigt (OTTO, ROSENAU und ANDERSON, REMLINGER, GAY und SOUTHARD, BESREDKA und STEINHARDT, FREY u. a.). KRAUS und DOERR konstatierten dasselbe Verhalten bei Kaninchen, welche intravenös mit Diphtheriegift-Serumgemischen vorbehandelt waren.

OTTOS sorgfältige Versuche, welche die isolierte Wirkung der im Giftserumgemisch enthaltenen Faktoren auf das Zustandekommen des Phänomens bei den Meerschweinchen prüften, ergaben, daß weder die Toxine noch die Toxone der Diphtheriegiftlösungen für sich allein Anaphylaxie auszulösen vermögen, wohl aber eine **einmalige** Injektion von bloßem Pferdeserum.

Die Hypersensibilität der nach SMITH vorbehandelten Meerschweinchen trat ferner nur bei der Reinjektion von Pferdeserum hervor, nicht aber von Kaninchen-, Ziegen- oder Ochsenserum, war also wie das Phänomen von ARTHUS in bezug auf die Eiweißart spezifisch.

Durch den Nachweis, daß nicht nur wiederholte Seruminjektionen Anaphylaxie erzeugen, wie ARTHUS angegeben hatte, sondern daß schon eine einmalige Vorbehandlung genügt, eine Tatsache, die übrigens v. PIRQUET schon früher für Kaninchen feststellte, war es zur Evidenz erwiesen, daß das Phänomen von THEOBALD SMITH mit der von ARTHUS beschriebenen Erscheinung im Prinzipe identisch ist.

Auffällig ist nur, daß nach den Angaben von OTTO, GAY und SOUTHARD, REMLINGER, FREY, FRIEDEMANN, KINYOUN, LEWIS u. a. die Hypersensibilität der Diphtheriemeerschweinchen eine sehr hochgradige sein soll, ungleich stärker, als wenn man das entsprechende Serumvolumen allein zur Vorbehandlung verwendet hätte und daß Gemische anderer Gifte mit ihren korrespondierenden Antiseris keine der SMITHschen adäquate Überempfindlichkeit hervorrufen. Injiziert man z. B. Tetanustoxin + Tetanusserum (BESREDKA, FREY) oder Choleratoxin + Choleraserum, Meningokokkenextrakt + Meningokokkenserum (FREY), so bleibt die Anaphylaxie so gering wie nach einmaliger Vorbehandlung mit derselben Menge bloßen Serums.

Man darf aber hier in erster Linie nicht vergessen, daß genaue quantitative Versuche, welche einen Vergleich zwischen dem Grad der Anaphylaxie nach Diphtherieserumgemischen und bloßem Pferdeserum ermöglichen würden, bisher nicht vorliegen. Sowohl bei OTTO als bei FREY finden sich nur wenige, unter völlig identischen Bedingungen (gleiche Serummengen, gleiches Intervall zwischen erster und zweiter Injektion) ausgeführte Experimente. Solche vereinzelte Beobachtungen können aber, da der Grad der Anaphylaxie auch individuell stark variiert, zur Entscheidung nicht herangezogen werden.

Doch gewinnt man aus den Versuchen von OTTO und FREY immerhin den Eindruck, daß tatsächlich eine erhebliche Differenz in der Intensität der anaphylaktischen Erscheinungen bei Vorbehandlung mit Diphtherietoxin + Serum einerseits und reinem Serum andererseits besteht, und es fragt sich nur, wie man sich mit dieser Erscheinung abfinden soll.

Der Widerspruch ist ja eklatant: das Toxin allein erzeugt keine Spur von Anaphylaxie, das Serum ja, folglich ist die Sensibilisierung nur

durch das letztere bedingt. — Die Kombination des unwirksamen mit dem wirksamen Faktor soll nun eine Steigerung des Effektes zur Folge haben.

Otto hat zur Erklärung angenommen, daß die Körperzellen durch Spuren von Diphtherieresten — sei es Toxin oder Toxon — eine bestimmte Stimulation erfahren, welche sie für die Einwirkung des Serums besonders empfänglich machen, das will wohl besagen, daß die vergiftete Zelle leichter und stärker sensibilisiert werden kann als die normale.

Es ist aber noch eine andere Möglichkeit denkbar. Wie später erörtert werden soll, besteht heute kaum ein Zweifel, daß die anaphylaktischen Symptome durch Vorgänge an den Ganglienzellen der nervösen Zentralorgane bedingt sind. Nun wissen wir, daß das Diphtherietoxin auf diese Elemente einwirkt und können uns vorstellen, daß die durch das Gift geschädigte Zelle zwar genau so sensibilisiert wird wie eine normale, daß aber jener Vorgang, der durch die Reinjektion ausgelöst wird und dem anaphylaktischen Symptomenkomplex zugrunde liegt, lädierte Ganglienzellen ungleich stärker in Mitleidenschaft zieht als gesunde. Daß toxische Beeinflussungen dieser Zellen auf den Verlauf der anaphylaktischen Erscheinungen einwirken, geht ja aus der Beobachtung Besredkas hervor, wonach die Äthernarkose die Tiere schützt. Auch hier sind die Ganglienzellen zwar sensibel und es spielen sich an ihnen bei der Reinjektion dieselben Prozesse ab wie beim wachen Tiere; die Narkose verleiht ihnen aber eine Unempfindlichkeit, in der sie die sonst deletären Vorgänge besser überstehen. So wäre auch das umgekehrte Verhalten nicht absurd, wonach gewisse toxische Einflüsse die nervösen Elemente gegen den anaphylaktischen Vorgang, d. h. die bei der Reinjektion sich abspielenden Veränderungen labiler machen.

Darauf scheint auch eine Beobachtung, welche Kraus und Doerr machen konnten, hinzuweisen. Kaninchen, welche kompensierte **Dysenterie**-Toxin + Serumgemenge erhalten, sind gleichfalls oft hochgradig empfindlich. Nun wirkt ja das Dysenteriegift beim Kaninchen auf die nervösen Zentralorgane (Vaillard und Dopter, Doerr).

Die Versuche Freys, der an mit Dysenterietoxin + Antitoxin geimpften Mäusen keine Überempfindlichkeit konstatierte, beweisen nichts gegen diese Auffassung, da die Maus auf Dysenterietoxin ganz anders reagiert als das Kaninchen (Kraus und Doerr) und da Mäuse überhaupt nicht leicht anaphylaktisch zu machen sind. Ich habe mich wenigstens vergeblich bemüht, mit Aalserum, Pferde- oder Rinderserum weiße Mäuse zu sensibilisieren.

Jedenfalls besteht aber kein irgendwie gearteter Grund, der uns veranlassen könnte, die Phänomene von Smith und Arthus begrifflich zu trennen.

Dagegen spricht außer dem bereits Angeführten auch der Umstand, daß wiederholte Injektionen von reinem Pferdeserum die Anaphylaxie bis zu der von Smith bei Diphtheriemeerschweinchen beobachteten Höhe treiben (Otto).

Wählt man ferner nicht Pferdeserum, sondern durch einstündiges Erwärmen auf 60° C atoxisch gemachtes Rinderserum, so kann man vollends auch ohne Zuhilfenahme von Diphtherietoxin durch einmalige Sensibilisierung höchstgradige Anaphylaxie provozieren, wie der folgende Versuch beweist:

Meer-schweinch. Nr.	Vorbehandelt subkutan m. Rinderserum	Reinjektion		Applikations-modus	Resultat
		nach Tagen	Dosis		
210	0,01 ccm	21	6,0 ccm	intraperiton.	Schwerste Symptome.
95	0,01 „	21	6,0 „	do.	do., nach 20 Std. †
219	0,01 „	21	6,0 „	do.	Schwerste Symptome, nach 3 Std. †
40	0,01 „	22	6,0 „	do.	do. do.
114	0,01 „	22	0,2 „	intracerebral	Schwerste Symptome.
104	0,02 „	22	0,25 „	do.	nach 25 Min. †
74	0,02 „	22	6,0 „	intraperiton.	Schwerste Symptome, in der folgd. Nacht †
85	0,02 „	22	0,25 „	intracerebral	Schwerste Symptome.
179	0,02 „	22	6,0 „	intraperiton.	do.
174	0,02 „	22	0,25 „	intracerebral	do.

Auch hat Lewis in letzter Zeit darauf aufmerksam gemacht, daß die nach Smith vorbehandelten und mit Pferdeserum subkutan reinjizierten Meerschweinchen in manchen Fällen nur leichte Allgemeinsymptome darbieten, daß sich aber bei ihnen ausgedehnte Ödeme entwickeln, welche von der Injektionsstelle aus fortschreiten und in Nekrosen übergehen, wenn die Tiere nicht schon früher verenden. Es fehlen also auch beim Meerschweinchen nicht die von Arthus beim Kaninchen beobachteten lokalen Überempfindlichkeitserscheinungen.

Wenn von den meisten Autoren solche Meerschweinchen zu ihren Experimenten über Anaphylaxie herangezogen wurden, welche früher Diphtherietoxin + Serum erhalten hatten, so liegt übrigens der Grund nicht allein darin, daß solche Tiere auf die Reinjektion stärker reagieren, sondern wohl in dem Umstande, daß dieses Material in allen Instituten, in denen Wertbestimmungen von Diphtherieheilserum vorgenommen werden, in größtem Ausmaße zur Verfügung steht.

Nach diesen einleitenden Bemerkungen soll das bisher Bekannte hauptsächlich vom technisch-experimentellen Standpunkte besprochen werden.

Natürliche und künstliche Anaphylaxie.

Wir können wie bei den verschiedenen Arten der Immunität auch bei der Anaphylaxie eine natürliche (angeborene, konstitutionelle) Form und eine künstliche (erworbene) unterscheiden.

In das Gebiet der natürlichen Anaphylaxie fallen alle jene krankhaften Erscheinungen, welche sich bei manchen Individuen nach stomachaler oder einmaliger parenteraler Einverleibung heterologer Eiweißarten einstellen. Sie sind unter dem Namen der Idiosynkrasien bekannt. So bekommen gewisse Leute nach dem Genusse von Krebsen, Hühnereiern (ich selbst, vgl. ferner Horwitz*)), Schweinefleisch (eigene

*) Eine besonders schöne Beobachtung dieser Art, welche Schofield zu machen Gelegenheit hatte, sei hier angeführt. Ein 13jähriger Knabe erkrankte regelmäßig nach dem Genusse von Eiern oder solchen Speisen, welche auch nur geringe Beimengungen von Eiern enthielten, mit Speichelfluß, Brennen an den Lippen, Zucken

Beobachtung) starke Koliken, Exantheme, Fieber, allgemeines Unwohlsein u. dergl.

Auch die Serumkrankheit der Erstinjizierten fällt vielleicht unter diesen Gesichtspunkt.

Dagegen beruht die Überempfindlichkeit gegen gewisse chemisch definierte Gifte (Halogene, Chinin, Salizylsäure, Quecksilber) wohl auf anderen Ursachen und ist wenigstens vorläufig von der natürlichen Eiweißidiosynkrasie abzutrennen.

Der Mechanismus der natürlichen Anaphylaxie ist ebenso wie der der natürlichen Immunität völlig dunkel. Zweifellos ist sie nicht immer angeboren, sondern kann erst im Verlaufe des Lebens eintreten, wofür zuverlässige eigene Beobachtungen sprechen.

Desto mehr wissen wir über das Wesen und das Zustandekommen der **künstlichen Anaphylaxie**.

Sie entsteht durch Vorbehandlung mit heterologen, körperfremden Eiweißarten, und zwar in der Regel nur dann, wenn diese parenteral zugeführt werden, und ist in hohem Grade spezifisch.

Man hat sie bisher nur bei Säugetieren beobachtet und zwar beim Menschen (v. Pirquet und Schick, Marfan, Lemaire, Otto, Currie, Flexner, Klemperer und viele andere), bei Pferden (Kraus), Hunden (Richet), Ziegen (Kraus und v. Stenitzer, Kraus und Doerr), Kaninchen (Arthus, v. Pirquet und Schick, Nicolle, Wolf, Kraus, Doerr und Sohma), bei Meerschweinchen (Smith, Otto, Besredka und Steinhardt, Rosenau und Anderson, Remlinger, Frey, Kraus und Doerr, Vaughan und Wheeler, Doerr und Raubitschek, Vasconcellos, Weil-Hallé und Lémaire usw.), bei Ratten (Arthus). Nur bei weißen Mäusen gelang es mir bisher trotz vielfach variierter Versuche nicht, Anaphylaxie zu erzeugen; ebenso wenig glückte dies Frey.

Das klassische Versuchstier für anaphylaktische Studien ist das Meerschweinchen, in zweiter Linie das Kaninchen.

Bei den Meerschweinchen zeigen sich, und es ist wichtig, auf diesen Punkt stets zu achten, ganz erhebliche individuelle Differenzen. Wenn man eine Reihe von Tieren gleichartig vorbehandelt und nach derselben Zeit sowie mit derselben Methode ihre Hypersensibilität prüft, so ergeben sich recht auffallende Unterschiede; ein Teil zeigt leichte, ein anderer schwerste Krankheitserscheinungen, die bisweilen zum raschen Exitus führen, ein oder das andere Tier endlich zeigt kein von der Kontrolle abweichendes Verhalten. Diese Unregelmäßigkeit tritt in allen anaphylaktischen Versuchen störend zutage, allerdings nicht immer in gleichem Grade.

Noch viel größer als diese individuellen Schwankungen machen sich Rassedifferenzen bemerkbar.

Vasconcellos prüfte in Manguinhos bei einer Reihe von Meerschweinchen, die nach Smith sensibilisiert waren, die Anaphylaxie durch

---

am Körper, Urticaria und asthmatischen Beschwerden. Diese Anfälle traten auch ein, wenn er keine Kenntnis davon hatte, daß in den Speisen Eieralbumin vorhanden war, so daß an eine Suggestion nicht gedacht werden konnte. Er wurde mit Pillen behandelt, die anfangs minimale Mengen ($^1/_{10000}$) Eiweiß und Calciumlaktat enthielten. Nach allmählicher Steigerung der Dose und mehrmonatlicher Behandlung wurde schließlich Toleranz für den Genuß von Eiern erzielt.

Schofield erwähnt auch einen Fall von Hutchinson, wo sich nach Genuß von Eiern oder eiweißhaltigen Speisen Lähmung der Akkomodation neben Hitzegefühl im Magen und Unbehagen im Bauche einstellte.

intrazerebrale Reinjektion von Pferdeserum (Methode von BESREDKA-STEINHARDT). Kein einziges bot deutliche Krankheitssymptome. Da Sera aus Paris und Deutschland ebensowenig Erfolg hatten, so konnte die Ursache nur in der Rasse der Tiere liegen. In der Tat reagierten argentinische Meerschweinchen, die sich der Autor zusenden ließ, mit allen genannten Seris prompt.

Diese Rassedifferenzen erklären wenigstens teilweise die trotz gleicher Versuchstechnik recht verschiedenen Berichte verschiedener Autoren über die Häufigkeit deutlich anaphylaktischer Symptome, besonders aber des akuten Todes auch bei gleichartig sensibilisierten Meerschweinchen.

OTTO gibt z. B. an, daß nach subkutaner Reinjektion von 6 ccm Pferdeserum 50 % Todesfälle zu verzeichnen sind, während bei der anderen Hälfte schwere Krankheitssymptome auftreten. (Vorbehandlung mit Gift und Serum).

ROSENAU und ANDERSON sahen selbst nach einmaliger Sensibilisierung mit bloßem Serum den T o d f a s t r e g e l m ä ß i g in einigen Minuten erfolgen, wenn sie 10—12 Tage später 0,1 ccm Serum nachinjizierten.

REMLINGER fand bei lediglich mit Serum behandelten Meerschweinchen nur bei etwa 7 % K r a n k h e i t s e r s c h e i n u n g e n, bei Giftserumtieren in 13 % der Fälle.

BESREDKA und STEINHARDT konnten bei subkutaner oder peritonealer Prüfung des anaphylaktischen Zustandes die Todesziffern von ROSENAU und ANDERSON gleichfalls nicht erreichen, ja nicht einmal die von OTTO.

Als a n a p h y l a k t i s i e r e n d e s A n t i g e n (Sensibilisinogen) kann man alle möglichen Eiweißarten verwenden.

Zunächst die verschiedenen Sera (Pferdeserum, Rinderserum, Aalserum), ferner Hühnereiweiß (VAUGHAN und WHEELER), eiweißhaltige Flüssigkeiten, z. B. Milch (ARTHUS, BESREDKA), Extrakte aus Tierleibern, wie Aktinien, Mytilus edulis (Aktino- und Mytilokongestin RICHETS), Körperzellen wie Erythrozyten, Spermatozoen und Organextrakte (WOLFF-EISNER), zerriebene Augenlinsen (KRAUS, DOERR und SOHMA), Eiweißpräparate (Peptone nach ROSENAU und ANDERSON), Pflanzeneiweiß (Bohnenextrakt nach Beobachtungen von RAUBITSCHEK), Bakterieneiweiß (ROSENAU und ANDERSON, WOLFF-EISNER, KRAUS und DOERR, KRAUS und v. STENITZER), Hefezellen (ROSENAU und ANDERSON, AXAMIT) usf.

Auch erhitzte (BESREDKA) oder chemisch veränderte Eiweißkörper vermögen noch Hypersensibilität hervorzurufen. Doch darf der Abbau des Eiweißmoleküls nicht allzuweit vorgeschritten sein. So erhielten ROSENAU und ANDERSON mit Peptonen nur schwache, mit Tyrosin und Leucin dagegen überhaupt keine Anaphylaxie.

Am besten studiert ist jedenfalls die

S e r u m a n a p h y l a x i e.

In der weitaus überwiegenden Zahl der Arbeiten gelangte P f e r d e s e r u m zur Verwendung, wohl wegen des praktischen Interesses, welches die Anaphylaxie gegen Pferdeserum für die therapeutische und prophylaktische Anwendung der Heilsera am Menschen bietet. Als Versuchstier diente fast ausschließlich das Meerschweinchen.

Der **anaphylaktische Grundversuch** zerfällt in zwei Phasen: 1. Die Vorbehandlung (Sensibilisierung), 2. die nach einer entsprechenden Zeit ausgeführte Reinjektion, durch welche man das Bestehen der Hypersensibilität (des anaphylaktischen Zustandes) nachweist; man kann sie zweckmäßig als Probe bezeichnen („épreuve" der französischen Autoren).

1. Zur Sensibilisierung genügt eine einmalige Injektion von Pferdeserum oder nach Theobald Smith eines Gemenges von antitoxischem Pferdeserum mit Diphtherietoxin. Frey hat, wie von vornherein zu erwarten war, nachgewiesen, daß auch subletale Diphtherietoxinmengen gemischt mit Normalpferdeserum Hypersensibilität erzeugen.

Die Sensibilisierung nach Smith (oder Frey) gibt nach dem übereinstimmenden Zeugnis der meisten Autoren bessere Resultate, als die einmalige Injektion bloßen Pferdeserums. Im ersten Falle sind die bei der Probe auftretenden Krankheitserscheinungen heftiger, der Prozentsatz der akut eingehenden Tiere hoch (50 % nach Otto), im zweiten Falle zeigen die Meerschweinchen bloß charakteristische Dyspnoe, erholen sich aber relativ bald, ohne akut zu verenden. Will man bloß mit Pferdeserum sensibilisieren und hohe Grade von Anaphylaxie erzielen, so empfiehlt es sich, wiederholte Injektionen kleinster Dosen anzuwenden (Otto).

Die für die sensibilisierende Injektion erforderlichen Serummengen sind äußerst gering.

Verwendet man Meerschweinchen, welche mit Diphtherietoxin + antidiphtherischem Pferdeserum vorbehandelt sind, d. h. Tiere, welche zur Wertbestimmung des Diphtherieheilserums gedient hatten, so sind die sensibilisierenden Serumdosen naturgemäß sehr klein. Sie bewegen sich bei dem üblichen Prüfungsmodus nach Ehrlich zwischen 0,001—0,04.

Anaphylaktisiert man mit reinem Pferdeserum, so reichen ebenfalls minimale Mengen aus. Nach Rosenau und Anderson erhält man mit 0,001—0,004 ccm regelmäßig Überempfindlichkeit; doch genügte in einem Falle, den diese Autoren beobachteten, bereits 0,000001 ccm, um ein Meerschweinchen deutlich anaphylaktisch zu machen.

Injiziert man mittlere oder große Dosen (4—10 ccm), so entwickelt sich gleichfalls der überempfindliche Zustand; während aber die Anaphylaxie nach minimalen Mengen (0,0025—0,03) schon nach 12 Tagen nachweisbar, nach 18 Tagen völlig typisch ist (Otto), muß man nach mittleren oder großen Dosen mehrere Wochen, ja Monate verstreichen lassen, wenn das Experiment gelingen soll (Otto, Rosenau und Anderson, Gay und Southard, Besredka).

Die sensibilisierende Seruminjektion kann auf verschiedenem Wege ausgeführt werden. Zunächst subkutan, wie dies bei Vorbehandlung mit Diphtherietoxin + Serum nach Smith regelmäßig der Fall ist, dann aber auch intraperitoneal (Otto) oder direkt in die Blutbahn; so konnten Rosenau und Anderson Meerschweinchen durch intrakardiale Seruminjektion sensibilisieren.

Nach intrazerebraler Seruminjektion soll dagegen, wie Besredka und Steinhardt angeben, die Anaphylaxie ausbleiben; doch verwendeten diese Autoren nur in einem Falle 0,00025 ccm, sonst stets 0,000025 ccm Serum, also Mengen, welche auch bei subkutaner Applikation meist nicht mehr aureichen. In der Tat konnten Rosenau und Anderson zeigen, daß $^1/_{100000}$ ccm Serum intrazerebral injiziert wohl keine Anaphylaxie hervorruft, daß man aber bei Mengen von $^1/_{10000}$ ccm und darüber positive Resultate erhält. Der Einwand von Besredka, daß es sich hier

nicht um eine reine Sensibilisierung vom Gehirn, sondern von der Blutbahn aus handeln kann, ist allerdings berechtigt; doch ist nicht einzusehen, wie man diese Eventualität experimentell ausschließen soll.

Sehr bemerkenswert ist die von ROSENAU und ANDERSON gefundene Möglichkeit, Meerschweinchen auch vom Darme aus zu sensibilisieren. Füttert man mit Pferdefleisch oder führt man Pferdeserum mit der Sonde in den Magen ein, so werden die Tiere anaphylaktisch gegen Pferdeeiweiß. Doch muß man dies öfter wiederholen; eine einmalige Fütterung hat keinen Erfolg (ROSENAU und ANDERSON, MC. CLINTOCK und KING). Desgleichen kann man mit Rindfleisch gegen Rinderserum anaphylaktisieren. Diese enterale Anaphylaktisierung gelingt bei Herbivoren leicht, bei Omnivoren oder Karnivoren dagegen schwer; sie wirft ein Licht auf die Ätiologie der natürlichen Anaphylaxie, nicht nur der Idiosynkrasien, sondern vielleicht auch der Serumkrankheit der Erstinjizierten. Doch entbehren diese vermuteten Zusammenhänge vorläufig noch des experimentellen Beweises.

2. Nach der sensibilisierenden Injektion muß eine gewisse Zeit verstreichen, bevor die Anaphylaxie nachweisbar wird. Man kann sie als Inkubation oder als präanaphylaktische Periode bezeichnen.

Ihre Dauer variiert zunächst, wie schon angedeutet, nach der einverleibten Serummenge. Injiziert man Diphtherietoxin + Serumgemische (THEOBALD SMITH) oder minimale Serumdosen (0,001—0,01) allein, so währt es nach OTTO 18 Tage, bis die Überempfindlichkeitsreaktion (Probe) typisch ausfällt. Am 11. Tage nach der Vorbehandlung mit minimalen Dosen Pferdeserum war bei OTTO Hypersensibilität noch nicht vorhanden. ROSENAU und ANDERSON erhielten, wenn sie die Probe auf das Bestehen der Anaphylaxie am 10. oder 11. Tage vornahmen, nur leichte Krankheitserscheinungen; die ersten Todesfälle sind in ihren Protokollen am 12. resp. 17. Tage verzeichnet. GAY und SOUTHARD beziffern die Inkubationszeit für die Anaphylaxie nach kleinsten Serummengen im Mittel auf 14—15 Tage, BESREDKA im Minimum auf 12 Tage.

. Verwendet man mittlere oder große Serumquantitäten zur ersten Injektion, so dauert es dagegen mehrere Wochen, ja Monate, bevor die Anaphylaxie überhaupt manifest gemacht werden kann (OTTO, ROSENAU und ANDERSON, GAY und SOUTHARD). Setzt man aber zu größeren Mengen von Normalserum subletale Dosen Diphtherietoxin, so scheint dies einen beschleunigenden Einfluß auszuüben. Wenigstens kann man diesen Schluß aus manchen Versuchen FREYS ziehen. Von zwei Tieren, die je 2 ccm Normalserum erhalten hatten, reagierte eines bei der Probe nach 17 Tagen gar nicht, das andere Tier war „leicht krank“; zwei andere Meerschweinchen bekamen 2,0 Normalserum + 0,001 bezw. 0,012 Diphtherietoxin; bei der (in gleicher Weise vorgenommenen) Probe nach 15 Tagen starb das eine nach 10 Min., das zweite nach 1 Stunde.

Die Dauer des Inkubationsstadiums soll nach ROSENAU und ANDERSON auch abhängen von der Art der Serumapplikation; in einer neueren Arbeit geben sie an, das subkutan sensibilisierte Tiere schon nach ca. 7 Tagen, intrazerebral sensibilisierte erst nach ca. 9 Tagen anaphylaktisch werden. Gegenüber diesen präzisen Ziffern macht aber BESREDKA geltend, daß das Auftreten der Anaphylaxie bei gleich vorbehandelten Meerschweinchen großen individuellen Schwankungen unterworfen sei, die er darauf zurückführt, daß die Resorption des Serums vom subkutanen Bindegewebe aus bei verschiedenen Tieren ungleich schnell stattfindet.

Dagegen ist ein anderer Faktor sicher von großem Einfluß auf die Länge der Inkubation; das ist die chemische Beschaffenheit des sensibilisierenden Eiweißkörpers. So haben Gay und Adler durch fraktionierte Fällung von Pferdeserum mit Ammonsulfat und Äther Substanzen erhalten, die sie als Euglobuline bezeichnen; Meerschweinchen, welchen sie hinreichende Mengen dieser Stoffe injizierten, wurden gegen Pferdeserum anaphylaktisch und zwar bereits nach 4—5 Tagen. Doerr und Raubitschek fällten Pferdeserum mit Kohlensäure und sensibilisierten eine Reihe von Meerschweinchen mit dem gereinigten Präzipitat, eine zweite mit dem von den Präzipitatresten befreiten ungefälltem Serumanteil. Von der ersten Serie war kein Tier am 22. Tage anaphylaktisch gegen Pferdeserum, von der zweiten alle.

Kommt es darauf an, bei der Probe deutliche anaphylaktische Erscheinungen zu erzielen, so empfiehlt es sich, nach der Vorbehandlung mit kleinen Dosen drei Wochen verstreichen zu lassen; dieser Zeitraum hat sich mir wenigstens bei allen Versuchen bewährt, bei denen native, chemisch nicht veränderte Eiweißkörper als Antigene benützt wurden.

Schließlich muß man auch noch berücksichtigen, daß die Probe, d. h. die Reinjektion von Serum verschieden ausgeführt werden kann, und daß die Symptome viel intensiver ausfallen, wenn man intravenös, als wenn man subkutan reinjiziert (s. unten). Daher kommt es, daß man bei intrakardialer Nachprüfung schon am 6. bis 9. Tag, bei subkutaner meist nicht vor dem 18. deutliche Erscheinungen erzielt; die Meerschweinchen sind natürlich in beiden Fällen gleich anaphylaktisch, aber der Prüfungsmodus ist im ersteren Fall imstande, auch eine leichte, erst in der Entwicklung begriffene Anaphylaxie manifest zu machen, im letzteren Falle eben nicht.

Ist die Anaphylaxie einmal entwickelt, dann hält sie sehr lange an. Schon Richet fand die mit Aktinokongestin vorbehandelten Hunde noch nach 7 Wochen deutlich überempfindlich; Rosenau und Anderson konstatierten aber das Bestehen der Anaphylaxie bei sensibilisierten Meerschweinchen sogar bis zu 732 Tagen, und auch diese Beobachtung stellt sicher noch nicht das Maximum dar. Currie studierte einen Fall von Serumanaphylaxie beim Menschen, wo noch 1817 Tage nach der ersten Injektion ein schwerer, typischer Symptomenkomplex durch neuerliche Einverleibung von 27 ccm Pferdeserum ausgelöst wurde.

Die **Probe**, ob das sensibilisierte Tier wirklich überempfindlich ist („épreuve“ der französischen Autoren) erfolgt durch Reinjektion der zur Vorbehandlung benützten Eiweißlösung*). Da man bisher, wie betont, meist mit Pferdeserum sensibilisierte, so wurde die Probe auch in der Regel mit diesem Stoff vorgenommen.

Die Probeinjektion kann erfolgen: 1. Subkutan (Smith, Otto); 2. intraperitoneal (Rosenau und Anderson); 3. intracerebral (Besredka); 4. intravenös (Kraus und Doerr, Kraus und v. Stenitzer, Kraus,

---

*) Heilner gibt an, daß er bei mit Pferdeserum sensibilisierten Kaninchen anaphylaktische Symptome und plötzlichen Exitus auch durch Injektion bloßer hypertonischer Kochsalzlösung (4 %) erzielen konnte. Frey hatte mit einer analogen Versuchsanordnung bei Meerschweinchen keinen Erfolg. Indes sind die von ihm benützten Dosen 4 %iger NaCl-Lösung zu gering ($^1/_{58}$ des Körpergewichtes); Heilner injizierte bedeutend größere Mengen ($^1/_7$ des Körpergewichtes). Bestätigungen der Heinerschen Experimente fehlen zur Zeit; ob seine Beobachtungen mit der hochspezifischen Eiweißanaphylaxie, die bei intravenöser Probe schon durch 0,01 ccm manifest wird, in Zusammenhang steht, ist jedenfalls noch sehr fraglich.

DOERR und SOHMA, DOERR und RAUBITSCHEK); 5. intrakardial (GAY und SOUTHARD, ROSENAU und ANDERSON, LEWIS).

Bei subkutaner oder intraperitonealer Probe sind große Serummengen (5–6 ccm) notwendig, um schwere Krankheitserscheinungen und akuten Tod (in $^1/_2$—2 Stunden) herbeizuführen; nach kleineren Mengen sind die Symptome geringgradiger, der Exitus bleibt meist aus (OTTO).

Für die intracerebrale oder intravenöse Prüfung genügen viel kleinere Quantitäten (0,25—0,008 ccm*)); die Erscheinungen verlaufen viel stürmischer, der Tod erfolgt öfter (bis zu 50 % der Versuchstiere) und meist schon nach wenigen Minuten.

Injiziert man intracerebral, so ist die Trepanation notwendig; doch wird die kleine Operation samt der Injektion von $^1/_4$ ccm Serum von nicht sensibilisierten Kontroll-Meerschweinchen anstandslos vertragen (BESREDKA).

Die sehr empfehlenswerte und eine viel exaktere Dosierung gestattende intravenöse Injektion wird am Kaninchen in die Ohrvene, am Meerschweinchen in eine Jugularis vorgenommen. In letzterem Falle werden die Tiere (am Rücken liegend) aufgespannt, die Jugularis einer Seite freigelegt und durch zwei kleine Sperrpinzetten oben und unten abgeklemmt. Dann sticht man die Spritze, welche keine Luft enthalten darf (Glaskolben!) in die Jugularis ein, lüftet die zentrale Klemme, und injiziert unter gelindem Druck die Flüssigkeit. Im Momente des Herausziehens der Kanüle faßt der Gehilfe mit der Sperrpinzette die Einstichstelle, welche mit steriler Seide ligiert wird. Die Hautwunde wird mit MICHELschen Klammern verschlossen. Diese Operation ist jedenfalls schonender als die Trepanation, man hat kein Zurückfließen der Flüssigkeit zu befürchten und die ganze Sache dauert bei entsprechender Übung nur wenige Minuten.

Die intrakardiale, zuerst von MORGENROTH für andere Zwecke empfohlene Injektion, ist jedenfalls technisch viel schwieriger als die eben geschilderte intravenöse und stellt an und für sich einen nicht unbedenklichen Eingriff dar.

War das Meerschweinchen überempfindlich, so entwickelt sich fast unmittelbar nach der Probeinjektion ein höchst charakteristisches Bild:

---

*) Nach den Untersuchungen BESREDKAs variieren je nach der Beschaffenheit der Sera die zur Tötung hypersensibler Meerschweinchen bei intracerebraler Probe nötigen Mengen. BESREDKA bezeichnet die Fähigkeit eines Serums, beim anaphylaktischen Tiere Symptome auszulösen, als seine Toxizität und dosiert diese nach dem Volumen, welches bei intracerebraler Probe zur Tötung erforderlich ist. Hochtoxische Sera töten hypersensible Tiere schon in Mengen von $^1/_{128}$ ccm; bei den am wenigsten toxischen braucht man $^1/_4$ ccm und zwischen diesen Extremen existieren alle Übergänge.

Sera von Pferden, welche unter gleichen Bedingungen leben, besitzen gleiche Toxizität; die individuellen Schwankungen sind selten und unbedeutend.

Dagegen hängt die Toxizität von dem Alter der Sera ab. Am Tage des Aderlasses ist die Toxizität am höchsten, sinkt dann rasch bis zum 10. Tage und hierauf langsam bis zum 60. Tage.

Ein zweiter Faktor, der die Toxizität bestimmt, ist die Provenienz des Serums. So sollen nach BESREDKA die amerikanischen und russischen Sera giftiger sein als die Frankfurter und diese wieder giftiger als die französischen.

Nach ROSENAU und ANDERSON sind aber die französischen Sera toxischer als die amerikanischen. Wenn man bedenkt, wie viel hier von der Rasse der Tiere (VASCONCELLOS) und bei gleicher Rasse von der Individualität abhängt, so wird man die Frage noch kaum als entschieden betrachten. Man müßte sie jedenfalls mit der intravenösen Methode nachprüfen.

das Tier wird auffallend unruhig, würgt und hustet, krümmt den Rücken, das Abdomen erscheint aufgetrieben und äußerst druckempfindlich, so daß die leiseste Berührung Schmerzäußerungen zur Folge hat (Hyperalgesie der Haut nach Lewis). Dann schließen die Tiere die Augen, taumeln, fallen auf die Seite, die Respiration wird äußerst frequent, die Herztätigkeit sehr schwach, kaum fühlbar. Die Körpertemperatur fällt rapide, sehr häufig erfolgt massenhafter Abgang von Kot und Urin. Ein Teil der Tiere verendet mit gestrecktem Kopf und unter krampfartigen Laufbewegungen nach wenigen Minuten (2—5) bis zu einer Stunde. Die anderen erholen sich auffallend rasch und bieten schon nach kurzer Zeit ein von den Kontrollen nicht wesentlich abweichendes Verhalten. Diesen rapiden Übergang von schwerem Koma in völliges Wohlbefinden hat schon Arthus beobachtet. Man begegnet ihm bei allen anaphylaktischen Versuchen (Kraus und Doerr, Kraus und v. Stenitzer).

Anatomische Veränderungen bei den verendeten Meerschweinchen sollen nach Otto gänzlich fehlen. Nach Gay und Southard finden sie sich jedoch nahezu konstant, nach meinen Beobachtungen nur in einigen Fällen, auffallende Injektionen der Magen- und Darmserosa, sowie subseröse Hämorrhagien am Herzen, den Lungen, der Milz und hie und da am Magen. Bei einem mit Rinderserum sensibilisierten und 15 Stunden nach der Reinjektion verendeten Meerschweinchen war der Magen düsterrot und ebenso wie die Lungen und das Epikard von zahllosen Petechien geradezu übersät.

Mikroskopisch fand sich nach Gay und Southard eine herdweise angeordnete fettige Degeneration der Organzellen, und in manchen Fällen, besonders im Magen, eine fettige Degeneration der Endothelien, welche die genannten Autoren als Ursache der Hämorrhagien ansehen. Sie fehlte bei normalen und bloß sensibilisierten, aber nicht reinjizierten Meerschweinchen, welche als Kontrollen untersucht wurden, stets; eine sehr merkwürdige Angabe, da man sich doch nicht denken kann, daß die fettige Degeneration in den wenigen Minuten zwischen Reinjektion (Probe) und Exitus zustande kommt.

Damit sind die bisher bekannten Einzelheiten des anaphylaktischen Grundversuches erschöpft.

So wie mit Pferdeserum gelingt das Experiment natürlich auch mit anderen Seris, z. B. Rinderserum, Aalserum (Doerr und Raubitschek) oder irgendeinem anderen der auf pag. 867 angeführten Antigene.

Dabei erweist sich, wie schon aus dem Vorstehenden hervorgeht, die Eiweißanaphylaxie als **hochgradig spezifisch**. Mit Pferdeserum vorbehandelte Tiere sind nur gegen dieses, nicht aber gegen Kaninchen-, Ziegen- oder Ochsenserum überempfindlich (Otto), mit Kuhmilch sensibilisierte reagieren nur auf die Reinjektion von Kuhmilch, nicht aber von Pferdeserum (Arthus), Aalserum-Meerschweinchen sind bloß gegen Aalserum anaphylaktisch, nicht aber gegen irgend ein anderes Kalt- oder Warmblüterserum (Doerr und Raubitschek).

Nach Gay und Southard indes ist diese Spezifität keine absolute. Sie sensibilisierten Meerschweinchen mit Pferdeserum, Kuhmilch und Hühnereiweiß und konnten nun zeigen, daß der anaphylaktische Symptomenkomplex in vollster Intensität und mit größter Häufigkeit allerdings dann auftrat, wenn die (intraperitoneale) Probe mit der homologen Substanz erfolgte; doch konnten sie bei manchen Tieren auch mit einem der zwei heterologen Eiweißkörper die Reaktion auslösen. Sie sprechen im ersten Falle von „kompletter“, im zweiten von „partieller“ Vergiftung.

So interessant diese Beobachtung in theoretischer Hinsicht sein mag, so können doch derartige vereinzelte Fälle von geringgradiger heterologer Eiweißanaphylaxie das Gesetz der Spezifität in seiner allgemeinen Giltigkeit nicht erschüttern. In größeren Versuchsreihen, wo man von Zufälligkeiten unabhängiger ist, und bei Anwendung eines anderen Prüfungsmodus (nach OTTO des subkutanen, nach meinen Erfahrungen des intravenösen) wird sie stets klar zutage treten. Übrigens zeigen die Versuche von ROSENAU und ANDERSON, sowie von KRAUS und DOERR mit den Extrakten verschiedener Bakterienarten, daß auch im Bereiche der pflanzlichen Proteïne eine weitgehende Spezifität zu konstatieren ist.

Bei Verwendung von Organextrakten oder Körperzellen entwickelt sich ebenfalls eine artspezifische Anaphylaxie, dagegen keine organspezifische, d. h. mit Kaninchenleber vorbehandelte Hunde sind nicht nur gegen Leberextrakte, sondern auch gegen Auszüge aus anderen Kaninchenorganen und gegen Kaninchenserum hypersensibel. (Doch ist es neuerlich KRAUS und RANZI nicht gelungen, mit Organextrakten von Rindern Kaninchen zu anaphylaktisieren. Meerschweinchen, die mit Pferdeserum sensibilisiert waren, boten mit Organextrakten reinjiziert gleichfalls keine Erscheinungen, wohl aber mit Pferdeserum.)

Eine Sonderstellung nehmen nach KRAUS, DOERR und SOHMA nur die Extrakte der Augenlinsen ein, deren anaphylaktische Spezifität analogen Gesetzen folgt, wie die Spezifität der Linsenpräzipitine (UHLENHUTH). Nach den genannten Autoren sind mit Rinderlinsenextrakten vorbehandelte Kaninchen anaphylaktisch, aber nicht nur gegen Linse derselben, sondern auch anderer Tierarten. — Dagegen reagiert ein mit Rinderlinse vorbehandeltes Kaninchen nicht auf Rinderserum, und umgekehrt ein Rinderserumkaninchen nicht auf den homologen Linsenextrakt. Mit einem Worte: die Linse enthält ein besonderes Sensibilisinogen, welches verschiedenen Tierarten gemeinsam, daher von den artspezifischen im Blutserum enthaltenen anaphylaktisierenden Antigenen verschieden ist.

Antianaphylaxie.

Diejenigen sensibilisierten Meerschweinchen, welche die subkutane oder intraperitoneale Probe, d. h. also die Injektion massiver Dosen überleben, erweisen sich, wenn man sie ein zweites Mal reinjiziert, als immun, d. h. das Serum ruft bei ihnen keine oder nur geringe Krankheitserscheinungen hervor.

Diese Erscheinung wurde zuerst von OTTO und etwas später von ROSENAU und ANDERSON beschrieben; BESREDKA und STEINHARDT haben sie genaner studiert und als „Antianaphylaxie" bezeichnet.

Ein Beispiel wird die Versuchsanordnung sofort klar machen:

Meerschweinchen 515 erhält 0,02 ccm Pferdeserum (Sensibilisierung). — Nach 22 Tagen werden ihm 5 ccm Pferdeserum subkutan injiziert, worauf es mit schweren anaphylaktischen Symptomen reagiert, sich jedoch schließlich erholt und überlebt. (Probe.) — Nach weiteren 11 Tagen bekommt das Tier abermals 5 ccm Pferdeserum subkutan und bleibt nun gesund, zeigt absolut keine Störung seines Befindens (Antianaphylaxie).

Oder:

Meerschweinchen 520 erhält 0,0025 ccm Serum antidiphth. + 0,3 ccm Diphtherietoxin. Nach 3 Wochen werden 6 ccm Pferdeserum intra-

peritoneal injiziert; das Tier zeigt schwerste Symptome, überlebt jedoch. Nach weiteren 14 Tagen erhält es nochmals 6 ccm Pferdeserum und zeigt diesmal nichts Auffälliges.

Ebenso erweisen sich sensibilisierte Meerschweinchen, welche die intraperitoneale Probe überleben, immun = antianaphylaktisch gegen die intracerebrale Injektion von $^1/_4$ ccm Pferdeserum (Besredka und Steinhardt).

Beispiel: Ein nach Smith sensibilisiertes Meerschweinchen (Pferdeserum + Toxin) erhält 17 Tage später 5 ccm Pferdeserum intraperitoneal. Es zeigt leichte Symptome. 8 Tage später, also 25 Tage nach der sensibilisierenden Injektion erhält es $^1/_4$ ccm Pferdeserum ins Gehirn ohne zu reagieren. — Die gleichzeitig sensibilisierte Kontrolle stirbt nach intracerebraler Injektion von $^1/_4$ ccm Pferdeserum in 5 Min. (Besredka und Steinhardt).

Diese Unempfindlichkeit sensibilisierter Tiere entwickelt sich außerordentlich rasch nach der intraperitonealen Seruminjektion. Besredka und Steinhardt injizierten drei nach Smith anaphylaktisierten Meerschweinchen (d. h. Tieren, welche zur Wertbestimmung von Diphtherieserum gedient hatten) 23 Tage später, also zu einer Zeit, als die Anaphylaxie voll entwickelt war, 4 ccm Pferdeserum intraperitoneal. Sie wurden sichtlich krank, erholten sich jedoch rasch. Zwei Stunden später erhielten alle $^1/_4$ ccm Pferdeserum intracerebral und zeigten keine Störung. Zwei zur selben Zeit sensibilisierte Kontrollen, welche nur $^1/_4$ ccm Serum intracerebral erhielten, starben nach 2 und 7 Minuten.

In einem anderen Falle wurde die intracerebrale Probe schon 1 $^1/_2$ Stunden nach der schützenden peritonealen Injektion vorgenommen; auch dieses Tier reagierte nicht, während die Kontrolle, welche bloß sensibilisiert und intracerebral injiziert, nicht aber peritoneal vakziniert war, in wenigen Minuten verendete.

Man kann also sagen, daß die Antianaphylaxie fast unmittelbar nach der einmaligen Injektion von Pferdeserum in die Bauchhöhle sensibilisierter Meerschweinchen eintritt.

Injiziert man sensibilisierten Meerschweinchen große Serumdosen intraperitoneal (5 ccm) oder intracerebral (0,25 ccm) nach Ablauf der Inkubationsperiode, so geht natürlich ein großer Prozentsatz der Tiere (25—50 $^0/_0$) ein und die Antianaphylaxie läßt sich nur mehr an den überlebenden studieren.

Es gibt aber nach Besredka und Steinhardt noch zwei andere Methoden, welche gestatten, die Immunität sensibilisierter Meerschweinchen gegen Serum(Antianaphylaxie) auf einem schonenderen Wege herbeizuführen.

Die eine besteht darin, daß man den sensibilisierten Tieren große Dosen Serum (5 ccm intraperitoneal oder $^1/_4$ ccm intracerebral) injiziert, und zwar in der Inkubation oder präanaphylaktischen Periode selbst, bevor sich also noch die Anaphylaxie voll entwickelt hat, d. h. vor dem 10.—12. Tage. Die Meerschweinchen reagieren darauf nicht, sind aber gegen eine spätere Probe immun. Doch darf diese schützende Injektion großer Serumdosen erst am Ende der Inkubationsperiode, am besten wohl 8—10 Tage nach der Sensibilisierung erfolgen; injiziert man nämlich kurz nach der Sensibilisierung (24 Stunden später), so entwickelt sich die Hypersensibilität ungestört (Besredka und Steinhardt).

Die zweite Methode besteht darin, daß man bei den sensibilisierten Meerschweinchen die schützende Seruminjektion zwar nach Ablauf der Inkubation

vornimmt, d. h. in einem Moment, wo die Anaphylaxie bereits ausgebildet ist, daß man hiezu aber kleine, untertötliche Dosen verwendet. Durch intraperitoneale Injektion gelingt es zwar nicht, auf diese Weise bei bereits anaphylaktischen Tieren „Unempfindlichkeit" von längerer Dauer zu erzeugen, dazu sind stets massive Dosen nötig (Otto, Besredka und Steinhardt); wohl aber führen kleine Serummengen bei intracerebraler Injektion zur Immunität oder Antianaphylaxie bereits hypersensibler Tiere. Besredka und Steinhardt fanden, daß $^1/_{40}$—$^1/_{400}$ ccm Serum intracerebral beim sensibilisierten Meerschweinchen keine Krankheitssymptome auslöste, daß aber so schwache Dosen eine sofort (schon nach $^1/_2$ Stunde) eintretende Unempfindlichkeit gegen die sonst fast unbedingt letale Injektion von $^1/_4$ ccm zur Folge haben.

Endlich bleibt die Anaphylaxie auch aus, wenn man sensibilisierten Meerschweinchen in kurzen Intervallen (von 10 Tagen oder weniger) wiederholt Serum (2—4—5 ccm) intraperitoneal injiziert (Rosenau und Anderson, Otto, Besredka und Steinhardt).

Von zwei sensibilisierten Meerschweinchen erhält das eine nach 45 Tagen $^1/_4$ ccm Serum intracerebral und stirbt in 2 Min. Das andere erhält nach 10, 15, 28, 36 und 39 Tagen je 5 ccm Serum i. p.; am 45. Tage bekommt es wie die Kontrolle $^1/_4$ ccm intracerebral, zeigt aber keine Erscheinungen.

Dieser antianaphylaktische Zustand dauert nach Besredka und Steinhardt sehr lange; fünf sensibilisierte Meerschweinchen, welche in 8tägigen Zwischenräumen je 4 ccm Serum i. p. erhalten hatten, wurden der intracerebralen Probe ($^1/_4$ ccm) unterworfen und zwar eines 1 Monat nach der letzten intraperitonealen Einspritzung, zwei nach 2 Monaten, die restlichen zwei nach 3 Monaten. Keines zeigte anaphylaktische Symptome.

Dagegen fand Otto, daß der antianaphylaktische Zustand bei solchen mit großen Serumdosen vakzinierten Tieren nur ein vorübergehender sei. Er fand bloß bis zum 17. Tage absolute Immunität, die dann nachließ und „am 41. Tage jedenfalls nicht mehr vollständig war".

Antianaphylaktische, d. h. sensibilisierte und durch eine entsprechende Seruminjektion unempfindlich gewordene Meerschweinchen lassen sich aufs neue sensibilisieren oder reanaphylaktisieren (Besredka und Steinhardt). Doch soll es bei solchen Tieren länger dauern als bei normalen, bis sich der anaphylaktische Zustand entwickelt, und zwar etwa einen Monat, entsprechend dem Zeitpunkt, zu welchem die Tiere, auch ohne zweite Sensibilisierung wieder anaphylaktisch geworden wären (Otto). Lewis fand wieder, daß antianaphylaktische Meerschweinchen in kürzerer Zeit sensibilisiert werden können, als normale. Die Frage scheint also noch dringend der Nachprüfung zu bedürfen.

Injiziert man gegen Pferdeserum anaphylaktische Tiere intraperitoneal mit heterologem Serum (Ziege, Kaninchen), so scheint keine Immunität oder Antianaphylaxie einzutreten (Otto).

Passive Anaphylaxie.

Die geschilderte, durch Vorbehandlung mit heterologem Eiweiß erzeugte Anaphylaxie kann man als **aktive** bezeichnen und sie der von Otto entdeckten **passiven** Anaphylaxie gegenüberstellen. Otto hat nämlich den eminent wichtigen Nachweis geliefert, daß sich der überempfindliche Zustand mit dem Serum sensibilisierter Meerschweinchen

auf andere, normale übertragen läßt, also auf einer im Blute der anaphylaktischen Tiere kreisenden Substanz beruht, welche er den anaphylaktischen Reaktionskörper nennt. [Synonym: Sensibilisin (Besredka), Toxogenine (Richet), Allergin (Pirquet), Albuminolysin (Nicolle).]

Diese passive Übertragung der Anaphylaxie erfordert aber eine spezielle Versuchsanordnung.

Wie schon Nicolle, nach ihm Otto, Gay und Southard, Friedemann, Lewis und viele andere zeigen konnten, muß man **zuerst** das Serum des z. B. gegen Pferdeeiweiß anaphylaktischen Meerschweinchens und eine Zeit (etwa 24 Stunden nachher, besser noch später) das zugehörige Antigen, also Pferdeserum injizieren.

Mischt man das Serum des überempfindlichen Tieres mit dem Antigen in vitro, oder injiziert man beide Substanzen zwar getrennt*), aber gleichzeitig oder auch wenige Stunden nacheinander, so bleiben krankhafte Symptome aus (Rosenau und Anderson). Dagegen hat es den Anschein, daß sich der ganze Vorgang insofern umkehren läßt, daß man zuerst das Antigen und 24 Stunden später das Antiserum injiziert. v. Pirquet spritzte Kaninchen 10 ccm normales Pferdeserum subkutan ein; nach 24 Stunden erhielten die Tiere 2 ccm Antipferdeserum vom Kaninchen und reagierten mit spezifischem Ödem. Eine ganz analoge Anordnung haben jüngst auch Pick und Yamanouchi publiziert.

Sie injizieren kleinen Kaninchen (700 g) 2 ccm normales Rinderserum subkutan und einige Zeit (14 Tage) später 4—5 ccm präzipitierendes Antirinderserum vom Kaninchen intravenös, worauf die Tiere unter typisch anaphylaktischen Symptomen verenden. Es ist evident, daß es sich hier um den Versuch v. Piquets handelt, mit dem Unterschied, daß die intravenöse Injektion keine lokalen, sondern die seit Arthus bekannten akuten Allgemeinerscheinungen auslöst.

Die Tatsache, daß die gleichzeitige Injektion von Serum und Antiserum keine Störungen hervorruft, läßt sich wohl nur so erklären und diese Auffassung hat auch die berufensten Vertreter, daß nicht das Zusammentreffen von Antigen und Reaktionskörper im Blute der wesentliche pathogenetische Vorgang ist, sondern die Wirkung des Antigens auf die mit dem Sensibilisin (anaphylaktischen Reaktionskörper) beladene Nervenzelle lebenswichtiger Zentren (Otto, Besredka). Auch bei der passiven Übertragung der Hypersensibilität muß dann ein gewisser Zeitraum (24 Stunden) vergehen, während dessen die Nervenzellen das Sensibilisin verankern und fähig werden, auf die plötzliche Antigenzufuhr mit schweren Störungen zu reagieren.

Die Dauer des passiv anaphylaktischen Zustandes ist noch nicht vollständig ermittelt; jedenfalls ist sie viel kürzer als die der aktiven Anaphylaxie. Sie wurde von Otto noch nach 13, von Gay und Southard nach 15 Tagen nachgewiesen.

---

*) Neuere Versuche scheinen übrigens im gegenteiligen Sinne zu sprechen. So fand Richet, daß Hunde, die das Serum von gegen Kongestin anaphylaktischen Hunden intravenös erhalten hatten, schon nach 2 Stunden ausgesprochen überempfindlich waren. Weil-Hallé und Lémaire erzielten sogar anaphylaktische Symptome, ja den Tod bei Meerschweinchen, welchen sie getrennt, aber gleichzeitig 4 ccm Antipferdeserum vom Kaninchen und $^1/_{100}$ ccm Pferdeserum injizierten. Vielleicht spielt das gegenseitige Mengenverhältnis von Antigen und anaphylaktischen Reaktionskörpern auch eine Rolle und ist die Nichtberücksichtigung dieses Momentes die Ursache der Mißerfolge von Rosenau und Anderson, Otto u. a. bei getrennter, gleichzeitiger Injektion.

Die passive Übertragung gelingt aber nicht nur vom empfindlichen Meerschweinchen auf das normale, also auf dieselbe Tierspezies, sondern auch heterolog vom überempfindlichen Kaninchen auf das normale Meerschweinchen (Otto, Aalserumversuche von Doerr und Raubitschek, Versuche von Weil-Hallé und Lémaire); nur scheint hier der passiv hypersensible Zustand kürzer zu dauern, vielleicht infolge rascher Ausscheidung des heterologen Serums (Otto).

Zur passiven Übertragung der Anaphylaxie genügt oft schon die präventive Injektion von 0,1 ccm Serum eines stark hypersensiblen Tieres; sie kann subkutan, intraperitoneal oder intravenös erfolgen. Es empfiehlt sich aber, nicht unter 0,5 ccm herabzugehen; mit 1—3 ccm erhält man bei Meerschweinchen ziemlich sicher einen Erfolg.

Über das Auftreten des anaphylaktischen Reaktionskörpers im Blute aktiv sensibilisierter Tiere haben Otto, besonders aber Richet und Weil-Hallé und Lémaire Versuche angestellt.

Nach Otto wirkt das Serum sensibilisierter Meerschweinchen schon am 8. Tage passiv anaphylaktisierend auf normale, enthält also den Reaktionskörper bereits zu einer Zeit, zu der das serumspendende Tier selbst noch nicht anaphylaktisch ist. Desgleichen ist das Serum antianaphylaktischer, zur Zeit immuner Meerschweinchen, imstande, bei anderen passive Anaphylaxie hervorzurufen.

Diese Angaben schließen einen Widerspruch in sich: die selbst nicht hypersensiblen (präanaphylaktischen oder antianaphylaktischen) Tiere enthalten in ihrem Blute den die Anaphylaxie bedingenden Körper.

Der Widerspruch findet aber sofort eine Lösung, wenn man annimmt, daß noch im Tierkörper vorhandene Reste des Antigens das Zustandekommen des anaphylaktischen Prozesses verhindern; erst wenn alles Antigen eliminiert ist, können Symptome ausgelöst werden. Diese Annahme ist durchaus nicht willkürlich, sondern steht mit vielen Tatsachen in bestem Einklang. So entsteht nach kleinen Serummengen die Anaphylaxie früher als nach großen, welche langsamer ausgeschieden werden, so werden hypersensible Tiere immun (antianaphylaktisch), wenn man ihren Körper mit Antigen überschwemmt. Ist diese Hypothese richtig, daß nämlich im Organismus noch vorhandene Überbleibsel von Antigen das Zustandekommen der Anaphylaxie verhindern (Otto, Frey, Lémaire, Gay und Southard), dann ist die oben geschilderte Erscheinung leicht zu verstehen. Das serumspendende prä- oder antianaphylaktische Tier reagiert nicht anaphylaktisch, weil es noch Antigenspuren enthält, welche nicht immer nachweisbar sein müssen, da sie an Organe gebunden sein können; mit seinem Blutserum übertrage ich auf ein normales Tier viel vom Reaktionskörper, aber kein Antigen, so daß nunmehr die Anaphylaxie durch Wegfall der Hemmung manifest wird.

Der anaphylaktische Reaktionskörper verschwindet relativ rasch aus dem Blute der aktiv sensibilisierten Tiere. Weil-Hallé und Lémaire injizierten Kaninchen einmal Pferdeserum und entnahmen ihnen zu verschiedenen Zeiten Blut. Sie übertrugen nun je 4 ccm dieses Antipferdeserums vom Kaninchen auf gesunde Meerschweinchen und prüften das Verhalten der letzteren gegen Pferdeserum. Es stellte sich heraus, daß mitunter schwere Symptome, ja der Tod eintraten und daß die Stärke der Reaktion von dem Moment abhing, in welchem man den Aderlaß bei den das Antipferdeserum liefernden Kaninchen ausführte.

Wurden die Kaninchen in den ersten 10 Tagen nach der sensibilisierenden Injektion entblutet, so vermochte ihr Serum nicht, Meer-

schweinchen gegen das Pferdeserum passiv anaphylaktisch zu machen. Vom 10. bis 25. Tag war diese Fähigkeit voll entwickelt und nahm dann allmählich bis zum 60. Tage ab, um schließlich völlig zu erlöschen. 60 Tage nach der sensibilisierenden Injektion der Kaninchen rief ihr Serum + Normalpferdeserum bei Meerschweinchen nicht einmal mehr lokale Symptome hervor.

Wurden die serumspendenden Kaninchen mehrmals mit Pferdeserum vorbehandelt, statt ein einzigesmal, so wickelte sich der Zyklus rascher ab; der anaphylaktische Reaktionskörper erschien schon am 4. Tag und verschwand bereits am 28. nach der letzten Injektion. (Gleiches Verhalten wie bei den Präzipitinen [nach v. Dungern] und anderen Immunkörpern.)

Es fällt jedenfalls auf, daß der anaphylaktische Antikörper so rasch aus dem Blute aktiv anaphylaktischer Tiere verschwindet, während sie selbst viel länger (sicher jahrelang) hypersensibel bleiben. Es hängt dies mit dem schon erörterten Umstande zusammen, daß die Anaphylaxie nicht auf dem im Blute kreisenden, sondern auf dem an die Nervenzellen gebundenen Reaktionskörper beruht. Die Abstoßung von im Überschuß produzierten und daher an die Zirkulation abgegebenen Immunkörper kann aber bald sistieren, ohne daß die Zellen selbst daran verarmen.

Eine besondere Form der passiven Anaphylaxie ist die Übertragung derselben durch **Vererbung.**

Sie wurde von Rosenau und Anderson, Anderson, Gay und Southard, Otto, Lewis für Pferdeserum, von Vaughan und Wheeler für Hühnereiweiß studiert. Als Versuchstier diente stets das Meerschweinchen.

Rosenau und Anderson konnten folgende Gesetze feststellen:

1. Die Überempfindlichkeit für Pferdeserum geht von dem Weibchen auf die Jungen über. Die Männchen spielen dabei keine Rolle.
2. Die Überempfindlichkeit wird nicht durch die Milch übertragen.
3. Die Überempfindlichkeit geht von der Mutter auf die Jungen über, gleichgültig ob erstere vor oder nach der Konzeption anaphylaktisch wird.

Die Vererbung der Anaphylaxie beruht offenbar auf dem Übergange des anaphylaktischen Reaktionskörpers aus dem mütterlichen in den kindlichen Organismus. Da wir nun wissen, daß auch antianaphylaktische Tiere, d. h. sensibilisierte Meerschweinchen, welche man durch Injektion einer großen Dosis Pferdeserum refraktär gemacht hat, im Blute den Reaktionskörper enthalten, so kann es uns nicht wundernehmen, wenn die Jungen solcher im Moment der Geburt antianaphylaktischer Mütter, hypersensibel sind, wenn man sie 6—9 Wochen nach der Geburt prüft und nicht refraktär, wie man vielleicht vermuten könnte (Gay und Southard, Rosenau und Anderson). Nach Otto läßt sich bei hereditär anaphylaktischen Meerschweinchen typische Überempfindlichkeitsreaktion noch bis zum 44. Lebenstage nachweisen. Nach 72 resp. 73 Tagen ist sie bereits undeutlich oder gleich Null. Auch diese kurze Dauer weist darauf hin, daß es sich hier nur um passive, nicht aber um aktive Anaphylaxie handeln kann. Nach Lewis verschwindet die ererbte Überempfindlichkeit übrigens noch viel schneller.

Wesen der Anaphylaxie.

Es kann unmöglich an dieser Stelle auf die verschiedenen Theorien*) eingegangen werden, welche man zur Erklärung der anaphylaktischen Prozesse aufgestellt hat. Abgesehen davon, daß dies mit dem Zweck des vorliegenden Handbuches „der Technik" und „Methodik" nicht in Einklang zu bringen wäre, ist auch vieles noch derart kontrovers, daß nicht einmal in prinzipiellen Momenten eine Einigung erzielt ist.

Nur eines scheint sicher zu sein, daß man es hier mit Immunvorgängen zu tun hat. Die Tatsache, daß nach der Sensibilisierung eine Inkubationszeit verstreichen muß, bevor das Tier anaphylaktisch wird, welche in ihrer Dauer (10—12 Tage) im allgemeinen der bei der Bildung anderer Immunsubstanzen beobachteten Latenzperiode entspricht, der Nachweis des Immunkörpers durch die passive Übertragung der Anaphylaxie und verschiedenes andere spricht eindeutig in diesem Sinne. Wenn sich auch Gay und Southard bemüht haben, das Unzulängliche der Antikörpertheorie für die Anaphylaxie zu beweisen, so hat doch Besredka ihre Argumente als hinfällig gekennzeichnet.

Immerhin kann nicht geleugnet werden, daß sich die anaphylaktischen Phänomene nicht ohne weiteres jenen Gesetzen unterordnen lassen, die wir bei anderen Immunitätsprozessen als allgemein giltig anerkennen. Dies mag damit zusammenhängen, daß die experimentelle Analyse noch nicht weit genug vorgeschritten ist. Doch bestehen gegenwärtig sicher mehr Gründe, welche zugunsten der Antikörpertheorie, als solche, welche gegen sie sprechen.

Die Mehrzahl der Autoren vertritt denn auch diese Anschauung. Sie teilen sich aber in zwei Gruppen, deren Gegensatz verständlich wird, wenn wir uns nochmals das Schema des anaphylaktischen Grundversuches vor Augen führen.

Derselbe besteht in der Sensibilisierung mit (meist minimalen) Mengen einer Eiweißlösung und in der Reinjektion massiver Dosen derselben nach einem gewissen Intervall, wobei Krankheitssymptome und Tod entstehen.

Ein Teil der Forscher hält nun die Substanz des Eiweißes, welche die Anaphylaxie erzeugt, das sensibilisierende Antigen, für identisch mit jener, welche bei der Reinjektion (Probe) das anaphylaktische Tier schädigt. (Otto, v. Pirquet, Nicolle usw.)

Andere wieder, darunter besonders Besredka, halten beide Körper, die natürlich im Serum oder anderen Eiweißlösungen präformiert sein müssen, für verschieden.

Beiden Auffassungen gemeinsam ist der Immunkörper, nach Otto als anaphylaktischer Reaktionskörper, nach Besredka als Sensibilisin bezeichnet. Die Unitarier lassen die anaphylaktischen Symptome entstehen durch Zusammenwirken von Immunkörper und reinjizierten Antigen, die Dualisten durch den Immunkörper und die dritte (im Serum von vornherein existierende) Substanz.

Wir wollen uns mit Besredkas Hypothese, die zurzeit am besten fundiert ist, etwas eingehender beschäftigen.

Besredka nennt das anaphylaktisierende Antigen Sensibilisinogen, jenen Körper aber, welcher die Symptome beim hypersensiblen Tier auslöst, Antisensibilisin.

---

*) Siehe darüber Ottos Referat in Kolle-Wassermanns Handb. der path. Mikroorg.

Er stellt sich vor, daß der Organismus bei Vorbehandlung mit heterologem Eiweiß Sensibilisin erzeugt, welches in den Nervenzellen aufgespeichert wird. Dieses hat eine große Affinität zu dem im Normalserum vorhandenen Antisensibilisin; injiziert man einem überempfindlichen Tiere entsprechende Mengen des betreffenden Normalserums, so vereinigt sich das darin enthaltene Antisensibilisin mit dem Sensibilisin der Nervenzelle plötzlich und dadurch entsteht der anaphylaktische Shok.

Injiziert man aber große Serumdosen zu einer Zeit, wo der Körper noch nicht genug Sensibilisin erzeugt hat, also in der präanaphylaktischen Periode oder injiziert man umgekehrt einem an Sensibilisin reichen, stark überempfindlichen Tiere zu wenig Antisensibilisin, also zu kleine Dosen Normalserum, so findet die Vereinigung der beiden Substanzen langsamer statt, die Desensibilation der Nervenzellen verläuft schonender und das Tier ist dann natürlich immun (antianaphylaktisch), da beide Körper sich gegenseitig neutralisiert haben.

Daß sich der anaphylaktische Shok in den Nervenzellen abspielt, konnte übrigens Besredka auf einem anderen, von Roux angegebenen ingeniösen Wege demonstrieren, indem er die nervösen Zentren durch Narkotika unempfindlich machte.

Er schläferte Meerschweinchen, welche gegen Pferdeserum hypersensibel waren, mit Äther ein und injizierte sofort nach eingetretener Muskelerschlaffung $^1/_4$ ccm Pferdeserum intracerebral. Um den Schlaf der Tiere nicht zu stören, wird die Trepanationsöffnung schon vor der Narkose angelegt, so daß man nach Eintritt derselben nur die Injektion vorzunehmen braucht. Das Tier schläft weiter und wacht nach einer halben Stunde ohne das mindeste anaphylaktische Symptom auf.

Mit Morphinum hydrochloric. und Extract. Opii gelingen die Versuche nicht, mit ersterem wohl deshalb, weil es überhaupt keine rechte Narkose erzeugt; aber auch der tiefe Opiumschlaf (1 ccm einer 10%igen Lösung intraperitoneal) schützt nicht, indem die Meerschweinchen sofort nach der Reinjektion Dyspnoe und Krämpfe bekommen und ebenso sterben wie nicht narkotisierte.

Dagegen wirkt Chloräthyl, Urethan (0,4 g) oder Chloralose (0,05 g) ähnlich wie Äther, wenn auch nicht so sicher. Die Tiere überleben wenigstens 16 Stunden, während die Kontrollen in 2—3 Minuten eingehen.

Daß sich in der Äthernarkose derselbe Prozeß abspielt, wie beim wachen hypersensiblen Tiere, beweist der Umstand, daß die in Narkose reinjizierten Tiere nach dem Erwachen immun (antianaphylaktisch) sind.

Nach Anderson und Rosenau soll übrigens die Äthernarkose die Erscheinungen bloß maskieren, nicht aber gegen den Tod schützen. Indes sind die Versuche von Besredka zu eindeutig, um einen Zweifel zu gestatten; sie sind auch nicht ohne Analogie, da, wie Richet hervorhebt, chloralisierte Tiere auch mit Kokain, Strychnin oder Ammoniaksalzen nicht vergiftet werden können.

Besredkas Theorie erklärt durch die Annahme eines dritten Körpers und durch die Voraussetzung der Intervention von Ganglienzellen bei der Reaktion wenigstens teilweise die Ergebnisse des Experimentes.

Sie gibt aber keinen Aufschluß, warum sich der anaphylaktische Reaktionskörper (Sensibilisin) in vitro weder mit seinem Antigen (Sensibilisinogen) noch mit dem Antisensibilisin, zu dem er doch nach Besredka eine so große Affinität besitzen soll, verbindet.

Versetzt man nämlich Normalserum mit dem Serum eines anaphylaktischen Tieres, so erzeugt das Gemenge

1. beim überempfindlichen Tiere den anaphylaktischen Shok (intaktes Antisensibilisin),

2. beim normalen aktive Anaphylaxie (intaktes Sensibilisinogen) und

3. gleichfalls beim normalen Tiere passive Anaphylaxie, da die Tiere auf eine neuerliche Injektion von Normalserum nach 24 Stunden anaphylaktisch reagieren (intakter Immunkörper = Sensibilisin)*).

Fragen wir uns nun, ob BESREDKA für die Existenz jenes dritten Körpers, des Antisensibilins, welches beim hypersensiblen Tier die Symptome hervorruft, bzw. für seine Trennung vom Antigen (Sensibilisinogen) Beweise beibrachte, so leitet uns dies zu einem bisher noch nicht besprochenen Kapitel, zu den

Chemisch-physikalischen Eigenschaften der bei anaphylaktischen Prozessen in Reaktion tretenden Substanzen.

A. Das Antigen (Sensibilisinogen) und das Antisensibilisin (die für das hypersensible Tier toxische Substanz).

Seit RICHET wissen wir bereits, daß der anaphylaktisierende Körper im Aktinienextrakt und dem daraus hergestellten Kongestin sehr widerstandsfähig gegen Erhitzen ist, da das durch 10 Minuten auf 105° erhitzte Präparat (Metakongestin) noch immer sensibilisierend wirkt.

Auch ROSENAU und ANDERSON konstatierten bei Sensibilisierung von Herbivoren durch Fütterung mit Pferdefleisch oder Rindfleisch, daß die Anaphylaxie erst dann ausbleibt, wenn man das Fleisch durch 30 Minuten auf 110° erhitzt.

In neuerer Zeit fand nun BESREDKA, daß man Sera auf 100°, ja auf 120° (in vierfacher Verdünnung mit destilliertem Wasser) durch 15 Minuten erwärmen kann, ohne im geringsten ihre anaphylaktisierenden Fähigkeiten zu alterieren.

Das Sensibilisinogen wäre danach im höchsten Grade thermostabil.

Anders verhält es sich mit der Fähigkeit der Sera, beim überempfindlichen Tiere Anaphylaxie auszulösen, eine Fähigkeit, die man auch als Toxizität der Sera bezeichnet. Diese Eigenschaft führt BESREDKA, wie auseinandergesetzt, auf die Existenz eines zweiten Stoffes im Serum, des Antisensibilisins zurück. Sie ist im gewissen Sinne thermolabil, und wird durch 15 Minuten langes Erwärmen auf 100—200° ganz aufgehoben, durch 20 Minuten langes Erwärmen auf 89—95° sehr wesentlich herabgesetzt, ebenso durch 20 Minuten langes Erwärmen auf 76,5° noch immer deutlich alteriert.

Ja selbst Temperaturen von 50—60° bewirken, wenn sie protrahiert angewendet werden (1—2 Stunden an vier bis fünf aufeinander folgenden Tagen) eine bedeutende Reduktion (auf $^1/_3$—$^1/_5$) der Fähigkeit, anaphylaktische Symptome beim sensibilisierten Tier auszulösen, indem man die Dosis bei der sogenannten Probe auf das 3—5fache erhöhen muß, um gleich schwere Erscheinungen wie mit demselben unerhitzten Serum zu bekommen.

Nach BESREDKA wird ferner durch Erwärmen nicht nur die Toxizität, sondern auch die Fähigkeit eines Serums herabgesetzt, hypersensible Tiere zu immunisieren, d. h. antianaphylaktisch zu machen.

*) Ebensowenig kann man Normalsera für das überempfindliche Tier dadurch unschädlich machen, daß man sie mit Gehirnemulsion (normaler oder hypersensibler Tiere) stundenlang in Berührung läßt und diese dann abzentrifugiert. (BESREDKA, KRAUS und DOERR.)

Demgegenüber behaupten Rosenau und Anderson, daß man mit auf 100° erhitztem Serum nicht mehr sensibilisieren kann; danach wäre das Sensibilisinogen also ebenso thermostabil wie das Antisensibilisin und die reelle Basis für die Annahme von zwei im Normalserum präformierten Stoffen entfiel gänzlich.

Aber selbst, wenn Besredka im Tatsächlichen Recht behält, ist es doch sehr zweifelhaft, ob seine Versuche zu den gemachten Schlüssen berechtigen. Man muß sich vor Augen halten, daß Besredka subkutan sensibilisiert und zerebral prüft; zu ersterem Zwecke reicht 0,001, ja manchmal 0,000 001 ccm Originalserum aus, zur zerebralen Probe benötigt man aber meist 0,25, daher wenigstens das 250fache. Prüft man mit kleineren Mengen, so bleiben anaphylaktische Symptome aus. Wenn nun beim Erhitzen das Eiweiß nicht gleichartig und qualitativ, sondern im Sinne fortschreitender Zersetzung quantitativ verändert wird, so ist es ganz gut möglich, daß man mit solchen Lösungen zwar noch immer sensibilisieren, aber nicht mehr prüfen kann, weil sie für diesen Zweck nicht mehr genug Antigen oder Antisensibilisin enthalten. Dazu kommt, daß man bei zerebraler Prüfung das Volum von 0,25 ccm nicht überschreiten kann; hätte Besredka intraperitoneal geprüft oder noch besser intravenös und die Dosen der erhitzten und eventuell eingedickten Eiweißlösung erhöht, würden negative Resultate eher zu dem Schlusse berechtigen, daß das Antisensibilisin thermolabil, das Sensibilisinogen thermostabil, beide daher different seien.

Glücklicher waren Gay und Adler mit dem Versuche, die sensibilisierende Substanz des Pferdeserums auf chemischem Wege von jenem Körper zu trennen, der beim sensiblen Tier die Symptome auslöst, und den sie gleich Besredka als toxischen Faktor bezeichnen.

Sie fanden, daß der gereinigte Ätherextrakt oder das nach Ganzsättigung mit Ammonsulfat resultierende Filtrat des Pferdeserums weder die eine noch die andere Substanz enthalten; diese Präparate sensibilisieren nicht gegen Pferdeserum und rufen bei anaphylaktischen Meerschweinchen keine Krankheitserscheinungen hervor.

Fällt man aber Pferdeserum fraktioniert mit Ammonsulfat und reinigt die Fraktionen durch Umfällen, so zeigt es sich, daß mit zunehmender Ammonsulfatsättigung Fraktionen erhalten werden von fallendem Sensibilisierungsvermögen und wachsender Toxizität.

Die letzte Fraktion ist ebenso toxisch wie normales Pferdeserum, jedoch bedeutend weniger sensibilisierend als dieses und alle früheren Fraktionen.

Die erste Fraktion (bei $^1/_3$ Sättigung mit Ammonsulfat) ist dagegen ebenso sensibilisierend wie Originalserum, aber absolut atoxisch. Gay und Adler nennen sie Euglobulin, und betrachten sie als die gereinigte, von toxischen Elementen befreite, sensibilisierende Substanz des Serums identisch mit dem „Anaphylaktin" von Gay und Southard.

Dieses „Euglobulin" ist 1., wie erwähnt, atoxisch für sensible Tiere, 2. ruft es bei anaphylaktischen Tieren selbst in großen Dosen keine Antianaphylaxie hervor, wirkt also nicht immunisierend, 3. (eine sehr merkwürdige Tatsache) sensibilisiert es normale Tiere schon in 4—5 Tagen.

Da Gay und Adler die toxische Eigenschaft der Euglobulinlösung mit hohen Dosen entsprechend 10 ccm Normalserum prüften und auch intrakardial injizierten, so fällt der gegen Besredka gemachte Einwand (s. oben) weg.

Daß verschiedene Serumfraktionen verschiedene sensibilisierende Fähigkeiten besitzen, zeigen auch Versuche von Doerr und Raubitschek. Sie fällten 5,0 ccm des (für Kaninchen ungiftigen) Pferdeserums, das vorher mit destilliertem Wasser 10fach verdünnt war, mit Kohlensäure aus; der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, dreimal mit kohlensäurehaltigem Wasser auf der Zentrifuge gewaschen und in 50 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst (bezeichnet als KSG = Kohlensäureglobulin). Der durch Kohlensäure nicht gefällte Serumanteil wurde filtriert und dann verwendet (Filtrat).

Eine Reihe von Meerschweinchen erhielt nun so viel KSG-Lösung subkutan, daß die Menge 0,02 ccm Originalserum entsprach und wurde auf Überempfindlichkeit nach 22 und 33 Tagen geprüft und zwar mit je 6,0 ccm auf 60° erhitzten Pferdeserums intraperitoneal. (Tabelle 1.)

Kein einziges Tier war nach 22 Tagen, alle nach 33 Tagen anaphylaktisch, woran auch bei Nr. 423, 158, 403 die 11 Tage vorher gegebene Injektion einer massiven Menge erhitzten Pferdeserums nichts geändert hatte. Nach Besredka hätten die Tiere doch antianaphylaktisch sein müssen.

Eine zweite Serie bekam das Filtrat, und zwar wieder entsprechend 0,02 ccm Originalserum. (Tabelle 2.)

Tabelle 1.

Meerschweinchen No.	Reinjektion	Resultat
423	1. nach 22 Tagen	0
	2. „ 33 „	schwerste Erscheinungen † in $1^1/_2$ Stunden
420	„ 33 „	† nach 1 Stunde
158	1. „ 22 „	0
	2. „ 33 „	† nach $^1/_2$ Stunde
481	„ 33 „	† nach 20 Minuten
403	1. „ 22 „	0
	2. „ 33 „	schwerste Symptome

Tabelle 2.

Meerschweinchen No.	Reinjektion	Resultat
446	nach 22 Tagen	schwere Symptome
487	1. „ 22 „	schwerste Anaphylaxie
	2. „ 33 „	0
428	1. „ 22 „	schwerste Symptome
	2. „ 33 „	0
429	„ 33 „	deutliche, schwere Symptome
473	„ 33 „	do. do.

Hier waren wieder alle Tiere schon nach 22 Tagen anaphylaktisch, bei der Reinjektion nach weiteren 11 Tagen antianaphylaktisch im Sinne Besredkas.

Es zeigte sich also, daß beide Serumfraktionen den anaphylaktisierenden Körper enthielten, daß aber in der ersten Reihe (mit Kohlen-

säureglobulin) der Zustand durchweg später zur Entwicklung kam. Ferner, daß die im praeanaphylaktischen Stadium bei Serie I ausgeführte Seruminjektion keine Antianaphylaxie nach sich zog.

Im übrigen waren die chemischen Untersuchungen begreiflicherweise meist darauf gerichtet, dem Pferdeserum die für das sensibilisierte Tier toxische Komponente (Antisensibilisin nach Besredka) zu entziehen, blieben aber insgesamt erfolglos. Dieser Stoff widersteht der Einwirkung von Buttersäure, Kaliumpermanganat, Natriumzitrat, Alkohol, Wasserstoff-Superoxyd, Chloroform, Trikresol, Taka-Diastase, Pankreatin, Myrosin, Invertin, Emulsin, Pepsin, Morphin, Strychnin, Koffein, Ammonsulfat, Magnesiumsulfat, Ochsengalle, Formaldehyd (Rosenau und Anderson), von Gramscher Flüssigkeit, der Extraktion mit Äther, der Fällung mit destilliertem Wasser (Besredka).

Er passiert Porzellankerzen (Rosenau und Anderson), diffundiert nicht durch Kollodiumsäckchen (Besredka) und wird durch Röntgenstrahlen, durch jahrelanges Lagern der Sera, durch zweitägigen Kontakt mit Tierkohle, durch Frieren und Wiederauftauen nicht geschädigt.

Ebenso resistent sind die anaphylaktisierenden (sensibilisierenden) Fähigkeiten der Eiweißlösungen. Sie werden durch starkes Erhitzen (auf 100—120° Besredka, Richet) nicht völlig zerstört; auch durch 0,4—1 % Salzsäure gehen sie nicht zugrunde (Versuche von Doerr und Raubitschek am Aalserum). In der Milch ist die sensibilisierende Komponente ebenfalls thermostabil (Arthus, Besredka); bei Koagulation durch bulgarisches Milchferment (Yoghurt) geht sie in das Koagulum über, ebenso wie die Fähigkeit, Symptome beim sensiblen Meerschweinchen hervorzurufen. Die Molke ist für das gegen Milch sensibilisierte Tier unschädlich (Besredka).

B. Der Immunkörper.

(Anaphylaktischer Reaktionskörper oder Sensibilisin).

Von ihm wissen wir nur, daß er die einstündige Erhitzung auf 55° C ohne wesentliche Abschwächung verträgt (Otto, Pick und Yamanouchi). Er wird durchKomplement in seiner Wirkung weder verstärkt noch abgeschwächt; seine übrigen Eigenschaften wurden bereits besprochen. Es ist unnötig zu betonen, daß er allein keine Erscheinungen hervorruft, ebensowenig wie antitoxisches Serum bei einem normalen Tiere. Schädlich wirkt nur sein Zusammentreffen mit dem korrespondierenden Antigen im Körper.

Wichtig ist natürlich die Frage der Abgrenzung des anaphylaktischen Reaktionskörpers von anderen Immunsubstanzen, welche nach Vorbehandlung mit heterologen Eiweißarten im Blute auftreten. Es sind dies die Präzipitine, die komplementbindenden Antikörper (Moreschi) und die nach giftigen Eiweißarten (Aktinokongestin, Mytilokongestin, Aalserum usw.) beobachteten Antitoxine.

Mit den Präzipitinen sind die Reaktionskörper sicher nicht identisch (Otto, v. Pirquet und Schick), da sie auch in Seris vorkommen, welche keine Spur von Präzipitin enthalten, da sie im präzipitierenden Seris andrerseits fehlen können, und da auch im Falle der Koexistenz kein Parallelismus in den Mengenverhältnissen besteht (Francioni, Marfan).

Desgleichen konnte Otto mit der Bordet-Gengouschen Methode im Serum überempfindlicher Meerschweinchen keine spezifischen komplementbildenden Antikörper nachweisen. Auch zeigte das Serum von

Tieren, welche gerade einen anaphylaktischen Shok überstanden hatten, keine Verarmung an Komplement. „Das Serum solcher Tiere zeigte im hämolytischen Versuch keinen wesentlichen Verlust seiner lytischen Wirksamkeit im Vergleich zu dem Serum normaler Meerschweinchen. Es ergaben sich somit aus diesen Versuchen keine Anhaltspunkte für die Annahme, daß die Überempfindlichkeitsreaktion durch plötzlichen Komplementverlust bedingt sein könnte" (OTTO).

Später konnten allerdings NICOLLE und ABT mit dem Serum von Meerschweinchen, welche gegen Pferde- und Hundeserum anaphylaktisch waren, Komplementablenkung nach BORDET-GENGOU erzielen. Die Sera der gegen Hundeserum hypersensiblen Tiere gaben Ablenkung (ohne Präzipitation) mit Hundeserum (aber auch mit Kaninchen- und Ochsenserum), während normale Meerschweinchensera nicht ablenkten. Die Mengenverhältnisse betrugen: 0,3 ccm anaphylaktisches Serum + 0,05 altes Komplement + 0,05 ccm Normalserum vom Hund, Pferd oder Ochsen. Wurde der Komplementzusatz etwas vermehrt, so blieb die Ablenkung auf voller Höhe für Hundeserum, wurde aber inkomplett für Kaninchen und Ochsenserum.

Ähnlich verhielten sich die Sera von 30 Meerschweinchen, welche zur Wertbestimmung von Diphtherieheilserum gedient hatten (Sensibilisierung nach THEOBALD SMITH); es wurde ihnen Blut entzogen und zwar 15 Tage bis $2^1/_2$ Monate später. Alle Tiere hatten sich bei intrazerebraler oder intravenöser Probe als anaphylaktisch gegen Pferdeserum erwiesen. Sämtliche Sera derselben lenkten ab (ohne zu präzipitieren) und zwar mit Pferdeserum; 3 wurden auch mit Kaninchenserum geprüft und gaben auch mit diesem + 0,05 Komplement Ablenkung. Doch ließ erhöhter Komplementzusatz die Spezifität wieder hervortreten.

Es lenken also entgegen der Angabe von OTTO die Sera anaphylaktischer Tiere mit dem zugehörigen Eiweiß Komplement ab. Da sich aber bei der Vorbehandlung mit Blutserum im Organismus neben dem anaphylaktischen Reaktionskörper auch andere Substanzen bilden können, welche mit ihrem Antigen spezifisch Komplement fixieren, auch ohne Präzipitation, so erscheint der Schluß, daß die von NICOLLE und ABT beobachteten Vorgänge gerade auf eine Verbindung des anaphylaktischen Antigens mit seiner Immunsubstanz hinweisen, nicht begründet. Dies ließe sich wohl nur dann behaupten, wenn man mit reinem Sensibilisinogen immunisieren könnte.

Von den Antitoxinen, die nach toxischen Eiweißarten auftreten, sind die Reaktionskörper gleichfalls völlig verschieden. Sie verdanken auch verschiedenen Antigenen ihre Entstehung; zerstört man z. B. das Toxin des Aalserums durch Erhitzen oder Salzsäurezusatz, so bleibt das anaphylaktisierende Antigen erhalten (DOERR und RAUBITSCHEK). Immunisiert man mit dem nativen giftigen Eiweiß, so müssen natürlich Interferenzerscheinungen von antitoxischer Immunität und spezifischer Eiweißanaphylaxie entstehen (Versuche von RICHET mit Mytilokongestin, von DOERR und RAUBITSCHEK mit Aalserum). Durch geeignete Versuchsanordnung lassen sich aber beiderlei Immunkörper gesondert nachweisen.

Immunisiert man nämlich Meerschweinchen oder Kaninchen mit Aalserum in fünftägigen Intervallen (4—5mal) und entnimmt das Serum (14—20 Tage) nach der letzten Injektion, so kann man zeigen:

1. daß Antitoxin vorhanden ist, indem das Serum ein- oder mehrfach tödliche Aalgiftdosen, sowohl im Mischversuch als auch bei präventiver Anwendung neutralisiert;

2. daß der anaphylaktische Reaktionskörper gegen Aaleiweiß im Serum enthalten ist, indem man normalen Tieren 1—2 ccm präventiv injiziert und nach 24 Stunden das durch Erwärmen ungiftig gemachte Antigen nachinjiziert. Die Tiere verenden im anaphylaktischen Shok.

Es können Antitoxin und Reaktionskörper, oder nur einer von beiden, im Serum der mit Aalserum vorbehandelten Tiere nachweisbar sein.

Im ersteren Falle schützt ein solches Serum präventiv injiziert gegen das native giftige Aalserum (allerdings nicht gegen zu hohe Dosen, weil diese zu viel Eiweiß enthalten!), sensibilisiert aber in gleicher Weise angewendet gegen entsprechende Mengen erwärmten, atoxischen Aalserum, eine auf den ersten Blick immerhin paradoxe Erscheinung.

Auch der Serumspender selbst ist gegen kleinere, aber sonst tödliche Dosen von Aalserum immun, gegen größere ungiftig gemachte Aalserummengen anaphylaktisch.

Beispiel: Kaninchen 426 wurde durch subkutane Injektion geringer Mengen Aalserums (am 24. III., 30. III., am 6., 12. und 26. IV. und am 1. V.) immunisiert und am 10. Mai (10 Tage nach der letzten Injektion) zur Ader gelassen.

Das zum folgenden Versuche verwendete Aalserum tötete Meerschweinchen intravenös noch in Mengen von 0,005 ccm innerhalb 15 Minuten unter schwersten Krämpfen.

Der Antitoxingehalt des Serums von Kaninchen 426 wurde im Bindungsversuch wie folgt austitriert:

0,01 Aalserum + 2,0 Kaninchen-Immun.-Serum 426 (2 Stunden Zimmertemperatur). Meerschweinchen 479 i.-v. überlebt.
0,01 „ + 1,0 „ „ „ „ 411 i.-v. „
0,01 „ + 0,5 „ „ „ „ 403 i.-v. „
Kontrollen: 0,01 Aalserum + 2,0 Kochsalzlösung Meerschweinchen 412 i.-v., Tod in 10 Minuten.
„ 0,01 „ + 2,0 norm. Kan.-Serum „ 57 i.-v., Tod in 8 Minuten.

Präventiv schützen 1—2 ccm ebenfalls gegen die intravenöse Injektion von 0,01 Nativ-Aalserum:

Meerschweinchen 422 2,0 Serum 426, nach 24 Std. 0,01 Aalserum i.-v.
„ 460 1,0 „ 426, „ 24 „ 0,01 „ i.-v.
„ 495 1,0 „ 426, „ 24 „ 0,01 „ i.-v.
} ohne Krankheitserscheinungen.
Kontrolle: Meerschweinchen 168, 0,01 Aalserum intravenös, Tod in 8 Minuten.

Injizierte man aber den präventiv mit diesem Serum vorbehandelten Tieren am nächsten Tage 0,5 erhitztes Aalserum intravenös, so traten sofort schwerste anaphylaktische Symptome, ja der Tod ein.

Meerschweinchen 480, 1,0 Serum 426, nach 24 Stunden 0,5 erhitztes Aalserum, sofort Dyspnoe, legt sich auf die Seite, nach mehreren Stunden erholt.
Meerschweinchen 461, 1,0 Serum 426, nach 24 Stunden 0,5 erhitztes Aalserum, schwere anaphylaktische Erscheinungen. Tod in 12 Minuten.

10 Tage nach diesem Versuche wurde das Kaninchen 426 abermals zur Ader gelassen (20 Tage nach der letzten Injektion) und der ganze Versuch wiederholt, ohne wesentliche Änderung des Resultates.

Das serumspendende Kaninchen Nr. 426 selbst bekam am selben Tage 2,0 ccm erhitztes Aalserum intravenös, legte sich sofort nieder, war schwer krank, hatte Abgang von Kot, Urin, Dyspnoe und starb in der folgenden Nacht. Die normale Kontrolle Kan. Nr. 463 reagierte auf 2,0 erhitztes Aalserum nicht.

Die Antitoxine und die anaphylaktischen Reaktionskörper sind also voneinander völlig unabhängig. Dafür spricht auch in gewissem Sinne

folgende Beobachtung von ANDERSON: Nach SMITH mit Diphtherietoxin und Pferdeserum sensibilisierte Meerschweinchen-Mütter vererben auf ihre Jungen Immunität gegen Diphtherietoxin und Anaphylaxie gegen Pferdeserum gleichzeitig.

Bakterienanaphylaxie.

Die vorstehenden Erörterungen beziehen sich so gut wie ausschließlich auf die Anaphylaxie nach Seruminjektionen. In letzter Zeit hat man nun auch erkannt, daß das Bakterieneiweiß ähnliche Erscheinungen hervorzurufen imstande sei. Zwar lagen schon aus früherer Zeit Berichte vor, welche eine spezifische Überempfindlichkeit nach Bakterieninjektionen (Tuberkelbazillen, Staphylokokken, Streptokokken, Bac. pyocyaneus, Diphtheriebazillen) konstatieren (ARLOING und COURMONT, STRAUSS und GAMALEIA, BAIL, RIST). Doch hat erst WOLFF-EISNER hervorgehoben daß die nach Bakterienimmunisierung auftretende Überempfindlichkeit der ARTHUSschen Anaphylaxie völlig analog sei und auf dem Gehalt des Mikrobenleibes an Proteïnen beruhe.

Systematisch bearbeitet wurde die Bakterienanaphylaxie erst durch ROSENAU und ANDERSON, namentlich aber durch KRAUS und DOERR. ROSENAU und ANDERSON gewannen aus Typhus-, Coli-, Heu-, Tuberkel-, Anthraxbazillen, sowie aus Hefezellen (s. a. AXAMIT) durch wiederholtes langes Einfrieren der Agaraufschwemmungen, Wiederauftauenlassen und schließliche Filtration durch Berkefeldkerzen, ganz oder fast atoxische Filtrate. Mit diesen konnten sie bei Meerschweinchen durch einmalige Injektion geringer Mengen eine spezifische Hypersensibilität erzeugen, welche bei der nach ca. 3 Wochen ausgeführten subkutanen oder intraperitonealen Reinjektion großer Dosen des homologen Extraktes in Erscheinung trat.

KRAUS und DOERR arbeiteten ebenfalls an Meerschweinchen, welche mit kleinen Dosen ($^1/_2$—1 Öse) von Typhus- oder Dysenteriebazillen, Cholera-, Nasik- oder El-Tor-Vibrionen subkutan vorbehandelt waren. Diese wurden nach 20—25 Tagen auf ihre Hypersensibilität geprüft; hierzu benutzten KRAUS und DOERR 24stündige Agarkulturen, die mit $^1/_{10}$ Normalsodalösung und zwar 10 ccm pro Agarflasche abgeschwemmt und 24 Stunden der Autolyse bei Zimmertemperatur überlassen wurden. Die Reinjektionen wurden durchweg intravenös und zwar in die frei präparierte Jugularis vorgenommen.

Die Tiere bekamen, falls sie anaphylaktisch waren, sofort nach der Injektion schwerste Dyspnoe, legten sich nach längstens einer Minute auf die Seite, waren schwer komatös, entleerten massenhaft Urin und Faeces und verendeten z. T. nach 5—10 Minuten nach einigen schnappenden Atemzügen, z. T. erholten sie sich nach etwa einer Viertelstunde derart, daß mit Ausnahme von Respirationsstörungen kein Unterschied gegen die Kontrollen sichtbar war.

Die Bakterienanaphylaxie ist hochspezifisch. So reagieren mit Typhusbazillen vorbehandelte Meerschweinchen nur auf die Reinjektion von Typhusextrakt; Choleraextrakte, ja nicht einmal Paratyphusextrakte vermögen einen anaphylaktischen Stock auszulösen.

Nur mit El-Tor-Vibrionen sensibilisierte Tiere reagieren auch auf Choleraextrakt; es zeigt sich also bezüglich der anaphylaktischen Eigenschaften bei diesen beiden Vibrionenarten eine ähnliche Übereinstimmung wie bei ihrer Agglutination.

Kraus und Doerr sprechen die Hoffnung aus, die anaphylaktische Reaktion zur genaueren Bakteriendifferenzierung und zu diagnostischen Zwecken heranziehen zu können.

Dieser Anregung ist nun offenbar Yamanouchi gefolgt, der in letzter Zeit versuchte, die menschliche Tuberkulose auf anaphylaktischer Basis zu diagnostizieren. Er übertrug das Serum Tuberkulöser präventiv auf Kaninchen, um zu sehen, ob dieselben dadurch passiv gegen die Produkte der Tuberkelbazillen (Tuberkulin) überempfindlich werden. Es ist abzuwarten, ob sich Yamanouchis Angaben bestätigen werden*).

Doch sei hier hervorgehoben, daß die ganze Basis dieser Experimente durch Kraus und Doerr geschaffen wurde; sie waren nämlich die Ersten, welchen die passive Übertragung der Bakterienanaphylaxie gelang. Sie vermochten den anaphylaktischen Zustand bei normalen Meerschweinchen durch präventive Injektion des Serums hypersensibler Tiere hervorzurufen.

Dieser Nachweis eines anaphylaktischen Reaktionskörpers ist dasjenige Moment, wodurch die anaphylaktische Natur der bei Reinjektion von Bakterienextrakten auftretenden Symptome allein sichergestellt wurde. Kraus und Doerr werden in demnächst zu publizierenden Versuchen zeigen, daß die Symptome selbst hierzu nicht ausreichen.

Danach haben Kraus und Doerr das Fundament für experimentelles oder diagnostisches Weiterarbeiten auf diesem Gebiete geschaffen.

Da manche Bakterienextrakte stark toxisch sind, so ergeben sich bei denselben ähnliche Verhältnisse, wie bei dem giftigen Serumeiweiß (Aalserum, Mytilokongestin). Auch hier entstehen neben Antitoxinen gegen das Gift der Bakterien Sensibilisine gegen das spezifische Eiweiß. Daß man es hier mit verschiedenen Antigenen und verschiedenen Immunkörpern zu tun hat, ergibt sich schon daraus, daß auch atoxische Bakterienextrakte Anaphylaxie hervorrufen resp. den Shok beim hypersensiblen Tiere auslösen (Rosenau und Anderson). Kraus und Doerr erbrachten auch noch auf einem anderen Wege den Beweis, daß das Toxin verschieden sein müsse von dem Körper, der beim empfindlichen Tiere den Shok auslöst (Antisensibilisin).

Sie stellten aus Kruseschen Dysenteriebazillen das Toxin dar, welches sich durch keimfreie Filtration jüngerer Bouillonkulturen relativ rein gewinnen läßt. Mit Dysenteriebazillen sensibilisierte Meerschweinchen wurden nun nach 20 Tagen reinjiziert und zwar einerseits mit Toxinlösung, gegen welche normale Meerschweinchen unempfindlich sind, und mit Agarextrakten. Nur in letzterem Falle traten anaphylaktische Symptome auf.

Ähnliche Erscheinungen wie bei Meerschweinchen beobachtet man auch bei Ziegen und Pferden (Kraus und v. Stenitzer), welche mit Bakterien oder Bakterienextrakten intravenös behandelt werden, um nach Besredka wirksame Antitoxine zu gewinnen. Ziegen sind allerdings gegen die intravenöse Injektion von gewissen Bakterienextrakten (Typhus-,

*) Bei der Nachprüfung der Angaben von Yamanouchi hat sich ergeben, daß der Ausfall der Versuche wesentlich von der primären Giftigkeit des verwendeten Tuberkulins abhängt. Mit einem giftigen Tuberkulin kann man auch durch Vorbehandlung der Kaninchen mit normalem Pferdeserum, Bouillon die von Yamanouchi beschriebenen Erscheinungen hervorrufen. Andere Tuberkuline (Höchst alt, TR, Tuberkulin Wien) vermochten bei Kaninchen, welche mit Serum tuberkulöser Menschen (bis 10 ccm) vorbehandelt waren, weder nach einmaliger, noch nach zweimalger Injektion Erscheinungen hervorzurufen (Kraus).

Paratyphus, Meningokokkenextrakten) überhaupt sehr empfindlich, indem manche schon der Erstinjektion unterliegen. Doch ist die Reaktion nach wiederholten Injektionen qualitativ anders, indem die Erscheinungen viel stürmischer verlaufen.

Die Ziegen kollabieren bei der dritten oder vierten intravenösen Injektion von Giftmengen, welche das erste oder zweite Mal vertragen wurden, sofort, zeigen schwere Dyspnoe, liegen komatös da und erholen sich erst nach einiger Zeit. Manche Tiere verenden auch im Anfall in 6—8 Stunden.

Ebenso verhalten sich subkutan vorbehandelte Ziegen, wenn man zu intravenösen Injektionen übergeht. Das gleiche gilt für Pferde.

Diese Feststellungen besitzen für Immunisierungspraxis einen bedeutenden Wert; es ergibt sich das Dilemma, daß von der Subkutis aus die Herstellung von Antitoxin wohl infolge partieller Zerstörung oder Entgiftung der Antigene nicht gelingt, während die intravenöse Behandlung zwar bessere Resultate liefert, wegen der Anaphylaxie jedoch mit enormen Materialverlusten verknüpft ist. Der beste Ausweg wäre jedenfalls die Trennung des Giftes vom Bakterieneiweiß, ein Problem, das gegenwärtig noch ungelöst bleibt.

Damit wäre ein Überblick über die theoretisch-experimentelle Seite der Anaphylaxiefrage gegeben, soweit Eiweißkörper in Frage kommen.

Die Versuche von Richet mit Apomorphin, von Aducco mit Kokain, sowie eigene mit Strychnin, Anaphylaxie zu erzeugen, sind sämtlich als gescheitert zu betrachten. Wo dennoch Überempfindlichkeit beobachtet wurde, war dies nach 3—4 Tagen der Fall, so daß Kumulativwirkungen nicht ausgeschlossen werden konnten. Zudem gelang es nie, gegen solche Gifte passiv Anaphylaxie hervorzurufen; der Nachweis des anaphylaktischen Reaktionskörpers ist aber ein unerläßliches Postulat, um solche scheinbare Überempfindlichkeiten als Immunprozesse zu charakterisieren. Es ist vorauszusehen, daß alle derartigen Bestrebungen genau so resultatlos verlaufen werden, wie die Antitoxindarstellung gegen Morphin.

Serumanaphylaxie beim Menschen.

Die Frage der Anaphylaxie gewinnt aber auch noch eine zweite Bedeutung, wenn wir die praktische Anwendung der Heilsera heranziehen. Wir kennen heute eine ganze Reihe von zweifellos wirksamen, therapeutisch und prophylaktisch bewährten Seris (gegen Diphtherie, Dysenterie, Tetanus, Cerobrospinalmeningitis) und die Forschung ist emsig bemüht, auch gegen andere Krankheiten (Typhus usw.) eine ätiologische Serotherapie zu ermöglichen. Bei dieser Sachlage kann es leicht vorkommen, daß ein Individuum, welches an derselben oder einer anderen Infektionskrankheit nach Wochen, Monaten oder Jahren erkrankt, ein zweitesmal Pferdeserum erhält, da in unseren Instituten ausschließlich Pferde zur Serumgewinnung verwendet werden. Ebenso besteht die Möglichkeit, daß ein prophylaktisch z. B. gegen Diphtherie injiziertes Individuum nach einiger Zeit (2—3 Wochen) wirklich erkrankt und nun zu kurativen Zwecken mit Pferdeserum reinjiziert wird.

Treten nun auch beim reinjizierten Menschen Erscheinungen auf, welche dem anaphylaktischen Shok bei Tieren entsprechen, und können sie so intensiv werden, daß dadurch das Leben bedroht wird? Ganz verneinen kann man diese Frage nicht. So berichtet Otto über folgenden Fall: Ein kräftiges 10jähriges Mädchen hatte vor zwei Jahren, als es an Diphtherie erkrankt war, die Einspritzung mit Fläschchen Nr. I ohne Reaktion vertragen. Es wurde nun, da zwei Geschwister an Diphtherie erkrankt waren, neuerlich prophylaktisch mit $^1/_3$ derselben Serummarke (= $^8/_{10}$ g) subkutan injiziert. Es bekam 5 Minuten danach einen stark juckenden Ausschlag an der Injektionsstelle, dann nach 10 Minuten ein skarlatinöses Exanthem am ganzen Körper. Später stellten sich Ohnmachtsanfälle, Schwindel und Herzschwäche ein. In der Nacht trat Schweiß auf, und am anderen Morgen war die Herztätigkeit bedeutend besser. Noch viel ernster verlief der Fall von Flexner; ein Kind litt an einer eminent chronisch verlaufenden Cerebrospinalmeningitis und erhielt wiederholt Meningokokkenserum. Die letzte Injektion wurde nach einem längeren Intervall ausgeführt, in der Hoffnung, die mehrwöchentliche Krankheit noch günstig zu beeinflussen. Die Erscheinungen Dyspnoe, Cyanose, Fieber, Koma waren derart, daß das Leben unmittelbar bedroht schien; doch ging der Rash glücklich vorüber. Ähnliche Fälle finden sich auch bei v. Pirquet und Schick, sowie bei Rosenhaupt, Lémaire, u. a. In der Literatur existieren noch weitere Berichte, darunter auch über etwa 20 Todesfälle (Klotz, Rosenau und Anderson); doch sind sie nicht kritisch gesichtet, viele von ihnen sind Erstinjektionen und bei den anderen bleibt es meist unklar, ob der Tod auf Rechnung des Serums oder der Grundkrankheit (insbesondere Diphtherie) zu setzen sei.

Im allgemeinen werden wir nicht fehlgehen, wenn wir mit Currie die Gefahr nicht allzuhoch veranschlagen. Schließlich haben ja v. Pirquet und Schick, sowie auch Currie genug Reinjektionen von Pferdeserum am Menschen ausgeführt, ohne je einen Todesfall zu beobachten. Man muß auch in Erwägung ziehen, daß im Experiment der Exitus anaphylaktischer Tiere nur dann eintritt, wenn man subkutan große Dosen verwendet, während nach kleineren Dosen die Symptome milder verlaufen. Intravenös genügen allerdings sehr kleine Serumvolumina.

Immerhin scheint es doch außerordentlich wünschenswert, wenigstens die Folgen der Reinjektion zu vermeiden. Die Serumkrankheit der Erstinjizierten könnte man noch in den Kauf nehmen.

Die bisherigen Bestrebungen richten sich jedoch naturgemäß gegen beide Formen der Serumkrankheit, da man allerdings ohne jeden Grund annimmt, daß die Substanz, welche bei der ersten Injektion toxisch wirkt, auch die Zufälle bei der Reinjektion auslöst.

Da die verschiedenen Sera im Tierversuch sowie beim Menschen ungleiche Giftigkeit besitzen, so hat man daran gedacht, den Grad derselben experimentell festzustellen. Der Vorschlag (v. Pirquet und Schick), jede Serumpartie am Menschen zu prüfen, ist praktisch wohl undurchführbar. Die von Besredka vorgeschlagene Methode der intracerebralen Injektion abgestufter Serummengen bei gleich sensibilisierten Meerschweinchen gibt wieder wegen der individuellen und Rassedifferenzen der Tiere nur zweifelhafte Resultate. Besredka will Sera, welche den Tod der anaphylaktischen Meerschweinchen in Mengen von $^1/_{20}$ ccm oder darunter herbeiführen, zum therapeutischen Gebrauch nicht zulassen. Es wurde schon erwähnt (pag. 871), daß dann ein und dasselbe Serum in Paris

als giftig, in Deutschland oder anderwärts als zulässig gelten würde und umgekehrt.

Dagegen sind die Sera unmittelbar nach dem Aderlaß sicher gefährlicher, wenigstens für Erstinjektionen, wie schon Bujwid wußte, und die Forderung von Besredka, die Sera zwei Monate vor der Abgabe abzulagern, empirisch begründet. Dies geschieht in den meisten Instituten ohnehin.

Einen praktischen Versuch im großen, das Serum für Erstinjektionen ungefährlich zu machen, hat eigentlich nur Gibson ausgeführt. Von der Beobachtung ausgehend, daß die Antitoxine bei Fällung der Sera mit Ammoniumsulfat nahezu quantitativ ins Präzipitat übergehen, gab er ein Verfahren an, um die antitoxischen Globuline reiner darzustellen und von den Nukleoproteiden und anderen Globulinen zu trennen. Diese Methode versprach auch insofern ein Resultat, als bei partieller Fällung eines Serums mit Ammoniumsulfat die toxischen Körper noch im flüssigen Teile nachweisbar sind. Sie scheinen aber doch auch partiell ausgefällt zu werden.

So erklären sich wenigstens die Berichte von Park und Throne über die Anwendung des Gibsonserums.

50 Kinder, mit einem bestimmten Vollserum behandelt, zeigten in 36 Fällen Serumexantheme, in 35 Fällen Fieber und Gelenkschmerzen, während andere 50, die dasselbe nach Gibson gereinigte und konzentrierte Serum erhielten, noch immer in 23 Fällen mit Exanthemen reagierten. Man wird, wenn man mit den bekannten statistischen Unsicherheiten rechnet, dieses Resultat nicht allzuhoch veranschlagen.

Die Versuche, dem Serum das anaphylaktisierende Antigen zu entziehen, respektive seine Fähigkeit, beim sensibilisierten Individuum die Anaphylaxie auszulösen, sind nach dem, was wir über die Resistenz dieser Substanzen wissen, noch weniger aussichtsvoll. Es scheint nur, als ob das Pasteurisieren des Serums (mehrstündiges Erwärmen auf 56—60° durch 4—5 Tage) die Gefährlichkeit der Reinjektion anaphylaktischer Individuen mindert (Besredka).

Doch wird dadurch auch der Antitoxingehalt alteriert.

Unter diesen Verhältnissen müßte man wohl bei der Serotherapie anamnestisch eine eventuelle frühere Injektion zu ermitteln suchen. Hat sie stattgefunden, wenn auch vor langer Zeit (siehe den Fall von Otto, den Fall von Currie, betreffend die 10 Jahre alte Janet G., wo nach 1817 Tagen noch schwere Symptome bei der Reinjektion auftraten), so wird man sich zur neuerlichen Injektion nur bei wichtiger Indikation entschließen. Man wird dann hochwertiges Serum (geringe Volumina) und jedenfalls nur subkutan, nicht aber intravenös oder intraspinal injizieren.

Ein weiterer Ausweg wäre auch die Herstellung häufiger angewendeter Sera an verschiedenen Tieren. Vorläufig zwingen uns jedoch die vorliegenden Beobachtungen nicht, derart tiefgreifende Neuerungen in dem ohnehin schwierigen Betrieb der Seruminstitute Platz greifen zu lassen.

Literatur.

Aducco, Arch. ital. de biolog. 1894.
Anderson, J. F., Matern. transmission of immunity to diphtherietox. Washington, Hyg. Laborat. 1906, Nr. 30.
Ders., Hypersuscept. to horse serum. Journal of med. research. 1906, Vol. XV.
Anderson, J. F. und Rosenau, M. J., Further studies upon anaphylaxis. Journ. of med. research. 1908, Vol. XIX, Fol. 1. July.
Arthus, Injections répétées de sérum de cheval chez le lapin. Bull. de la Soc. de Biol. 1903.
Ders., Sur la séro-anaphylaxie du lapin. Ibid. 1906.
Arthus und Breton, Bull. de la Soc. de Biol. 1903.
Axamit, O., Überempfindlichkeitserscheinungen nach Hefeinjektion. Archiv für Hygiene, Bd. LXII.
Batelli, Bull. de la Soc. de Biol. 1905.
v. Behring, Deutsche med. Wochenschr. 1893.
Ders., Allgemeine Therapie der Infektionskrankheiten 1899.
v. Behring und Kitashima, Über Verminderung und Steigerung der ererbten Giftempfindlichkeit. Berliner klin. Wochenschr. 1901, Nr. 6.
Besredka, C., Toxicité des serums therapeutiques, sa variabilité et son dosage. Ann. de l'Inst. Pasteur. Oktober 1907.
Ders., Comment peut-on combattre l'anaphylaxie. Ann. de l'Inst. Pasteur. Dez. 1907.
Ders., Du mécanisme de l'anaphylaxie vis-a-vis du sérum de cheval. Ann. de l'Inst. Pasteur 1908. Juni.
Ders., De l'anaphylaxie lactique. Compt. rend. de la Soc. de Biol., Tome LXIV. Mai 1908.
Besredka und Steinhardt, De l'anaphylaxie et de l'antianaphylaxie vis-à-vis du sérum de cheval. Ann. de l'Inst. Pasteur. Februar 1907.
Dies., Du mécanisme de l'antianaphylaxie. Ibid. Mai 1907.
Bokay, Die Heilserumbehandlung gegen Diphtherie im Budapester Stephanie-Kinderspital. Jahrb. f. Kinderheilk. 1897, Bd. XLIV.
Brun, Contribution à l'étude de l'anaphylaxie. Thèse de Montpellier 1907.
Clintock and King, The oral administr. of antitox. and hypersuscept. Journ. of inf. diseas. 1906, Vol. III.
Currie, Examples of the immediate and of the accelerated reaction following two injections of antidiphtherialserum. Journ. of Hyg. 1907, Vol. VII. Januar.
Ders., On the supersensitation of persons suffering from diphtheria by repeated injections of horse serum. Journ. of Hyg. 1907. Januar.
Courmont, Études sur les substances solubles prédisposantes à l'action pathogène de leurs microbes producteurs. Revue de med. 1891.
Dehne und Hamburger, Experimentelle Untersuchungen über die Folgen parent. Einverleibung von Pferdeserum. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 29.
Doerr, Über Anaphylaxie. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 13.
Doerr und Raubitschek, Toxin und anaphylaktisierende Substanz des Aalserums. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 33.
v. Dungern, Die Antikörper. Gustav Fischer, Jena 1903.
Francioni, La malattia da siero. Lo sperimentale 1904.
Frey, Studien über Serum-Überempfindlichkeit, im besonderen das Theobald-Smithsche Phänomen. Arbeiten aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskr. in Bern 1908, Heft 1. Gustav Fischer, Jena.
Friedemann, U., Über passive Überempfindlichkeit. Münch. med. Wochenschr. 1907.
Friedemann und Isaac, Über Eiweißimmunität und -Stoffwechsel. Zeitschr. für experim. Pathologie und Therapie 1905, 1906.
Dies., Weitere Untersuchungen über den parenteralen Eiweißstoffwechsel, Immunität und Überempfindlichkeit. Ibid. 1907.
Gay und Adler, On the chemical separation of the sensiting fraction (anaphylactin) from horse serum. Journ. of med. res. 1908, Bd. XVIII. Juni.
Gay und Southard, On Serum Anaphylaxis in guinea-pig. Journ. of med. research. T. XVI. Mai 1907.
Dies., Further studies in anaphylaxis. Journ. of med. research. 1908, Vol. XVIII und XIX.
Dies., On the mechanism. of serum anaphylaxis and intoxication in the guinea-pig Ibid.
Dies., On recurrent anaphylaxis and repeated intoxication in guinea-pigs by means of horse serum Ibid.

Gay und Southard, The relative specificity of anaphylaxis. Ibid.
Dies., The localisation of cell and tissue anaphylaxis in the guinea-pig, with observations on the cause of death in serum intoxication Ibid.
Gengou, Sur les sensibilatrices des sérums actifs contre les substances albuminoides. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902.
Gibson, Journ. biol. Chemistry 1906, Vol. I.
Godall, On the supersensitation of persons by horse-serum. Journ. of Hyg. 1907, Vol. VII.
Gottstein, Über Todesfälle bei Anwendung des Diphtherie-Heilserums. Therapeut. Monatsh. 1896.
Grünbaum, Supersens. to aliene Serum. Journ. of hyg. 1908, Vol. XIII.
Heilner, Über die Wirkung großer Mengen artfremden Blutserums im Tierkörper nach Zufuhr per os oder subkutan. Zeitschr. für Biol. 1907, Bd. L.
Ders., Über die Wirkung künstlich erzeugter physikalischer (osmotischer) Vorgänge im Tierkörper usw. Ibid.
Ders., Versuch eines indirekten Fermentnachweises (durch Alkoholzufuhr); zugleich ein Beitrag zur Frage der Überempfindlichkeit. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 49.
Héricourt und Richet, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1898.
Horwitz, Ein Fall von Idiosyncrasie gegen Hühnereiweiß. Münchener med. Wochenschrift 1908, Nr. 22.
Johannessen, Über Injektion mit antidiphtheritischem Serum und reinem Pferdeserum. Deutsche med. Wochenschr. 1895, Nr. 51.
Klemperer, Über die Gefahr der Reinjektion größerer Mengen von Heilserum. Therapie der Gegenwart. September 1908.
Kinyoun, Einige Beobachtungen über das Pferdeblut. Philad. P. S. ref. Centralbl. f. Bakt. Bd. XL Ref.
Ders., On the Deter. of Diph.-Antitox. Ibidem Bd. XL.
Knorr, Experimentelle Untersuchungen über die Grenzen der Heilungsmöglichkeit des Tetanus. Habil.-Schrift Marburg 1895.
Kraus und Doerr, Über Bakterienanaphylaxie. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 28.
Kraus, Doerr und Shoma, Über Anaphylaxie, hervorgerufen durch Organextrakte (Linsen). Ibid. Nr. 30.
Kraus und v. Stenitzer, Über anaphylaktische Erscheinungen bei Immunisierung mit Giften der Typhus- und Paratypusbazillen. Wiener klin. Wochenschr. 1907.
Lemaire, H., Recherches cliniques et éxperimentales sur les accidents séro-toxiques. Thèse de Paris 1905. Steinheil.
Lepine, Sémaine med. 1905.
Lewis, The induced susception of the guinea-pig to the toxin action of the blood serum of the horse. Journ. exper. med. 1908, Vol. X.
Löwenstein, Das Tuberkulin zu diagnostischen Zwecken. Kraus-Levaditi, Handb. der Technik und Methodik der Imm.-Forschung. Jena 1908.
Marfan, Leçons sur la diphthérie. Paris 1906.
Marfan und Lemaire, Contribution à l'étude des accidents sero-toxiques. Revue mens. des malad. de l'enf. Januar 1907.
Menzer, Medizinische Klinik 1905.
Moreschi, Zur Lehre von den Antikomplementen. Berliner klin. Wochenschr. 1905.
Netter, Compt. rend. Soc. de Biol. 1906, Tome LX.
Nicolle, Etude sur la morve experiméntale du cobaye. Ann. de l'Inst. Pasteur 1906, Nr. 10.
Ders., Contribution à l'étude du phénomène d'Arthus. Ann. de l'Inst. Pasteur 1907, Nr. 22.
Ders. und Abt, Les anticorps des alb. et des cellules. Ann. de l'Inst. Pasteur 1908.
Ders. und Pozerski, Les antic. des tox. solubl. Ibidem 1908.
Otto, Das Theobald-Smithsche Phänomen der Serumüberempfindlichkeit. v. Leuthold Gedenkschrift 1906, Bd. I.
Ders., Zur Frage der Serumüberempfindlichkeit. Münchener med. Wochenschr. 1907.
Ders. Anaphylaxie. Kolle-Wassermann Handb. der path. Mikroorganism. II. Erg.-Bd., 2. Heft.
Park und Throne, The results of the use of refined diphtheria antitoxin, Gibsons „globulin praeparation“, in the treatment of diphtheria. Americ. Journ. of the med. Sc. 1906.
Pfeiffer, Zeitschr. für Hyg., Bd. LIV.
Pick und Yamanouchi, Studien über Anaph. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 44.
v. Pirquet, Klinische Studien über Vaccination und vaccinale Allergie. Wien, Deuticke 1907.

v. Pirquet, Allergie. Münchener med. Wochenschr. 1906.
Ders., Allergie. Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde, Bd. I.
v. Pirquet und Schick, Zur Theorie der Inkubationszeit. Wiener klin. Wochenschrift 1903.
Dies., Die Serumkrankeit. Wien, Deuticke 1907.
Dies., Überempfindlichkeit und beschleunigte Reaktion. Münchener med. Wochenschrift 1906.
Portier und Richet, De l'action anaphylactique de certains venins. Soc. de biol. 1902, Tome CLXX.
Remlinger, Contribution à l'étude du phénomène d'anaphylaxie. Soc. de Biol. 1907, Bd. I.
Richet, Arch. di fisiolog. 1904 und Soc. de Biol. 1903, 1904 und 1905.
Ders., Soc. de Biol. 1907.
Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1907.
Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur 1908.
Rostoski, Über den Wert der Präzipitinreaktion als Untersuchungsmitttel für Eiweiß. Münchener med. Wochenschr. 1902; Deutsche med. Wochenschr. 1903.
Rist, Sur la toxicité des corps de bacilles diphtheritiques. Soc. de biol. 1903, Bd. LV.
Rolleston, Practitioner, Bd. LXXIV.
Rosenau and Anderson, A study on the cause of sudden death following the injection of horse serum. Hyg. Labor. Washington Bull. 1906, Vol. XXIX.
Dies., Hypersusceptibility. Journ. americ. med. Assoc. 1906, Vol. XLII.
Dies., A new toxic action of horse serum. Journ. med. research. 1906, Vol. XV.
Dies., The influence of antitoxin upon postdiphther. paralysis. Hyg. Labor. Washington Bull. 1907, Nr. 38.
Dies., Studies upon hypersusceptibility and immunity. Ibid. 1907, Nr. 36.
Dies., The specific nature of anaphylaxis. Journ. of infect. diseases 1907. Nov.
Saeli, Biolog. Centralbl. 1905.
Salomonsen et Madsen, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897.
Salus, Wirkungen normaler Sera auf den Organismus. Med. Klinik 1908, Nr. 27.
Schofield, Ref. Münchener med. Wochenschr. 1908.
Smith, Discussion of „Hypersusceptibility". Journ. of americ. med. Assoc. 1906, Vol. XLVII.
Tuffier, Presse med. 1907.
Vasconcellos, Anaphylaxia. Travaux de l'Institut de Manguinhos, Rio de Janeiro 1907.
Vaughan, Discussion of „Hypersusceptibility". Journ. of am. med. Assoc. 1906, Vol. XLVII.
Vaughan und Wheeler, The effects of egg-white and its split products on animals; a study of susceptibility and immunity. Journ. of inf. diseas. 1907.
Dies., A study of susceptibility and immunity. Am. meeting of assoc. of am. phys. Washington 1907.
Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle-Wassermann, Bd. IV, Teil I.
Weil-Hállée und Lemaire, Quelques conditions de l'anaphylaxie sérique passive chez le lapin et le cobaye. Soc. de Biol. 21. Dezember 1907.
Dies., Actions epêchant d'un antisêrum sur la production de précipitine. Compt. rend. de la Soc. de Biol., 1907, Tome LXIII.
Dies., L'anaphylaxie passive du cobaye pour le serum de cheval. Compt. rend. de la Soc. de Biol., 1908, Tome LXV.
Wolff-Eisner, Untersuchungen über einige Immunitätsfragen. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Centralbl. f. Bakt. 1904.
Ders., Über Eiweißimmunität und ihre Beziehungen zur Serumkrankheit. Centralbl. f. Bakt., 1906, Bd. XL.
Ders., Typhustoxin, Typhusantitoxin und Typhusendotoxin. Die Beziehungen zwischen Überempfindlichkeit und Immunität. Berliner klin. Wochenschr. 1907.
Yamanouchi, Über die Anwendung der Anaphylaxie zu diagnostisehen Zwecken. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 47.
Zucker, Wiener klin. Wochenschr. 1907.

Antikörper gegen tierische Zellen.

XXXV.

Hämolysine und Cytotoxine des Blutserums.

Von

Prof. Dr. Hans Sachs,

in Frankfurt a. M.

Seitdem man erkannt hat, daß die Fähigkeit der Antikörperauslösung nicht nur den pathogenen Mikroorganismen, sondern auch den tierischen Zellen ganz allgemein eigen ist, sind letztere als Testobjekte in der Immunitätsforschung mit Vorliebe herangezogen worden. Da der tierische Organismus nicht nur auf die Injektion von Bakterien, sondern auch auf die Einverleibung von Körperzellen mit der Produktion von Antikörpern antwortet, die in ihrer Konstitution und Wirkungsweise mit den gegen Bakterien gerichteten Antikörpern eine völlige Analogie aufweisen, so stand nichts im Wege die an ersteren gewonnenen Erfahrungen auf letztere zu übertragen. Die Antikörper der tierischen Körperzellen werden in der Regel nach dem Vorgang von METSCHNIKOFF als „Cytotoxine" zusammengefaßt. Dementsprechend sollen in diesem Abschnitte des Handbuches, nicht etwa alle Zellgifte behandelt werden, wie es der eigentlichen Bedeutung des Wortes „Cytotoxine" entsprechen würde, sondern ausschließlich cytotoxische Antikörper, welche mit Antigenen tierischen Ursprungs gewonnen werden, und ihre physiologische Analoga. In letzterer Hinsicht sei daran erinnert, daß auch Cytotoxine bereits normalerweise im Blute vorhanden sein können und es sind, wie das ja für alle Antikörper zutrifft und in der Seitenkettentheorie EHRLICHS, die die Antikörperbildung als einen excessiv gesteigerten physiologischen Vorgang auffaßt, zu einem kausalen Ausdruck gelangt.

Wenn das Studium der Cytotoxine bereits in allgemein-biologischer, physiologischer und toxikologischer Hinsicht von größter Bedeutung ist, so mußte die Beschäftigung mit ihnen für die Immunitätsforschung von hohem Nutzen darum sein, weil sie es gestattet, die Erforschung der Serumwirkungen, von denen in praktischer Hinsicht die von den Antikörpern der Bakterien ausgeübten am wichtigsten sind, an Zellen vorzunehmen, die ein weit exakteres Arbeiten, als die Bakterien gestatten. Besonders geeignet sind naturgemäß solche Zellen, welche die eingetretene Schädigung durch sinnfällige Veränderungen dokumentieren. Dadurch ist man gleichzeitig in der Lage, den Schauplatz der Wirkung aus dem Tierkörper heraus in das Reagenzglas zu verlegen und somit die denkbar

übersichtlichsten Bedingungen herzustellen. Unter allen Zellarten nehmen wiederum die roten Blutkörperchen eine bevorzugte Stellung ein, die einerseits in der Möglichkeit einer gleichmäßigen Verteilung und Dosierung des Zellmaterials begründet ist, andererseits in dem Umstand, daß die Schädigung resp. das Absterben der Zelle sich durch das durch den Austritt des Hämoglobins bedingte Lackfarbenfaden aufs markanteste dokumentiert, einen Vorgang, der „Hämolyse" bezeichnet wird. Die Antikörper der roten Blutzellen veranlassen das Lackfarbenwerden der entsprechenden Blutart und werden daher als „Hämolysine" unter den Cytotoxinen charakterisiert. Aus den erwähnten Gründen sind die Hämolysine am meisten zum Studium der Cytotoxinwirkungen herangezogen worden. Die aufgefundenen Getetze sind aber für das Gesamtgebiet der Cytotoxinwirkung giltig und bilden heute einen der wichtigsten Grundpfeiler der Serologie. Im folgenden wird daher der breiteste Raum der Besprechung der Hämolysine gewidmet sein; daneben wird auch der Hämagglutinine des Blutserums, die durchaus den Bakterienagglutininen entsprechen, gelegentlich gedacht werden. Die übrigen Cytotoxine, für welche im allgemeinen die bei der Hämolysinforschung zu besprechenden Gesichtspunkte gelten, werden zum Schluß eine kurze Besprechung finden.

I. Hämolysine.

Hämolysine kommen vielfach normalerweise im Blutserum vor. Immunisatorisch können sie durch Einverleibung fremdartigen Blutes, wie zuerst Bordet und unabhängig davon von Dungern und Landsteiner gezeigt haben, beliebig erzeugt, resp. wenn bereits vorhanden, außerordentlich vermehrt werden. Die Hämolysine des Blutserum teilen mit den meisten Toxinen die Eigenschaft der Thermolabilität, sie werden durch Erhitzen auf 50–60° inaktiviert; für die normalen Hämolysine ist dies seit Daremberg, für die Immunhämolysine durch Bordet bekannt. Bordet stellte weiterhin fest, daß ein derart inaktiviertes Immunserum durch Zusatz eines normalen, die betreffenden Blutkörperchen nicht lösenden frischen Blutserums wieder hämolytisch wird. Der von Bordet gezogene Schluß, daß das Hämolysin aus zwei Komponenten besteht, von denen die eine thermostabile nur im Immunserum, die andere thermolabile auch im normalen Serum vorhanden ist, fand durch die bald darauf Ehrlich und Morgenroth geglückte Trennung der beiden Komponenten im aktiven Immunserum seine volle Bestätigung. Für die beiden Komponenten des Hämolysins werden folgende Bezeichnungen von den verschiedenen Autoren gebraucht.

a) für die thermostabile Substanz: Ambozeptor (Ehrlich und Morgenroth), Immunkörper, Zwischenkörper, Substance sensibiliratrice (Bordet), Copula (P. Müller), Desmon (London), Philocytase, Fixateur (Metchnikoff), Präparator (Gruber), Hilfskörper (Buchner);

b) für die thermolabile Substanz: Komplement, Addiment (Ehrlich und Morgenroth), Alexin (Buchner, Bordet), Cytase (Metchnikoff).

Im folgenden werden die heute wohl gebräuchlichsten Ausdrücke „Ambozeptor" und „Komplement" beibehalten, deren Bedeutung zugleich auf die Ambozeptortheorie der Hämolysinwirkung (Ehrlich und Morgenroth) hinweist, nach welcher der Amboceptor als Bindeglied zwischen Zelle und Komplement fungiert.

A. Gewinnung und Vorkommen.

Die normalen Hämolysine des Serums werden in einfachster Weise durch Blutentnahme und Gewinnung des Serums erhalten; über die Art des Vorgehens ist bereits im Kapitel „Antigene tierischen Ursprungs“ (I. Band dieses Handbuches) berichtet worden. Ebenso besteht das Gewinnen der Komplemente lediglich in der Darstellung von Blutserum.

Was die immunisatorische Erzeugung von Hämolysinen anlangt, so ist es im allgemeinen zweckmäßig, solche Tierarten zur Immunisierung zu wählen, deren Serum an und für sich die betreffenden Blutkörperchen nicht auflöst. Man kann so am genauesten das Auftreten der Hämolysine beobachten und hat auch dann in dem Serum von normalen Tieren gleicher Art ein einwandsfreies Komplement zur Verfügung. Jedoch kann man allgemeine Regeln für die Wahl des Tieres und der Blutart nicht geben. Nach Rémy tritt die Amboceptorbildung bei der Immunisierung in erhöhtem Maße ein, wenn das Serum der Tiere schon an und für sich für die zu injizierende Blutart hämolytisch ist. Am meisten sind für Hämolysinstudien, besonders auch im Frankfurter Institut für experimentelle Therapie, die Sera von Kaninchen verwandt werden, die mit Rinderblut vorbehandelt waren. Das Kaninchen liefert bei Immunisierung mit Rinder-, wie auch mit Hammel-, Ziegen-, Schweine- und Hundeblut usw. stark wirksame Hämolysine. Man injiziert Kaninchen und Meerschweinchen zweckmäßig intraperitoneal, da hierbei störende Eiterungen, wie sie bei nicht sterilem Material im Gefolge subkutaner Injektionen häufig auftreten, vermieden werden. Um Darmverletzungen bei dem Einstechen der Kanüle zu vermeiden, wird das Tier von einem Gehilfen in vertikaler Lage mit dem Kopfe nach unten gehalten, während man selbst die Bauchdecken anhebt und in dem unteren Drittel der Bauchwand die letztere durchsticht. Auch die intravenöse Injektion ist bei Kaninchen leicht und mit Vorteil auszuführen. Jedoch ist sie nur für die erste Injektion zu empfehlen. Bei wiederholter intravenöser Einverleibung der gleichen Blutart läuft man Gefahr, die Tiere durch die rasche Hämolyse des injizierten Blutes in der Blutbahn, welche auf die inzwischen gebildeten Hämolysine zurückzuführen ist, zu verlieren, wie dies zuerst von Rehns beschrieben worden ist. Will man Meerschweinchen, oder auch kleinere Tiere intravenös injizieren, so dürfte die von Morgenroth bei Studien über das Diphtheriegift verwandte direkte Injektion ins Herz einen relativ einfachen Ausweg bilden. — Vögel werden in den großen Brustmuskel oder intraperitoneal injiziert. Auch bei Ziegen ist die peritoneale Injektion von Blut zu empfehlen; im übrigen kommt natürlich bei der Immunisierung von größeren Tieren die subkutane Injektion besonders in Frage. Die Fähigkeit der Hämolysinbildung ist nach den Untersuchungen von Kreidl und Mandl bereits in der letzten Zeit des intrauterinen Lebens vorhanden und erstreckt sich nach Angaben Noguchis und Lazars auch auf gewisse Kaltblüter (Schildkröten und Frösche).

Was das Injektionsmaterial anlangt, so ist bereits bei Besprechung der Antigene darauf hingewiesen worden, daß die antikörperauslösenden Bestandteile der roten Blutkörperchen, die Rezeptoren, in den Stromata gelegen sind. Da fernerhin die Rezeptoren nicht im morphologischen Sinne differenziert sind, also die Rezeptoren der Blutkörperchen auch an anderen Körperzellen vorkommen und auch in die tierischen Säfte gelangen, so kann man die gleichen Hämolysine auch durch Injektion der

Organzellen oder der Säfte derselben Tierart erzeugen. Ein derartiges Vorgehen wird aber nur dann in Betracht kommen, wenn es sich um den Nachweis von Rezeptoren in den betreffenden Geweben oder Flüssigkeiten handelt. Wird aber lediglich beabsichtigt, Hämolysine zur weiteren Untersuchung zu erzeugen, so ist als Injektionsmaterial ausschließlich Blut zu empfehlen, welches das am bequemsten zu erhaltende und am kräftigsten wirkende Antigen der hämolytischen Amboceptoren darstellt. Das zur Injektion dienende defibrinierte Blut soll serumfrei gewaschen sein. Es ist dies nicht überflüssig, um einmal schädliche Wirkungen des Serums zu vermeiden, die besonders bei intravenöser Injektion in Erscheinung treten können, dann aber auch, um die Bildung störender Antikörper der Serumbestandteile (Präzipitine, Eiweißamboceptoren, Antiamboceptoren, eventuell Antikomplemente) auszuschließen. Als Injektionswege kommen, wie erwähnt, peritoneale, intravenöse oder subkutane Applikation in Betracht. Auch werden bei Einverleibung des Blutes per os nach Métalnikoff, Gareis, Bertarelli Hämolysine gebildet (Injektion des defibrinierten Blutes mittels Schlundsonde in den Magen).

Zur Hämolysinerzeugung können alle Blutarten benutzt werden*), nach Szczawinska auch das Blut von Wirbellosen (Krebsen), ferner, wie die Untersuchungen Bordets, v. Dungerns, Krompechers gezeigt haben, auch kernhaltige Blutzellen; durch die im letzteren Falle gebildeten Hämolysine werden die Kerne nach Versuchen Landaus nicht angegriffen, wogegen Krompecher das Gegenteil angab.

Die Menge des zu injizierenden Blutes muß der Größe der Versuchstiere und den im einzelnen Fall vorliegenden Verhältnissen angepaßt sein. Bei Kaninchen injiziert man 30 ccm Blut (Rind, Hammel, Ziege etc.) peritoneal und erhält dadurch eine starke Hämolysinbildung, die man durch eine nach 8—10 Tagen wiederholte Injektion von 30 bis 40 ccm Blut steigern kann. Weitere Injektionen sind in der Regel zwecklos, können sogar nach vielfachen Erfahrungen eine Abnahme des Hämolysingehalts ins Blutserum verursachen, wie dies auch Rémy besonders hervorhebt. Zu beachten sind auch individuelle Verschiedenheiten in der Fähigkeit der Ambozeptorbildung. Bei intravenöser Injektion muß man darauf achten, ob das Serum des zu immunisierenden Tieres Hämolysine für die zu injizierenden Blutkörperchen enthält. Ist dies nicht der Fall, wie dies z. B. für die übliche Immunisierung von Kaninchen mit Rinderblut zutrifft, so kann man bei einmaliger intravenöser Injektion Blutmengen bis zu 30 ccm und darüber einverleiben. Sind normale Hämolysine im Blutserum bereits vorhanden, wie z. B. bei der Immunisierung von Kaninchen mit Hammel-, oder Ziegenblut, so ist Vorsicht am Platze. Bei intraperitonealer Injektion fallen diese Beschränkungen fort. Kleineren Tieren wird man entsprechend weniger injizieren, Meerschweinchen etwa 6—8 ccm intraperitoneal, größeren Tieren erheblich größere Quantitäten, Ziegen 200 ccm bis zur doppelten Menge und darüber. Ehrlich und Morgenroth haben sogar zwecks Erzeugung von Isolysinen Ziegen 900 ccm Ziegenblut auf einmal intraperitoneal injiziert. Diese Autoren empfehlen in solchen Fällen, wenn ein besonders scharfer „ictus immunisatorius“ angestrebt wird, die Resorption des Blutes durch Wasserzusatz zu beschleunigen. Es wird da-

*) Nach v. Dungern und Coca können auch durch Injektion von durch Osmium fixierten Blutkörperchen Hämolysine erzeugt werden. Derart erhaltene Immunsera wirkten auf osmiertes Blut stärker hämolytisch, als die durch Injektion normalen Blutes erzeugten.

durch eine teilweise oder vollständige Hämolyse des Blutes erzielt (zu 900 ccm Blut 750 ccm Wasser). Von Interesse und Wichtigkeit ist es, mit wie geringen Blutmengen man noch Hämolysine erzeugen kann. SACHS fand bei intravenöser Injektion 0,125 ccm Rinderblut bei Kaninchen hinreichend für eine Hämolysinproduktion, wenn auch zum Erzielen eines stark wirkenden Hämolysins die Injektion von mindestees 1 ccm erforderlich war. Dagegen berichten FRIEDBERGER und DORNER, daß bei intravenöser Injektion des Kaninchens mit Ziegenblut 0,5—1,0 mg einer 5%igen Blutaufschwemmung, also noch 0,000025 ccm Blut zur Auslösung von Hämolysinen genügen. Vielleicht ist diese ausgesprochene Reaktionsfähigkeit dadurch bedingt, daß das Kaninchenserum bereits normalerweise Hämolysine für Ziegenblut enthält. Bei subkutaner Injektion waren größere Blutmengen erforderlich. Übereinstimmend sind die Angaben von SACHS, sowie von FRIEDBERGER und DORNER darin, daß die mit geringen Blutmengen erzeugten Hämolysine einer raschen Abnahme und baldigem Schwund unterliegen. Wie die letzteren Autoren hervorheben, erscheint die Erzeugung von Hämolysinen mit kleinsten Blutmengen besonders geeignet, um den Einfluß verschiedener Faktoren und Eingriffe auf die Hämolysinproduktion zu studieren. FRIEDBERGER und DORNER (vgl. auch DORNER) fanden in dieser Hinsicht eine erhebliche Begünstigung durch den Aderlaß. Es wurden den Kaninchen 10—20 ccm Blut*) aus der Carotis vor oder nach der Blutinjektion entzogen, im letzteren Falle mit größerer Wirkung. Nach LÜDKE sind auch bei immunisierten Tieren starke Aderlässe ohne wesentlichen Einfluß auf den Hämolysingehalt des Blutserums; fortgesetzte Aderlässe sollen allerdings eine Abnahme bewirken, ebenso Nahrungsentziehung. Von ABBOTT und BERGEY liegen Untersuchungen über den Einfluß des Alkohols auf die Hämolysine vor. Danach bedingt fortgesetzte Darreichung von Alkohol bei immunisierten Kaninchen per os eine Abnahme der hämolytischen Ambozeptoren, während die Alkoholzufuhr vor Beginn der Immunisierung eine erheblich verminderte Widerstandsfähigkeit gegenüber den Blutinjektionen verursacht.

In Versuchen von TROMMSDORFF ergab sich eine Beeinträchtigung in der Bildung hämolytischer Ambozeptoren nach vorausgegangener starker Abkühlung, intensiver Ermüdung, nach längerem Hunger und nach längere Zeit gegebenen Alkoholdosen. Dagegen begünstigten kleine einmalige Alkoholdosen, ebenso wie nicht zu große Blutentziehungen, kurzdauernde Muskelanstrengung die Antikörperbildung.

Was die Inkubationszeit anbetrifft, d. h. diejenige Zeit, welche zwischen Blutinjektion und dem ersten Auftreten der hämolytischen Ambozeptoren gelegen ist, so ist sie von der Art der Applikation abhängig. Wie schon BULLOCH gezeigt hat, beträgt sie bei subkutaner Injektion etwa 7 Tage, während bei intraperitonealer und intravenöser Einverleibung bereits am dritten Tage der kritische Eintritt der Hämolysinbildung erfolgt, Nach den Untersuchungen von SACHS schwankt bei intravenöser Injektion die Inkubationszeit zwischen 2 und 4—5 Tagen, und ist von der injizierten Blutmenge im wesentlichen unabhängig; jedoch verliert der Begriff der Inkubationszeit insofern an Bestimmtheit, als man annehmen muß, daß bereits vor dem Nachweis hämolytischer Ambozeptoren im Serum solche gebildet sind, aber sogleich von den noch im Kreislauf befindlichen Blutkörperchen gebunden werden und zu

*) Sehr große Aderlässe sollen den entgegengesetzten Effekt haben.

deren Elimination dienen; letztere erfolgt unter einer kritisch einsetzenden Hämoglobinurie, die dem ersten Auftreten freier Ambozeptoren im Serum vorangeht (Sachs). Auch Lüdke bestätigt die Erfahrungen der anderen Autoren und gibt als Inkubationszeit bei subkutaner Injektion durchschnittlich 7 Tage, bei intraperitonealer 4—6 Tage an. Nach allgemeiner Erfahrung erreicht der Hämolysingehalt des Blutserums nach begonnener Ambozeptorenbildung rasch das Maximum. Als geeigneter Termin für die Blutentnahme dürfte daher im allgemeinen der 9.—10. Tag nach der letzten Blutinjektion gelten; bei peritonealer oder intravenöser Injektion von Kaninchen kann man dann fast mit Sicherheit auf ein möglichst ambozeptorreiches Serum rechnen. Andererseits kommen auch Variationen vor, wie z. B. die erst am 15. Tage erfolgte kritische Entstehung von Isolysinen bei der Ziege beweist, über die Ehrlich und Morgenroth berichten. Durch Probeblutentnahmen vor der Entblutung des Versuchstieres wird man sich vor unangenehmen Überraschungen schützen. Nicht anzuraten ist es, dem immunisierten Tiere, das hämolytische Ambozeptoren enthält, von Fall zu Fall Blut zu entnehmen. Da der Hämolysingehalt nach dem Aufstieg zum Maximum mehr oder weniger allmählich wieder sinkt, empfiehlt es sich vielmehr, möglichst viel Serum auf einmal, am besten durch Entbluten des Tieres zu gewinnen. — Wie bereits erwähnt, stellen bei der Immunisierung mit Blut lediglich die Ambozeptoren die neugebildeten Stoffe dar. Die Komplemente bleiben unbeeinflußt oder weisen doch nur sehr geringfügige Schwankungen auf, wie von Dungern und Bulloch erwiesen haben. Wenn man auch, wenigstens bei intravenöser Injektion, wie Sachs gezeigt hat, ein Stadium des Sinkens des Komplementgehaltes und ein solches der Komplementsteigerung differenzieren kann, Verhältnisse, die durch die Elimination der noch in der Blutbahn vorhandenen injizierten Blutmenge bedingt sind, so ist doch die Norm sicherlich ziemlich lange wiederhergestellt, wenn der Ambozeptorgehalt eine nennenswerte Höhe erreicht hat, wie sich dies auch aus den Beobachtungen Rémys ergiebt. Befunde von Lüdke, nach denen am 9. oder 10. Tage nach der Blutinjektion oft eine Abschwächung oder vollständige Aufhebung der hämolytischen Kraft des Serums wahrzunehmen ist, und welche auf Autoantikomplemente im Sinne der zuerst von Ehrlich und Morgenroth bei Injektion von fremdartigem Blutserum beobachteten Erscheinung bezogen wurden, müssen wohl heute als eine durch das Zusammenwirken von Eiweißantigen und Antikörper bedingte Komplementbindung*) gedeutet werden und dürften sich daher bei Injektion serumfrei gewaschenen Blutes vermeiden lassen. — Schließlich sei erwähnt, daß auch bei gleichzeitiger Injektion mehrerer Blutarten Ambozeptoren gegen alle einverleibten Antigene gebildet werden (Wendelstadt), und dabei, wie Brezina gezeigt hat, eine wesentliche Konkurrenz der Antikörper nicht besteht.

Was den Ort der Hämolysinbildung anbetrifft, so kommen die zur Erforschung der entsprechenden Fragen für die Antikörper im allgemeinen geltenden Methoden in Betracht. Es handelt sich zunächst um das zuerst von Pfeiffer und Marx benutzte Prinzip, zu ergründen, ob Antikörper in gewissen Organen oder Zellelementen eher oder in größerer Menge als im Blutserum angetroffen werden. In dieser Beziehung liegen Untersuchungen von Sick vor, welche die nach der

*) Es handelt sich um das sog. Phänomen der Komplementablenkung, auf das an späterer Stelle einzugehen sein wird.

Immunisierung mit Blut entstehenden Hämagglutinine betreffen. Pick konnte in den Preßsäften einer Reihe von Organen, nicht nur der hämatopoetischen, Agglutinine in höherer Konzentration nachweisen, als es dem Blutgehalt der Organe entsprach. Der daraus zu ziehende Schluß, daß die Bildungsstätten der hämagglutinierenden Antikörper ziemlich verbreitet sind, entspricht den mehrfachen Erfahrungen, nach denen die Fähigkeit der Antikörperbildung den verschiedensten Organzellen zukommt (Wassermann und Citron usw.). — Die zweite Art des Vorgehens beruht in der Ausschaltung gewisser Organe, der sich zuerst Deutsch zur Beantwortung der Frage nach dem Orte der Antikörperbildung bedient hat. Soweit die Hämolysine in Betracht kommen, hat Jakuschewitsch einen Einfluß der Milzexstirpation auf die Hämolysinbildung nicht nachweisen können. Ebenso konnte Brezina durch Injektion von leukotoxischem Serum, das eine Schädigung der hämatopoetischen Organe bedingen sollte, keine Änderung der Hämolysinproduktion erreichen, wogegen die Agglutininbildung herabgesetzt war.

Man kann die Hämolysine in drei Klassen einteilen:

1. Heterolysine, welche auf die Blutkörperchen einer anderen Tierart wirken*),

2. Isolysine, welche gegen Blutzellen der gleichen Spezies gerichtet sind,

3. Autolysine, welche auf die Blutzellen des eigenen Individuums wirken.

Soweit es sich um die Erzeugung von Heterolysinen handelt, besteht die Gesetzmäßigkeit der Antikörperbildung ganz allgemein. Daß aber auch Isolysine entstehen können, ist seit den Untersuchungen Ehrlichs und Morgenroths bekannt. Dieselben wirken aber meist nicht gegen die Blutkörperchen aller Individuen der gleichen Spezies, sondern in der Regel nur auf die Blutkörperchen einer Reihe von Individuen, niemals gegen die eigenen. Die Erzeugung von Autolysinen ist Ehrlich und Morgenroth nicht gelungen, und es ist noch eine offene Frage, ob solche überhaupt immunisatorisch entstehen. Ascoli berichtet über das Entstehen von Isolysinen bei Kaninchen nach Injektion der eigenen Blutkörperchen**). Einige klinische Fälle von Hämoglobinurie nach starken Blutungen in die großen Körperhöhlen (Michaelis, Kober, Tauber) wurden im Sinne einer durch die massenhafte Resorption des eigenen Blutes veranlaßten Hämolysinbildung gedeutet. — Daß die durch Blutimmunisierung erhaltenen Immunsera auch agglutinierend wirken können, sei noch hinzugefügt. Bei mit Blut vorbehandelten Tieren hat Friedberger den Übergang der Ambozeptoren und Agglutinine in den Urin, Kraus den Übergang der Hämagglutinine in die Milch beobachtet.

Was die normalen Körpersäfte anlangt, so ist das Vorkommen von Heterolysinen im Blutserum weit verbreitet und seit langem bekannt. Auch in den serösen Flüssigkeiten (Transsudate, Exsudate, Cerebrospinalflüssigkeiten usw.) können Hämolysine nachgewiesen werden (vergl. Strauss und Wolff, H. Strauss, Hedingfr, Marshall u. a.). Da-

*) Die heterolytische Fähigkeit der Blutsera ist zu Studien über die Blutsverwandtschaft der Tierarten benutzt worden, so bereits von Landois in Transfusionsversuchen, in neuerer Zeit von Friedenthal in Reagenzglasexperimenten.

**) Verwiesen sei auch auf die Beobachtungen von Hulot und Ramond über Anämien, welche sie bei Kaninchen nach Blutentziehungen und intraperitonealer oder subkutaner Injektion des eigenen Blutes eintreten sahen.

gegen dürfte die hämolytische Fähigkeit des Harns über die Sabrazès und Fauquet, sowie Camus und Pagniez berichten, wohl, wie Pugnat meint, durch Verhältnisse der Anisotonie bedingt sein. Auch die saure Reaktion des Urins ist dabei zu berücksichtigen. Daß auch Hämagglutinine normaler Weise vorkommen, ist schon von Creite und Landois beschrieben. Zahlreiche Untersuchungen liegen über den Gehalt des normalen Blutserums an Isoagglutininen und Isolysinen vor, welche zuerst von Landsteiner, Donath und Halban beschrieben wurden. Nach Ascoli und Klein kommen auch Autoagglutinine im normalen Blutserum vor*). Autohämolysine sind bisher nur bei paroxysmaler Hämoglobinurie im Blutserum von Kretz, Mattirolo und Tedeschi, Donath und Landsteiner aufgefunden und von den letzteren Autoren in ihrer eigentümlichen, später zu erörternden Wirkungsart erkannt worden.

Anhangsweise sei auf die zahlreichen Arbeiten hingewiesen, welche sich mit dem hämolytischen und agglutinierenden Verhalten des Blutserums unter normalen und pathologischen Verhältnissen beschäftigen**). Die Angaben sind vielfach widersprechend und noch wenig geklärt; ich nenne von den Autoren Ascoli, Camus und Pagniez, Eisenberg, Gonseff, Grixoni, Grünbaum, Halban und Landsteiner, Halpern, Hedinger, Hektoen, Howard, Klein, Landsteiner, Landsteiner und Leiner, Landsteiner und Sturli, Langer, Longcope, Maragliano, Marshall, Lo Monaco und Panichi, Polk, Schattock, Trommsdorff und viele andere. Was die Annahme einer Reihe von Autoren betrifft, welche den Gehalt des Blutserums an Isolysinen und Isoagglutininen mit dem Blutzerfall in Zusammenhang bringen wollen, so haben Untersuchungen von Kraus und Ludwig sowie von Wassermann keine experimentelle Stütze für diese Anschauung erbringen können, indem es diesen Autoren nicht gelang, durch eine beträchliche Zerstörung der Erythrocyten, welche sie mittels Injektion von Blutgiften erreichten, eine Bildung von Isolysinen und Agglutininen hervorzurufen. — Erwähnt seien auch die Arbeiten Kellings, welche das hämolytische Verhalten des Serums bei Karzinom betreffen.

Marx und Ehrnrooth haben den Gehalt des menschlichen Blutserums an Heterolysinen und Agglutininen dazu benutzt, eine Methode auszuarbeiten zur Unterscheidung von Menschen- und Tierblut, die sie mit Recht nur als Vor- und Hilfsprobe angesehen wissen wollen. Nach den Angaben dieser Autoren enthält Menschenserum stets Lysine und Agglutinine für die verschiedensten Blutarten, die selbst in 30 Jahre alten Blutproben noch nachweisbar sind; im Gegensatz dazu wird von den Isoagglutininen des Menschenserums angegeben, daß sie nicht regelmäßig vorhanden sind, nur auf die Blutkörperchen einer relativ geringen Zahl von Mensehen wirken und sich überdies im angetrockneten Blut nur 2—4 Wochen lang halten. Das Verfahren besteht darin, daß ein Tropfen der zu untersuchenden extrahierten Blutlösung mit einem Tropfen Menschenblut auf dem Objektträger gemischt wird. Ist bei mikroskopischer Untersuchung Agglutination wahrzunehmen, so handelt es sich um Tierblut, im anderen Falle um Menschenblut. Martin weist zwar gegenüber der Marx-Ehrnroothschen Methode auf die großen Schwankungen des Isoagglutiningehalts im menschlichen Blutserum hin***) und hegt aus gleichem

*) Klein berichtete auch über Hämagglutination durch Extrakte aus roten Blutkörperchen.

**) H. Pfeiffer weist auf den Parallelismus zwischen hämolytischer, nekrotisierender und allgemein-toxischer Wirkung der normalen Sera hin.

***) Zu dem gleichen ablehnenden Standpunkt gelangt auch Blank.

Grunde Bedenken gegen eine von Landsteiner und Richter angegebene forensische Verwertung der Isoagglutinine. Nach den genannten Autoren enthält menschliches Blutserum fast stets Iso-, aber niemals Autoagglutinine. Es wird daher an die Möglichkeit gedacht, auf Grund dieses Verhaltens eine individuelle Blutdifferenzierung anzubahnen. Wenn auch der praktischen Verwendbarkeit schon der Umstand im Wege steht, daß die Isoagglutinine nicht lange haltbar sind, so sind die tatsächlichen Verhältnisse von Verdier doch als richtig anerkannt. Keinesfalls wird man das Ausbleiben der Agglutination als beweisend ansehen dürfen, aber immerhin bei positivem Ausfall den Schluß ziehen können, daß das untersuchte Blut nicht von demjenigen Individuum stammt, dessen Blutkörperchen benutzt wurden.

B. Nachweis und Wirkung.

Der Nachweis der Hämolysine geschieht in Reagenzglasversuchen und ist durch das Lackfarbenwerden der roten Blutkörperchen in einfachster Weise erkenntlich. Das zum Nachweis dienende Blut muß serumfrei gewaschen sein und kommt in der Regel in 5%igen Aufschwemmungen zur Verwendung. Als Suspensionsmittel für die Blutkörperchen dient eine isotonische (0,85%) Kochsalzlösung; für Hundeblut und Pferdeblut empfiehlt es sich, wegen der leicht erfolgenden spontanen Hämolyse eine stärkere Salzkonzentration (0,95%) zu verwenden. Die 5%ige Blutaufschwemmung wird in der Weise gewonnen, daß eine abgemessene Menge defibrinierten Blutes mit dem mindestens 20fachen Volumen Kochsalzlösung gemischt wird. Die Mischung wird zentrifugiert, das erhaltene Sediment nach dem Abgießen der überstehenden Flüssigkeit wieder mit der gleichen Menge von Kochsalzlösung aufgenommen und abzentrifugiert. Nach nochmaligem Wiederholen des Vorganges wird das schließlich erhaltene Blutsediment in soviel Kochsalzlösung aufgenommen, daß das Gesamtvolumen der Blutaufschwemmung das 20fache der ursprünglichen Blutmenge darstellt. Eine derartige 5%ige Blutaufschwemmung ist bei sorgfältigem Aufbewahren auf Eis 2–3 Tage haltbar.

Die Anwesenheit von Salz ist für die Hämolyse durch Blutserum durchaus erforderlich. Es ist daher nicht angängig, die physiologische Kochsalzlösung etwa durch isotonische Rohrzuckerlösung zu ersetzen. In letzterer erweisen sich, wie man nach früheren Angaben H. Buchners erwarten konnte und neuere Untersuchungen von Ferrata und Sachs-Teruuchi dargetan haben, die Immunhämolysine als unwirksam. Auf diese Erscheinung wird gelegentlich der Besprechung der Komplemente näher einzugehen sein. Normale Sera können übrigens nach Girard-Mangin und Henri, sowie Sachs und Teruuchi in Rohrzuckerlösung stärker hämolytisch wirken als in Kochsalzlösung.

Von der 5%igen Blutaufschwemmung in 0,85%iger Kochsalzlösung dient in der Regel 1 ccm als Testmenge. Es empfiehlt sich, nach dem Vorgange von Ehrlich und Morgenroth die hämolytische Kraft des Serums quantitativ zu bestimmen. Man füllt zu diesem Zweck eine Reihe von Reagenzgläsern mit verschiedenen, fallenden Mengen des Blutserums, dessen hämolytische Kraft zu bestimmen ist. In die einzelnen Röhrchen wird soviel Kochsalzlösung zugegeben, daß überall gleiches Volumen resultiert. Dazu kommt je 1 ccm 5%ige Blutaufschwemmung. Das Optimum der Temperatur für die hämo-

lytische Wirkung liegt bei 37°—40°. Die die Reagenzgläser enthaltenden Gestelle werden daher 2 Stunden lang im Brustschrank gehalten. Nach dieser Zeit kann das Resultat abgelesen werden, wenn man es nicht vorzieht, die Röhrchen noch über Nacht im Eisschrank aufzubewahren, was den Vorteil hat, daß sich während dieser Zeit die nicht gelösten Blutkörperchen sedimentiert haben und daher bei der Beurteilung der überstehenden Flüssigkeit nicht störend wirken.

Da es sich bei der Bestimmung der hämolytischen Wirkungen und Reihenversuche handelt, so empfiehlt es sich, wenn auf eine gewisse Genauigkeit des Ergebnisses Wert zu legen ist, die Quantitäten in den einzelnen Gliedern der Reihe so abzustufen, daß die Genauigkeit zwischen zwei Gliedern der Reihe stets die gleiche ist. Dies geschieht dadurch, daß man die Mengen von Serum usw., welche in den einzelnen Reagenzgläsern verwendet werden, nicht im Sinne einer arithmetrischen Reihe, sondern wie die Glieder einer geometrischen Reihe fallen läßt. Da man Abmessungen unter 0,1 ccm besser vermeidet, wird in der Regel so verfahren, daß man von der Originallösung nur soweit abmißt, bis dieser Grenzpunkt erreicht ist, für geringere Mengen aber das zehnfache Multiplum der zehnfachen Verdünnung verwendet. Es handelt sich demnach stets um geometrische Reihen, deren Anfangsglied 1,0, deren Endglied 0,1 ccm beträgt. Ich lasse die sich ergebenden Werte nach einer jüngst von Fuld gelegentlich andersartiger Versuche gegebenen Zusammenstellung tabellarisch folgen. Die Köpfe der Tabelle bezeichnen die Zahl der Glieder, die für den betreffenden Versuch erforderlich sind.

3	4	5	6	7	8	9	10
1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,32	0,46	0,56	0,63	0,68	0,72	0,75	0,77
0,1	0,21	0.32	0,4	0,46	0,52	0,56	0,6
	0,1	0,18	0,25	0,32	0,37	0,42	0,46
		0,1	0,16	0,21	0,27	0,32	0,36
			0,1	0,15	0,19	0,24	0,28
				0,1	0,14	0,18	0,21
					0, 1	0,13	0,17
						0,1	0,13
							0,1

Ich selbst verfahre, wenn es sich um grobe Bestimmungen handelt, bei denen das folgende Glied stets die Hälfte der im vorhergehenden befindlicheu Menge enthalten soll, in der Weise, daß ich 1,0—0,5—0,25 ccm der Originallösung verwende und dann die gleichen Quantitäten einer 8fachen Verdünnung folgen lasse usw.

Es ergeben sich nun für die eingetretene Hämolyse zwei Grenzwerte:

1) Komplette Hämolyse: sämtliche Blutkörperchen sind gelöst, die Flüssigkeit erweist sich auch beim Schütteln vollständig durchsichtig rot, lackfarben;

2) Spur Hämolyse: fast sämtliche Blutkörperchen liegen ungelöst am Boden des Reagenzglases; die Flüssigkeit ist nur ganz wenig gerötet oder über dem Blutkörperchendepot ist eine kleine lackfarbene Zone vorhanden (Kuppe). Im nächsten Röhrchen, das eine etwas geringere Hämolysinmenge enthält, fehlt die Hämolyse überhaupt; die über dem Blutzellendepot stehende Flüssigkeit ist farblos.

Die dazwischenliegenden Grade der Hämolyse werden stufenmäßig als fast komplett, stark, mäßig, wenig bezeichnet.

Es ist sehr zu empfehlen die Reagenzgläser während des Aufenthalts im Brutschrank häufig, mindestens alle $^1/_2$ Stunden zu schütteln, um eine gleichmäßige Verteilung der Blutzellen in der Flüssigkeit zu erzielen. Besonders wichtig wird diese Forderung dann, wenn mit der Hämolyse eine Agglutination der roten Blutkörperchen vergesellschaftet ist, die den Austritt des Hämoglobins aus rein physikalischen Gründen erschwert. — Beim Vorgehen nach den obigen Angaben ist es gut, wenn die Flüssigkeitsmenge in den einzelnen Röhrchen 2,5 ccm nicht überschreitet. Abweichungen müssen event. nach den gegebenen und erforderlichen Verhältnissen Platz greifen. Im allgemeinen wird man aber mit der beschriebenen Methodik auskommen. Will man die Inkubationszeit bei der Hämolyse näher untersuchen, so kann unter Umständen das Vorgehen von Madsen am Platze sein, welches darin besteht, daß hohe Blutschichten verwandt werden und nicht geschüttelt wird. Die Blutkörperchen senken sich dann allmählich, und man kann aus dem Grade der Rotfärbung der einzelnen Zonen ein Urteil über das dem Beginn der Hämolyse vorangehende Inkubationsstadium gewinnen. Es sei in dieser Hinsicht auf den Beitrag von Madsen im ersten Bande dieses Handbuches (pag. 57ff) verwiesen, woselbst die Technik bei hämolytischen Versuchen eine allgemeine Besprechung findet. Ebenda ist auch über die kolorimetrische Bestimmung der Hämolyse nachzulesen, der manche Autoren den Vorzug geben. Bei den meisten Untersuchungen über die Hämolysine des Blutserums bedeutet das kolorimetrische Verfahren eine unnötige Komplikation der Technik, wenngleich es andererseits für gewisse Fragen von Vorteil sein kann.

Man kann auch bei sehr geringfügigem Material, oder wenn beabsichtigt ist, die morphologischen Veränderungen der Blutzellen näher zu verfolgen, den Vorgang der Hämolyse mikroskopisch untersuchen. Nach dem Vorgange v. Baumgartens wird dabei in der Weise verfahren, daß auf der Mitte eines Deckgläschens Blutkörperchen und Serum sorgfältig vermischt werden und die Beobachtung im hängenden Tropfen geschieht. Man sieht dann nach der Schilderung v. Baumgartens, auf dessen anleitende Ausführungen hier verwiesen sei, Form- und Größenveränderungen der roten Blutkörperchen, die sich in zackigen Konturen, Maulbeerform, Schrumpfungen und Blähungen, Schattenbildung, Plasmoschisis und Plasmorhexis äußern.

Es sei an dieser Stelle auch auf die Arbeiten v. Baumgartens hingewiesen, welche für die Auffassung der Serumhämolyse als einen osmologischen Vorgang plädieren (vgl. auch Nolf). Nachdem v. Baumgarten seinen ursprünglichen Standpunkt, nach dem die Blutkörperchen allein durch den Ambozeptor in ihrer Resistenz gegen osmotische Schädigungen herabgesetzt würden, aufgegeben hat, und die Notwendigkeit des Komplements für die Wirkung der Serumhämolysine anerkennt, dürfte allerdings der Unterschied der von ihm vertretenen Auffassung und derjenigen der Ehrlichschen Schule kein wesentlicher mehr sein. v. Baumgarten nimmt nunmehr an, daß durch die feste chemische Bindung des Hämolysins (i. e. Ambozeptor + Komplement) an das Stroma eine „molekulare“ Alteration eintritt, „der zufolge die normale Permeabilität (Semipermeabilität) des Stromas sich ändert, wodurch es zu Störungen des osmotischen Gleichgewichts zwischen dem Blutkörpercheninhalt und der umgebenden Flüssigkeit kommt“. Diese Theorie läßt den

Mechanismus der Ambozeptor- und Komplementwirkung resp. ihre Beziehungen zueinander zunächst unberührt. Sie deckt sich mit den von Ehrlich vertretenen Anschauungen darin, daß sie in der unmittelbaren Ursache der Hämolyse eine Alteration der diffusionsverhindernden Qualität des Stromas erblickt und differiert nur insofern, als sie letztere nicht auf Protoplasmatod, sondern nur auf eine „molekulare Alteration" zurückführt. Man kann also die Veränderung, welche die Hämolysine an dem Stroma bedingen, allgemein dahin definieren, daß das Stroma geschädigt und für das Hämoglobin durchlässig wird.

Eine Reihe von Arbeiten beschäftigen sich mit Untersuchungen der durch Blutserum verursachten hämolytischen Wirkungen von physikalisch-chemischen Gesichtspunkten aus. Es müssen hier an erster Stelle die Arbeiten von Henri, sowie Cernovodeanu und Henri genannt werden. Sie betreffen Studien über die Reaktionsgeschwindigkeit, Einfluß der Blut- und Serummenge (vergl. auch Mioni), sowie die hämolytische Wirkung von Serumgemischen. In Bezug auf die Deutung der hämolytischen Vorgänge im allgemeinen von physikalisch-chemischen oder kolloidchemischen Gesichtspunkten aus, sei ferner auf die Arbeiten von Arrhenius, Zangger, Frei, Manwaring verwiesen. Was dabei die Serumhämolysine anlangt, so vermißt man häufig eine genügende Berücksichtigung der komplexen Konstitution dieser Hämolysine und der verschiedenartigen in den Seris vorkommenden Stoffe, welche die Hämolyse nachweislich beschleunigen (Ambozeptoren) oder hemmen können (Komplementoide, Antikomplemente, Antiambozeptoren usw.). —

Was den Nachweis der Agglutination anlangt, so ist letztere meist schon makroskopisch erkenntlich, indem die agglutinierten Blutkörperchenhaufen, besonders beim Schräghalten des Reagenzglases, als feine rote Körnchen imponieren, während die Aufschwemmung des normalen Blutes homogen erscheint. Auch bedingt die Agglutination ein erheblich schnelleres Senken der aufgeschüttelten Blutkörperchen. Schließlich bewirkt sie, daß eine Aufschwemmung agglutinierten Blutes beim Passieren eines gewöhnlichen Papierfilters ein klar-farbloses Filtrat liefert. Während nämlich die isolierten Blutzellen die Poren des Filtrierpapiers passieren, werden die durch die Agglutination entstandenen Häufchen zurückgehalten. Bei mikroskopischer Betrachtung unterscheidet von Baumgarten von der eigentlichen Agglutination, der „Verschmelzung der osmotisch veränderten Blutkörperchen zu unregelmäßigen Klumpen, in welchen die Grenzen der einzelnen Körperchen nicht mehr oder nur ganz undeutlich zu erkennen sind", die Agglomeration: „sämtliche Körperchen sind ganz gleichmäßig rund, ihre Konturen völlig glatt; selbst in den dichtgedrängtesten Haufen kann man jedes Blutkörperchen scharf und deutlich von den benachbarten abgrenzen".

C. Die komplexe Konstitution der Hämolysine.

Es ist schon erwähnt worden, daß sämtliche Hämolysine des Blutserums in ihrer Konstitution darin übereinstimmen, daß sie durch das Zusammenwirken zweier Komponenten (Ambozeptor und Komplement) wirken. Zum Nachweis der komplexen Konstitution kommen im wesentlichen 3 Verfahren in Betracht:

1. Die Aktivierungsmethode,
2. Das Verfahren der Trennung von Ambozeptor und Komplement,

3. die Verstärkungsmethode.

ad. 1. Die Aktivierungsmethode ist zuerst von Bordet bei der Analyse der hämolytischen Immunsera angewandt worden. Sie beruht auf der Tatsache, daß das Komplement einerseits bereits im normalen Blutserum vorhanden, andererseits im Gegensatz zum Amboceptor sehr labil ist. Man kann also durch die verschiedenartigsten Eingriffe, die bei dem Kapitel „Komplemente" nähere Besprechung finden werden, die Komplemente zerstören, resp. derart verändern, daß sie unwirksam werden. Man nennt diesen Vorgang „Inaktivieren" der Sera. Von den Eingriffen, welche das hämolytische Serum inaktivieren, ist das Erhitzen der gebräuchlichste, so daß man unter inaktiviertem Serum im engeren Sinne erhitztes Serum versteht. Das Inaktivieren geschieht in der Weise, daß das Serum nach Einfüllen in Reagenzgläser und Verschluß der letzteren durch Wattebausch im Wasserbade $^1/_2$ Stunde lang erhitzt wird. Die zu wählende Temperatur muß zwei Forderungen erfüllen, sie muß die Komplemente unwirksam machen und den Amboceptor gleichzeitig ungeschwächt lassen. Für die Immunsera kann im allgemeinen eine Temperatur von 55°—56° als die kritische gelten. Jedoch muß daran erinnert werden, daß auch thermostabile Komplemente vorkommen können, welche der erwähnten Inaktivierungstemperatur widerstehen. Ein solches thermostabiles Komplement fanden Ehrlich und Morgenroth im Serum einer mit Hammelblut immunisierten Ziege und im Blute normaler Ziegen. Was die Immunamboceptoren anlangt, so sind sie im allgemeinen thermostabil, d. h. sie ertragen $^1/_2$stündiges Erhitzen auf 55°*).

Bei den normalen Amboceptoren ist aber eine derartige Thermostabilität durchaus nicht die Regel. Es hat sich in immer mehr Fällen — wir werden darauf bei der besonderen Besprechung der Amboceptoren noch zurückkommen — herausgestellt, daß normale Amboceptoren durch die übliche Inaktivierungstemperatur von 55° bereits derart geschädigt werden können, daß eine Aktivierung nicht mehr möglich ist. Es muß daher dann, wenn es sich um den Nachweis von Amboceptoren in normalen Seris handelt, gefordert werden, zunächst die niedrigste Temperatur zu bestimmen, bei der das Serum inaktiv wird, d. h. die ursprüngliche hämolytische Wirksamkeit einbüßt. Diese Temperatur wird dann zur Inaktivierung benutzt.

Da es bei derartigen Inaktivierungen auf eine konstante Temperatur und oft geringfügige Differenzen derselben ankommt, empfiehlt es sich, Thermometer mit breiter Gradeinteilung zu verwenden. Dieselben brauchen nur eine besimmte Zone von Graden (etwa 40 – 80°) zu umfassen und sind bei der Firma A. Haak in Jena erhältlich.

Ist das Serum inaktiviert, so sucht man dasselbe durch Hinzufügen eines normalen Serums (Komplement) wieder hämolytisch zu machen. Das ist bei dem inaktivierten Immunserum relativ leicht zu erreichen. Man geht in der Regel sicher, wenn man das normale Serum der gleichen Tierart, von der das Immunserum stammt, als Komplement benutzt. Jedoch kann ein solches Normalserum bereits an und für sich Amboceptoren für die betreffenden roten Blutkörperchen enthalten, so daß es auch ohne Zusatz von Immunserum hämolytisch wirkt. Es kommen dann zwei

*) Nach Michaelis und Fleischmann sind die durch Injektion von Organzellen entstehenden hämolytischen Amboceptoren weniger thermostabil, als die durch Blutimmunisierung gewonnen.

Möglichkeiten in Betracht. Entweder man benutzt als Komplement eine maximale Menge des Serums, die an und für sich der hämolytischen Wirkung entbehrt, oder man entfernt die Amboceptoren des normalen Serums nach Möglichkeit durch die Absorption des Serums mit den roten Blutzellen in der Kälte, ein Verfahren, auf das wir später ausführlich zu sprechen kommen werden. Über die sehr beschränkten Möglichkeiten, den Komplementgehalt der Sera zu erhöhen, wird beim Kapitel „Komplemente" eingegangen werden.

Der störenden Mitwirkung normaler Ambzoeptoren im komplettierenden Serum entgeht man mit Sicherheit, wenn man als Komplement das Serum derjenigen Tierart benutzt, welches auch die Blutkörperchen zum Versuch liefert, für welche also der Ambozeptor spezifisch ist. Allerdings kann bei diesem Vorgehen eine Komplikation dadurch eintreten, daß das den Ambozeptor enthaltende Immunserum gleichzeitig ein Antiserum für das gleiche Eiweiß, welches das komplettierende Serum liefert, darstellen kann, so daß die Hämolyse durch die erfolgende Komplementbindung (siehe später) gehemmt, wenn nicht überhaupt aufgehoben wird. Das Komplement kann aber unter diesen Bedingungen zur Wirksamkeit gebracht werden, wenn der Ambozeptor vorher auf die Blutzellen einwirkt und der Zusatz des komplettierenden Serums erst später erfolgt, oder noch besser, wenn die Blutkörperchen, welche den Ambozeptor gebunden haben, von den Bestandteilen des Immunserums vor dem Komplementzusatz durch Centrifugieren befreit werden. Nur so kann man wohl die eigentümliche Beobachtung von Muir und Browning verstehen, daß Rinderblutkörperchen, gleichzeitig mit Immunserum und Rinderserum gemischt, sich nicht lösen, aber der Hämolyse anheimfallen, wenn sie vor dem Zusatz des Rinderserums mit dem Immunserum digeriert worden sind.

Bestimmte Gesetze über die Wahl des geeigneten Komplements lassen sich also nicht aufstellen. Jedoch kann nach den Feststellungen Ehrlichs und Morgenroths über die Komplettierbarkeit der Ambozeptoren als allgemeine Regel gelten, daß die Wahrscheinlichkeit der Komplettierung umso größer ist, je näher verwandt die Tierart, deren Serum als Komplement Verwendung finden soll, derjenigen steht, von welcher der Ambozeptor stammt. Umgekehrt verliert die Komplettierungsmöglichkeit bei Verwendung des Serums ferner stehender Tierarten immer mehr an Wahrscheinlichkeit*). Als das beliebteste Komplement wird das Meerschweinchenserum mit Recht in sehr zahlreichen Fällen verwandt. Es ist ausgezeichnet durch einen großen Komplementreichtum für die verschiedensten Amboceptoren und einen sehr geringen Gehalt an normalen Ambozeptoren. Für den vom Kaninchen durch Vorbehandeln mit Rinderblut (oder Hammelblut) gewonnenen Ambozeptor stellt es in der Menge von 0,1 ccm (bei 1 ccm 5 $^0/_0$ Blutaufschwemmung) eine reichliche Komplementmenge dar, die an und für sich in der Regel völlig indifferent für die Blutkörperchen ist. Mit einer solchen reichlichen Komplementmenge kann man dann den wahren Ambozeptorgehalt des Immunserums bestimmen, indem man bei gleich bleibender Komplementmenge absteigende Mengen des Immunserums auf die Blutkörperchen wirken läßt und feststellt, welche minimale Immunserumdosis noch zur kompletten Hämolyse ausreicht**).

---

*) So konnte Lazar z. B. die hämolytischen Amboceptoren des Froschserums nur durch Froschserum, nicht durch andersartige Sera aktivieren.

**) Diese Menge — „die Ambozeptoreinheit" — soll bei wirksamen Immunseris der oben erwähnten Art höchstens 0,0015—0,001 ccm betragen.

Bezüglich der Aktivierung normaler Amabozeptoren müssen außer dem schon erwähnten Postulat, die Inaktivierung des Serums bei möglichst niedriger Temperatur vorzunehmen, noch einige Bemerkungen angeschlossen werden. Die Aktivierung normaler Ambozeptoren durch andersartige Sera ist zuerst von Ehrlich und Morgenroth geübt worden, denen wir ja auch die prinzipielle Feststellung der komplexen Konstitution normaler Hämolysine verdanken. Man kann nun den Ambozeptor dadurch zum Nachweis bringen, daß man das inaktivierte Serum mit den Blutkörperchen digeriert und dann die nach dem Zentrifugieren von der Zwischenflüssigkeit befreiten Sedimente mit dem komplettierenden Serum mischt. Die meisten Ambozeptoren — bei den Immunamboceptoren ist das die Regel — werden nämlich von den roten Blutzellen bei höherer Temperatur und sogar auch bei 0° gebunden, und die vorherige Bindung des Ambozeptors an die Zellen bietet in manchen Fällen den Vorteil, daß etwaige antikomplementär wirkende Stoffe, welche im amboceptorhaltigen Serum enthalten sein können, eliminiert werden. Die normalen Ambozeptoren weichen aber vielfach von der Regel insofern ab, als sie im isolierten Zustande (d. h. ohne Komplement) von den Blutkörperchen sehr schlecht oder gar nicht aufgenommen werden. Das haben zuerst Ehrlich und Sachs für den auf Meerschweinchenblut wirkenden und durch Pferdeserum komplettierbaren Ambozeptor des Rinderserums festgestellt, und diesem Befunde sind eine Reihe später zu erwähnender analoger Beobachtungen gefolgt. In solchen Fällen gelingt es natürlich nicht, die mit dem Ambozeptor digerierten Blutzellen durch das komplettierende Serum aufzulösen, weil der Ambozeptor eben gar nicht gebunden worden ist. Dagegen geht die Komplettierung dann bei gleichzeitigem Mischen von Blut, Ambozeptor und komplettierendem Serum ohne weiteres von statten. Die Komplettierung des bereits an die roten Blutkörperchen gebundenen Ambozeptors durch andersartiges Serum kann aber auch dadurch fehlschlagen. daß die im inaktivierten Serum noch vorhandenen Modifikationen der Komplemente, die Komplementoide, gebunden werden und so dem wirksamen Komplement des aktivierenden Serums den Zugang sperren. Zwar ist in den meisten Fällen, wie Ehrlich und Morgenroth gezeigt haben, mit der Komplementoidbildung eine derartige Herabsetzung der Avidität vergesellschaftet, daß Komplementoide von den amboceptorbeladenen Zellen entweder gar nicht gebunden, oder aber bei erfolgter Bindung von nativem Komplement verdrängt werden können, und bei Immunseris ist das Phänomen der „Komplementoidverstopfung" als störendes Moment bei Aktivierungsversuchen kaum zu befürchten, da ja die Ambozeptormenge im Immunserum den Komplementgehalt in der Regel erheblich überwiegt. Aber bei normalen hämolytischen Seris kann die Anwesenheit der Komplementoide doch gelegentlich störend interferieren, und von Ehrlich und Sachs ist in der Tat ein Fall (Meerschweinchenblut — inaktives Hundeserum [Ambozeptor] — Meerschweinchenserum [Komplement[) beobachtet worden, bei welchem die Komplementoidverstopfung markant in Erscheinung tritt. Wenn man nun unter solchen Bedingungen das Ambozeptor — und gleichzeitig Komplementoid — enthaltende Serum vorher mit den Blutzellen digeriert und erst später das aktivierende Komplement zusetzt, so bleibt die Hämolyse aus, während sie bei gleichzeitigem Mischen der drei Komponenten eintritt. Wenn man aber bei der Aktivierung der normalen Ambozeptoren in der Weise vorgeht, daß man das aktivierende Serum den zuvor mit Ambozeptor digerierten und von

der Zwischenflüssigkeit befreiten Blutkörperchen zusetzt, so muß man bei mißlungener Aktivierung mit der Möglichkeit rechnen, daß:

1) der Ambozeptor von den Blutzellen nicht aufgenommen ist und mit ihnen erst nach seiner Vereinigung mit dem Komplement reagiert,

2) der Ambozeptor zwar gebunden ist, mit ihm aber gleichzeitig das noch im inaktiven Serum vorhandene Komplementoid, das dem Komplement den Zugang wehrt.

Die durch die erste Möglichkeit bedingte Störung wird in einfachster Weise durch das gleichzeitige Mischen der Komponenten eliminiert. Im zweiten Falle kann das gleiche Vorgehen zum Ziele führen. Man kann aber auch die Komplementoide, ebenso wie die Komplemente durch verschiedene Mittel (Bindung in der Kälte, Absorption durch Hefe usw., Bindung bei erhöhter Salzkonzentration) entfernen, auf welche später noch einzugehen sein wird.

Bei der Komplettierung normaler Ambozeptoren durch andersartige Sera muß man sich freilich bewußt sein, daß man bei gelungener Aktivierung — streng genommen — nichts über die Konstitution des ursprünglichen Hämolysins im ambozeptorhaltigen Serum erfährt. Es ist dies ein Einwand, der von Gruber nicht mit Unrecht erhoben worden ist. Die Frage hat heute mehr historisches Interesse. Man nimmt jetzt wohl allgemein an, daß die normalen Hämolysine mit den immunisatorisch erzeugten die komplexe Konstitution teilen, d. h. durch das Zusammenwirken eines Ambozeptors und eines Komplements wirken. Diese Ansicht mußte sich aber erst in vielen Fällen zu ihrem Rechte durchkämpfen, da von Seiten der Buchnerschen Schule und besonders von Gruber an dem ursprünglichen Buchnerschen Alexinbegriff, der die normalen Hämolysine als einheitliche Stoffe definierte, festgehalten und eine Reihe von Kombinationen ins Treffen geführt wurden, in denen der Nachweis der komplexen Konstitution von den Autoren nicht erbracht werden konnte. Ganz abgesehen davon, daß in allen diesen Fällen von der Schule Ehrlichs die komplexe Konstitution nachgewiesen werden konnte, so würde doch das Fehlschlagen der Beweisführung in dem einen oder anderen Falle nicht im negativen Sinne zu verwerten sein. Denn sämtliche Methoden, die wir zum Nachweise der komplexen Konstitution besitzen, haben ihre Grenzen, und für die erörterte Aktivierungsmethode sind dieselben naturgemäß dann gegeben, wenn es nicht gelingt, ein Komplement aufzufinden, welches das betreffende inaktivierte Serum aktiviert. Wenn aber die Komplettierung eines inaktivierten, ursprünglich hämolytischen Serums einmal gelungen ist, so dürfte es, wenn auch nicht streng logisch, zulässig sein, zu schließen, daß der nunmehr nachgewiesene Ambozeptor ein Teilstück des nativen, auf die gleiche Blutart wirkenden hämolytischen Stoffes darstellt. Man gelangte sonst zu einer erheblichen Komplikation, indem man annehmen müßte, daß zweierlei Art von hämolytischen Agentien im normalen Serum existieren, Ambozeptoren und einheitliche Hämolysine, die gleichzeitig für ein und dieselbe Blutart vorhanden sind, eine Annahme, die man ohne irgend welchen Beweis wohl schwerlich akzeptieren dürfte. Wenn man aber Scheu hat, die Komplettierung des inaktivierten Serums durch andersartige Sera als einen vollgültigen Beweis für die komplexe Konstitution des ursprünglichen Hämolysins anzusehen, so stehen noch eine Reihe von Wegen offen, welche es gestatten, die Komplettierung durch das arteigene Komplement durchzuführen.

Ich nenne hier zunächst ein Verfahren, welches von SACHS geübt wurde. Dasselbe fußt auf Beobachtungen von HALBAN und LANDSTEINER, sowie von SACHS, nach denen das Fehlen der Hämolysine im fötalen Blute*) darauf beruht, daß im wesentlichen ein Ambozeptormangel besteht, während die Differenz im Komplementgehalt in der Regel nicht sehr groß ist. Man hat also im gleichartigen fötalen Serum sehr oft ein reines oder fast reines Klomplement in Händen, so daß es leicht ist, eine Dosis des fötalen Serums zu wählen, die an und für sich der hämolytischen Wirkung entbehrt, aber noch reichliche Mengen Komplement enthält, um das inaktivierte Serum des gleichartigen Erwachsenen zu aktivieren. So konnte SACHS den auf Meerschweinchenblut wirkenden Amboceptor des inaktiven Rinderserums durch fötales Rinderserum komplettieren, und POLANO gelang unabhängig davon auf analoge Weise die Aktivierung des im inaktivierten Menschenserum enthaltenen auf Taubenblut wirkenden Ambozeptors durch fötales Menschenserum. Man kann aber noch auf andere Weise die Aktivierung des Ambozeptors durch das artgleiche Komplement erreichen, und das dieser Forderung gerecht werdende, zugleich methodisch sehr wichtige Verfahren ist:

ad 2) Das Verfahren der Trennung von Ambozeptor und Komplement. Wenn es gelingt, den Ambozeptor isoliert an die roten Blutzellen zu verankern, so daß das Komplement gleichzeitig in Lösung bleibt, so ist die Forderung einer direkten Trennung von Ambozeptor und Komplement erfüllt und damit die komplexe Konstitution auf direktestem Wege nachgewiesen. Bei höherer Temperatur, bei der gewöhnlich hämolytische Versuche angestellt werden, erfolgt die Hämolyse ziemlich rasch, woraus man schließen muß, daß Ambozeptor und Komplement gebunden werden. Schränkt man die Zeit der Einwirkung auf ein Minimum ein, indem man die Flüssigkeit von den Blutkörperchen vor Beginn der Hämolyse trennt, so kann man, wie dies EHRLICH und MORGENROTH getan haben, nachweisen, daß zwar der Ambozeptor bereits fast vollständig absorbiert, aber auch ein Teil des Komplements an die Blutzellen gebunden ist. Wenn also auch unter diesen Bedingungen Ambozeptor und Komplement durchaus nicht in äquivalenten Verhältnissen der Flüssigkeit entrissen werden und man schon daraus auf das Vorhandensein zweier Stoffe schließen darf, so ist die Differenzierung doch nur in sehr beschränktem Maße möglich. Um zu einer möglichst quantitativen Trennung von Amboceptor und Komplement zu gelangen, muß man sich der Kältetrennungsmethode bedienen.

EHRLICH und MORGENROTH hatten bereits bei der Analyse von hämolytischen Immunseris die wichtige Feststellung gemacht, daß die Hämolyse durch Blutserum in der Kälte, bei 0°, ausbleibt. Zentrifugiert man aber nach einer gewissen Zeit die ungelöst gebliebenen Blutkörperchen von der Flüssigkeit ab und entfernt die letztere, so bleiben die Blutkörperchen, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, auch bei höherer Temperatur ungelöst, fallen aber der Hämolyse anheim, wenn etwas Komplement in Form von frischem normalen Serum zugefügt wird. Der Amboceptor ist also gebunden worden. Umgekehrt kann man in der durch Centrifugieren getrennten Flüssigkeit, dem Abguß, das Komplement nachweisen, indem der Abguß zugefügte native Blutzellen nicht

*) Die geringere hämolytische Wirkung das fötalen Serums ist von zahlreichen Autoren beobachtet worden. Ich nenne von ihnen RESINELLI, HALBAN, SCHUMACHER, LANGER, MARSHALL, POLANO und verweise auf das diesbezügliche Sammelreferat von HEYMANN.

löst, aber durch Zusatz von inaktiviertem Immunserum (Ambozeptor) hämolytische Wirkungen annimmt. Es folgt daraus, daß der Ambozeptor eine hohe Avidität zu den roten Blutkörperchen besitzt, die eine Reaktion bereits in der Kälte erlaubt, während das Komplement bei niedriger Temperatur weder mit dem isolierten, noch mit dem an die Blutzellen verankerten Ambozeptor reagiert. Man gelangt also durch das Digerieren von roten Blutkörperchen mit aktivem Serum bei 0° dazu, den Ambozeptor an die Zellen zu binden, das Komplement frei in Lösung zu erhalten*). Sollte also von dem zu untersuchenden Hämolysin festgestellt werden, ob es komplexer Konstitution ist, so kann der Beweis als erbracht angesehen werden, wenn die ursprünglich vorhandene hämolytische Fähigkeit weder im Abguß nachzuweisen ist, noch die abzentrifugierten Blutkörperchen sich in der Wärme lösen. Bei den normalen Hämolysinen, für welche die Kältetrennungsmethode ebenfalls von Ehrlich und Morgenroth zuerst angewandt wurde, sind nun die Grenzen der Anwendbarkeit des Verfahrens insofern eng gezogen, als die Avidität der Ambozeptoren zur Zelle im Gegensatz zu dem stets sehr aviden Verhalten der immunisatorisch erzeugten Ambozeptoren mehr oder weniger variiert. Von den Begründern des Verfahrens sind bereits die Bedingungen, unter denen eine Abtrennung des Ambozeptors in der Kälte erfolgen kann, definiert worden. Voraussetzung ist natürlich, daß die Avidität des Amboceptors zur Zelle diejenige zum Komplement erheblich überwiegt. Unter solchen Verhältnissen wird die Kältetrennung am günstigsten gelingen. Tatsächlich kommt aber auch das entgegengesetzte Extrem vor, daß nämlich die Avidität zum Komplement gleich stark oder stärker ist als diejenige zur Zelle. Dann werden entweder Ambozeptor und Komplement auch in der Kälte von der Zelle verankert werden, oder eine Verankerung wird überhaupt ausbleiben. Der erste Fall tritt dann ein, wenn die Avidität stark genug ist, um auch in der Kälte zu wirken. Tatsächlich braucht das durchaus nicht der Fall zu sein. Es ist ja schon erwähnt worden, daß Ehrlich und Sachs einen normalen Ambozeptor analysiert haben, der selbst bei höherer Temperatur von den roten Blutzellen erst dann gebunden wird, wenn er sich mit dem Komplement vereinigt hat, und Sachs hat weiterhin gezeigt, daß dieses Verhalten in mehr oder minder ausgesprochenem Maße bei den normalen Hämolysinen durchaus nicht selten anzutreffen ist. Wenn aber unter solchen Bedingungen die Avidität zwischen Ambozeptor und Komplement bei niedriger Temperatur aufgehoben oder auf ein Minimum reduziert ist, wie es die Regel darstellt, so kann natürlich bei 0° weder Ambozeptor noch Komplement von den roten Blutkörperchen gebunden werden, und das Hämolysin bleibt im Abguß zurück. Bedenkt man ferner noch, daß sowohl durch die Bindung des Ambozeptors an die Zelle die Avidität zum Komplement, als auch durch die Vereinigung des Ambozeptors mit dem Komplement die Avidität zur Zelle erhöht werden kann, so dürften die Bedingungen erschöpfend skizziert sein, welche die Anwendbarkeit der Kältetrennungsmethode umgrenzen.

Was die technischen Details anlangt, so verfährt man in geeigneter Weise derart, daß man einen Behälter mit fein zerschlagenem Eis füllt und in dieses die das Blut-Serum-Gemisch enthaltenden Zentrifugenröhrchen einfüllt. Es

---

*) Bei einem Ambzoeptorüberschuß liegen nach neueren Erfahrungen die Verhältnisse etwas anders insofern, als die Trennung auch innerhalb des Komplements zwischen Mittelstück und Endstück erfolgen kann (vergl. darüber das Kapitel „Komplemente").

kommt wesentlich darauf an, daß die Gemische vor dem Trennen der Blutzellen und der Flüssigkeit dem Einfluß einer wesentlich höheren Temperatur entzogen bleiben. Man wählt daher zweckmäßig die Mengen und die Blutkonzentration nicht zu groß, um, wenn möglich, in der Lage zu sein, die Trennung in einer guten Handzentrifuge in kürzester Zeit zu erreichen. Bei Verwendung von Zentrifugen mit Wasser- oder elektrischem Antrieb ist die Gefahr einer durch die längere Dauer der Manipulationen bedingten Erwärmung gegeben, wodurch die Versuchsbedingungen an Exaktheit einbüßen. Der Verlauf eines Versuches wäre folgender: Es werden zwei Parallelreihen von Centrifugenröhrchen mit absteigenden Mengen des hämolytischen Serums gefüllt, wobei darauf zu achten ist, daß die gerade komplett lösende Menge etwa in der Mitte enthalten ist. Durch Auffüllen mit physiologischer Kochsalzlösung wird überall gleiches Volumen (= 1 ccm) hergestellt. Die Röhrchen werden sodann in das vorbereitete Eis gesetzt, und nach einigen Minuten erfolgt der Zusatz von je 1 ccm der 5 %igen Blutaufschwemmung, die vorher auf Eis gekühlt war. Die Gemische werden nun gut durchgeschüttelt und bleiben dann in dem im Eisschranke aufzubewahrenden Eisbehälter $1^1/_2$—2—3 Stunden stehen. Sodann werden die Röhrchen zentrifugiert und die Abgüsse in folgender Weise verwandt:

I. Die Abgüsse der Reihe A werden zu nativem Blut gefügt*).

II. Mit den Abgüssen der Reihe B kann in zweifacher Art verfahren werden:

α) Sie werden mit den zurückgebliebenen Sedimenten der Reihe A digeriert. Dabei ist es notwendig, die letzteren vorerst in eisgekühlter Kochsalzlösung aufzuschwemmen und nochmals abzuzentrifugieren. Dadurch sollen die noch zurückgebliebenen Serumreste entfernt werden.

β) Die Abgüsse der Reihe B werden mit nativem Blut digeriert unter Zusatz von inaktiviertem Blutserum (Ambozeptor). Man wählt entweder eine einheitliche Menge, die etwa dem 2—3 fachen Multiplum der im aktiven Zustande komplett lösenden Dosis entspricht, oder man setzt absteigende Mengen inaktiven Serums zu, welche den ursprünglich verwandten Dosen des aktiven Serums gleich sind. Der letztere Modus hat die vollständige Intaktheit des Amboceptors im inaktivierten Serum zur Voraussetzung.

III. Die Sedimente der Reihe B werden nach nochmaligem Waschen und Zentrifugieren in eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung in physiologischer Kochsalzlösung (ca. 1,75 ccm) aufgenommen.

Die drei derart erhaltenen Versuchsreihen werden in üblicher Weise zwei Stunden lang bei 37° gehalten. Es ergibt sich dann aus:

Reihe I: der Gehalt des Abgusses an wirksamem Hämolysin;

Reihe II: der Gehalt des Abgusses an freiem Komplement durch Vergleich mit Reihe I;

Reihe III: die etwa erfolgte Bindung von Hämolysin. Es bestehen nun im Versuchsergebnis drei Möglichkeiten:

a) Die hämolytische Wirkung ist in Reihe II eingetreten, fehlt aber in Reihe I; dann ist die Trennung als quantitativ gelungen zu betrachten; im Falle II*α* ist noch Bedingung, daß in Reihe III die Hämolyse ausgeblieben ist.

---

*) Da durch Zusatz von 1 ccm 5 %ige Blutaufschwemmung ein oft unerwünscht großes Volumen resultieren würde, empfiehlt es sich in solchen Fällen nur das durch Zentrifugieren von der Zwischenflüssigkeit befreite Blutsediment oder eine entsprechend geringere Menge (0,25 ccm) einer stärkeren Blutaufschwemmung (20 %) zu verwenden.

b) Die hämolytische Wirkung in Reihe I stimmt mit derjenigen in Reihe II überein, in Reihe III ist keine Hämolyse eingetreten: Die Trennung ist ausgeblieben, Ambozeptor und Komplement befinden sich im Abguß.

c) Hämolyse ist in Reihe I und II wahrzunehmen, in Reihe II aber deutlich stärker als in Reihe I; dann ist die Trennung nur partiell erfolgt, der Nachweis der komplexen Konstitution immerhin als gelungen zu betrachten.

In den meisten Fällen entspricht die Möglichkeit c) den tatsächlichen Verhältnissen, d. h. die Avidität des normalen Ambozeptors zur Zelle ist größer als diejenige zum Komplement, übertrifft aber letztere nur in geringem Maße, so daß bei 0° nur ein Teil des Ambozeptors gebunden wird. Der Fall a scheint relativ selten einzutreten; er ist der Ausdruck dafür, daß der Ambozeptor bei 0° vollständig verankert wird, das Komplement aber frei in Lösung bleibt. In eklatanter Weise hat dieses Extrem Sachs bei dem auf Hammelblut wirkenden Hämolysin des normalen Kaninchenserums beobachtet. Indes kommt auch der Fall b nicht selten vor, d. h. es wird der normale Amboceptor bei 0° gar nicht gebunden. Da, wie schon erwähnt, manche normale Ambozeptoren selbst bei 37° nicht mit der Zelle reagieren, wenn sie sich nicht zuvor mit dem Komplement verbunden haben, so kann es nicht wundernehmen, daß auch bei 0° in solchen Fällen eine Abtrennung des Ambozeptors aus dem aktiven Hämolysin nicht zu erreichen ist, da eben in der Kälte die Vereinigung des Ambozeptors mit dem Komplement ausbleibt. Man kann aber überhaupt für sehr viele Ambozeptoren der normalen Sera annehmen, daß sie, wenn auch bei höherer Temperatur mehr oder weniger reaktionsfähig, so doch eine zu geringe Avidität haben, um auch bei 0° von den Blutzellen gebunden zu werden (vergl. Sachs). Durch solche Bedingungen sind der Kältetrennungsmethode natürliche Schranken gesetzt, ohne daß ihr Mißlingen zu irgend welchen Schlüssen berechtigt. Es sei noch hinzugefügt, daß die Trennung natürlich nur dann positiv ausfallen kann, wenn die den Blutzellen gegenübergestellte Amboceptormenge nicht zu groß ist. Die Bindungskapazität der roten Blutkörperchen für Ambozeptoren ist ja eine mehr oder weniger beschränkte. Es muß zwar die zur kompletten Hämolyse notwendige Amboceptorenmenge gebunden werden können, aber eine überschüssige Bindung ist a priori nicht zu erwarten und findet tatsächlich, wie noch besonders erwähnt werden wird, in sehr variabler Weise statt. Ein Hinweis darauf erscheint nicht überflüssig. Es ergeben sich daraus zwei wichtige Konsequenzen für die Methodik, die bei der Deutung der Versuchsresultate zu berücksichtigen sind.

Einmal kann nämlich auch unter den sonst günstigsten Bedingungen nur gefordert werden, daß die Trennung höchstens bei derjenigen Serummenge, welche die grade komplett lösende Dosis darstellt, stattfindet, aber nicht mehr bei einem Überschuß. Dann aber kann auch trotz gelungener Abspaltung des Ambozeptors eine ersichtliche Trennung ausbleiben, dann nämlich, wenn die im aktiven Serum vorhandene Ambozeptormenge größer ist, als es der durch den Komplementgehalt gegebenen Äquivalenz entspricht. Es kann unter diesen Umständen zwar eine Ambozeptorbindung in maximaler Weise erfolgen, es bleibt aber noch immer genügend Amboceptor zurück, um das Komplement zu voller Wirksamkeit zu bringen. In diesem Falle kann man dadurch Abhilfe schaffen, daß man entweder eine größere Blutmenge zur Absorption wählt, was durch das erschwerte

Zentrifugieren nicht immer erwünscht ist, oder die Absorption mehrmals wiederholt, indem man die nach dem Digerieren in der Kälte erhaltenen Abgüsse wieder mit dem Sediment von frischem Blut bei 0° zusammenbringt und den Vorgang nach Bedarf wiederholt. Führt auch dies nicht zum Ziel, so kann man annehmen, daß die Kältetrennungsmethode für den vorliegenden Fall ungeeignet ist, wohl wegen einer zu geringen Avidität des Ambozeptors zur Zelle.

Bei manchen normalen Hämolysinen ist die Reaktionsfähigkeit des Amboceptors zwar zu gering, um eine Bindung in der Kälte zu bewirken, erlaubt aber noch die Verankerung des Amboceptors bei höherer Temperatur. Dann ist die direkte Trennung von Ambozeptor und Komplement noch angängig, wenn es gelingt, die Reaktion zwischen Ambozeptor und Komplement durch bestimmte Bedingungen auszuschalten, die später wieder aufgehoben werden können. Das ist in der Tat möglich. Als ein wichtiges Mittel, welches ebenso wie die Kälte auf die zwischen Ambozeptor und Komplement stattfindende Reaktion „antireaktiv" wirkt, kommt an erster Stelle eine erhöhte Salzkonzentration in Betracht. Wie die Untersuchungen von Nolf, Markl, Ehrlich und Sachs und anderen gezeigt haben, wird die Hämolyse durch Salze gehemmt, und bei Verwendung geeigneter Salze und einer entsprechenden Konzentration gelingt es, die Verhältnisse so zu gestalten, daß der Ambozeptor gebunden wird, das Komplement aber in Lösung bleibt. Sachs hat die Nutzanwendung für die Trennung von Ambozeptor und Komplement und deren Nachweis nach der Isolierung gezogen. Man verfährt in der Weise, daß man Blut und aktives Serum bei 37° (etwa 1—2 Stunden lang) unter erhöhter Salzkonzentration und in geringem Volumen digeriert. Nach dem Zentrifugieren setzt man den Abgüssen soviel destilliertes Wasser hinzu, daß die physiologische Salzkonzentration erreicht wird, und läßt sie einerseits auf natives Blut, andererseits auf natives Blut unter Zusatz einer geeigneten Menge inaktiven Serums (Amboceptor) einwirken. War die in der Kälte ausgebliebene oder nur unvollständig erfolgte Trennung dadurch bedingt, daß die niedrige Temperatur die Reaktion zwischen Ambozeptor und Komplement hemmte, so ist berechtigte Aussicht vorhanden, daß der erörterte Weg zum Ziele führt. Erfolgt allerdings die Bindung des Amboceptors an die Zelle auch bei 37° erst nach der Verankerung des Komplements, so muß auch diese Modifikation der Versuchstechnik versagen. Durch einen Vorversuch ist erst festzustellen, welche Salzkonzentration (man wählt Kochsalz, oder auch Ammonsulfat) zur vollständigen Aufhebung der Hämolyse erforderlich ist. Es empfiehlt sich einen kleinen Überschuß zu nehmen, und das Salz in Form einer stark konzentrierten Lösung zuzusetzen. Das Gesamtvolumen (Blut ist in 20%iger Aufschwemmung zu verwenden) muß so limitiert werden, daß die durch den nachherigen Wasserzusatz erforderlich werdende Verdünnung gebührende Berücksichtigung findet.

Als eine weitere Modifikation ist das durch v. Dungern und Coca geübte Baryumchlorid-Verfahren anzusehen. Durch einen Zusatz dieses Salzes wird die Bindung des Komplementes gehemmt, der Ambozeptor wird aber verankert. Nach dem Centrifugieren wird das im Abguß enthaltene Baryumchlorid durch Zusatz von Natriumoxalat entfernt und dadurch das Komplement wieder nachweisbar.

ad 3. Die Verstärkungsmethoden: Der Nachweis der Ambozeptoren durch das Komplement des gleichen Serums kann durch die natürlichen Verhältnisse auch dann ermöglicht sein, wenn Ambozeptor und Komplement in nicht äquivalenten Mengenverhältnissen im Serum vorhanden sind. Ein Überschuß von Ambozeptor kommt in dieser Hinsicht allerdings nicht in Betracht. Wir können ja den Ambozeptor jederzeit durch das Inaktivieren in isolierter Form gewinnen. Die Schwierigkeit ist gerade in der Gewinnung reinen Komplements gegeben, und diese ist nach den gegebenen Ausführungen durch den Umstand eines Ambozeptorüberschusses noch vermehrt. Allerdings sind die schon erwähnten Fälle, in denen es gelingt, durch Verwendung fötalen Serums eine Komplementquelle zu erhalten, eigentlich auch hierher zu rechnen. In ihr Recht tritt aber die Verstärkungsmethode dann, wenn ein Überschuß von Komplement im Serum besteht. Denn dann wird es gelingen, eine minimale Serummenge zu bestimmen, die nicht mehr genügend Ambozeptor enthält, um an und für sich hämolytisch zu wirken, aber noch genügend Komplement, um den durch Inaktivieren unwirksam gemachten Ambozeptor wieder zu aktivieren. P. Th. Müller, der zuerst diesen Weg einschlug, suchte sich die notwendigen günstigen Bedingungen dadurch zu schaffen, daß er eine Komplementvermehrung experimentell anstrebte. Er erreichte dieses Ziel dadurch, daß er den Versuchstieren (Hühnern) Bouillon, Peptonwasser oder Aleuronatbrei intraperitoneal injizierte. Von dem Serum solcher Hühner konnte im Gegensatz zu dem Verhalten des normalen Hühnerserums eine Dosis bestimmt werden, welche Kaninchenblut nicht löste, aber im Verein mit inaktiviertem Hühnerserum vollständige Hämolyse bewirkte. Wie Sachs gezeigt hat, sind die relativen Mengen von Ambozeptor und Komplement in manchen Fällen bereits von vornherein so günstig, daß der von Müller eingeschlagene Weg ohne weiteres gangbar ist. So gelingt es bei den Hämolysinen des Hundeserums meist auf diesem Wege zum Nachweis der komplexen Konstitution zu gelangen. Man geht dabei entweder in der Weise vor, daß man zunächst die maximale Menge aktiven Serums bestimmt, welche der hämolytischen Wirkung entbehrt und diese dann im Verein mit absteigenden Mengen des inaktivierten Serums auf die Blutkörperchen einwirken läßt, oder man setzt zwei Reihen mit absteigenden Mengen des aktiven Serums an und fügt der einen einen nicht zu geringen Zusatz des gleichen inaktiviertem Serums zu. Ist die Hämolyse in der letzteren Reihe deutlich verstärkt, so darf man schließen, daß es sich um das Zusammenwirken von zwei Komponenten bei der Hämolyse handelt. Auch Lefmann leistete die Verstärkungsmethode zur vergleichenden quantitativen Bestimmung der Ambozeptoren im Hundeserum gute Dienste.

Wenn wir nun den Abschnitt über die komplexe Konstitution der Hämolysine zusammenfassen, so sehen wir, daß zwar eine Reihe von Methoden zum Nachweis der beiden Komponenten zur Verfügung stehen, daß aber alle bestimmte Grenzen haben, die durch ihre Art gegeben sind. Ist es also sicherlich erforderlich, beim Versagen eines Verfahrens die anderen Wege zu versuchen, so berechtigt auch ein bei Heranziehung aller technischen Hilfsmittel erhaltenes negatives Resultat noch nicht, auf ein einheitliches Hämolysin zu schließen. Immerhin ist bei allen Hämolysinen des Blutserums die bisher in dieser Hinsicht untersucht wurden, der Nachweis der komplexen Konstitution auf die eine oder andere Weise gelungen. Nur das Aalserum stellt noch eine Ausnahme dar, die vielleicht durch

besondere Verhältnisse bedingt sein dürfte*). Im übrigen ist aber von allen Seiten (London, E. Neisser und Döring, Meltzer und viele andere) die Mitwirkung von Ambozeptoren bei der durch Blutserum bedingten Hämolyse nachgewiesen worden, von Moreschi auch für die Isohämolysine des menschlichen Blutserums, von Flexner und Noguchi für das Serum von Kaltblütern und Schlangen, von Strauss und Wolff, Marshall auch für die Hämolysine der Transsudate und Exsudate; und so darf man heute die von Ehrlich und Morgenroth zuerst auf die normalen Hämolysine ausgedehnte komplexe Konstitution mit gutem Recht, zum mindesten bei den höheren Tieren, für eine allgemeine die hämolytischen Wirkungen der Blutsera treffende Gesetzmäßigkeit erachten.

Kurz streifen müssen wir an dieser Stelle auch die Beziehungen der Agglutinine, die ja auch bei der Immunisierung mit Blut entstehen und sich zahlreich im normalen Blutserum vorfinden, zu den Hämolysinen und die Frage nach ihrer Konstitution. Die Agglutinine vertragen in der Regel ein Erhitzen auf 55—60° und werden erst bei höherer Temperatur (etwa 70°) inaktiviert. Daraus folgt ohne weiteres, daß sie mit den Hämolysinen nicht identisch sein können. Die Frage muß also dahin lauten, ob Ambozeptor und Agglutinin identisch sind oder nicht. Diese Frage muß aber noch näher präzisiert werden. Der Ambozeptor ist charakterisiert durch seine Fähigkeit, die Komplementwirkung zu vermitteln, das Agglutinin durch seine charakteristische Funktion. Man könnte sich nun gut vorstellen, daß beide Wirkungen an einen gemeinschaftlichen Stumpf gebunden sind, indem der Ambozeptor außer den komplementophilen Gruppen noch eine agglutinophore Gruppe besitzt, eine Auffassung, die von Wassermann ausführlich diskutiert worden ist. Da nun die agglutinophore Gruppe unschwer Modifikationen erleidet (siehe die Untersuchungen von Eisenberg und Volk, sowie von Wassermann über die Bakterienagglutinine), so könnte der zuerst agglutinierende Ambozeptor diese Wirkung leicht einbüßen und dabei seine Amboceptorfunktion bewahren. Es sind daher Beobachtungen, welche zeigen, daß agglutinierende und hämolytische (cytotoxische) Wirkungen nicht parallel verlaufen, noch nicht geeignet, auf eine Verschiedenheit von Ambozeptor und Agglutinin schließen zu lassen; sie brauchen nur für eine Differenz von agglutinophorer und komplementophiler Gruppe zu sprechen. Die Analyse muß daher besonders die cytophile Gruppe im Auge behalten; erst die Differenzierung der cytophilen Gruppen von Ambozeptor und Agglutinin spricht eindeutig für die Verschiedenheit der beiden Stoffe. Man kann dieses Problem in verschiedener Weise in Angriff nehmen, einmal dadurch, daß man Blutkörperchen durch physikalische oder chemische Eingriffe derart alteriert, daß sie nur Ambozeptoren oder nur Agglutinine bilden. Die in dieser Richtung vorgenommenen und im Sinne einer Differenzierung sprechenden Versuche sind bereits bei der Besprechung der „Antigene tierischen Ursprungs“ (S. 281 des I. Teils dieses Handbuchs) erwähnt worden. Der zweite Weg, der hierfür in Betracht kommt, ist die Trennung von Ambozeptor und Agglutinin durch Bindungsversuche. Dieses Verfahren ist aber nur in ganz bestimmten günstigen Fällen angängig. Wir wissen durch die Untersuchungen Landsteiners,

---

*) Allerdings sprechen neuere Beobachtungen von Friedberger und Seelig auch für das Vorhandensein von echten Hämotoxinen im Froschserum. Näher eingegangen konnte darauf erst an späterer Stelle werden (s. Komplemente). Allerdings sei auch hier darauf hingewiesen, daß in einer früheren Arbeit Lazar zu dem Schluß gelangt ist, daß auch die Hämolysine des Froschserums komplexer Natur sind.

daß die Agglutinine besonders stark bei niedriger Temperatur (0°) von den roten Blutkörperchen gebunden werden. Wenn es also gelingt, die Ambozeptoren unter diesen Verhältnissen in Lösung zu behalten, so ist der Beweis für die Differenz als geführt zu betrachten. Dieses Postulat zu erfüllen, ist bei den Immunseris von vornherein ausgeschlossen, da die Immunambozeptoren regelmäßig bei 0° von den empfindlichen Blutzellen verankert werden. Dagegen besitzen, wie schon erwähnt, eine Reihe von Ambozeptoren der normalen Sera die Eigentümlichkeit, daß sie bei 0° wenig oder gar nicht, und selbst bei höherer Temperatur nur mangelhaft gebunden werden. SACHS benutzte daher das Rinderserum, dessen Ambozeptoren von den empfindlichen Blutzellen (Kaninchenblut) nicht gebunden werden, das aber gleichzeitig eine starke agglutinierende Wirkung auf Kaninchenblut besitzt, zu Untersuchungen nach dieser Richtung. Man digeriert also das inaktivierte Serum mit einem reichlichen Überschuß von Blutzellen längere Zeit ($2^1/_2$ Stunden) bei 0° und vergleicht die Wirkung des nach dem Zentrifugieren erhaltenen Abgusses mit derjenigen des nativen Serums in bezug auf Agglutination und Hämolyse, im letzteren Falle unter Zusatz eines geeigneten Komplements (in dem erwähnten Versuch: fötales Rinderserum*).

Auch KLEIN ist beim normalen Rinderserum durch analoges Vorgehen die Trennung von auf Meerschweinchenblut wirkenden Amboceptoren und Agglutininen gelungen. Die Versuche von KLEIN sind methodisch auch in anderer Hinsicht interessant. Dieser Autor suchte nämlich die Frage, ob die Agglutination eine notwendige Vorstufe der Hämolyse darstellt, wie dies von VON BAUMGARTEN angenommen wird, dadurch zu entscheiden, daß er die Agglutinine sowohl aus dem den Ambozeptor enthaltenden, als auch aus dem komplettierenden Serum entfernte. Während es, wie schon erwähnt, gelang, den Ambozeptor rein zu erhalten, wurde in dem KLEINschen Falle aus dem komplettierenden Serum gleichzeitig mit dem Agglutinin auch das Komplement entfernt**). Wenn daher auch in diesem Falle das von KLEIN geübte Verfahren versagte, so könnte es doch bei einer anderen Kombination zum Ziele führen.

Was die Konstitution der Agglutinine anlangt, so werden sie wohl meist als einheitliche Substanzen mit einer haptophoren und einer agglutinophoren Gruppe aufgefaßt. Auf die näheren Details soll hier nicht eingegangen werden, da es sich meistens um Untersuchungen, welche die Bakterienagglutinine be-

*) Die Deutung dieses Versuchsergebnisses im Sinne einer Trennung von Agglutinin und Amboceptor ist nicht unwidersprochen geblieben. V. BAUMGARTEN hat die Versuche nachgeprüft, und wenn er auch bei makroskopischer Beobachtung den Eindruck hatte, daß das Agglutinin vollständig verschwunden sei, so konnte er doch bei mikroskopischer Untersuchung noch agglutinierende Wirkung wahrnehmen. Er ist auch der Meinung, daß die lytische Wirkung durch das Digerieren mit den Blutzellen eine geringgradige Einbuße erleidet. Immerhin mußte er auch in seinen Versuchen einen Überschuß von hämolytischer Wirkung über die agglutinierende im Abguß konstatieren, wofür er aber die größere Empfindlichkeit der hämolytischen Reaktion verantwortlich macht. Es ergibt sich natürlich für derartige Untersuchungen die Forderung, die quantitativen Verhältnisse genau zu berücksichtigen. Wenn man aber bei mehr oder weniger vollständigem Erhaltensein der hämolytischen Wirkung (ein geringgradiger Verlust kann durch die vorzunehmenden Manipulationen bedingt sein) einen totalen Verlust der — wenn auch nur makroskopisch sichtbaren — agglutinierenden Wirkung konstatiert und beide Funktionen im nativen Serum etwa im gleichen Grade wahrzunehmen waren, so ist man wohl berechtigt, auf eine Trennung von Ambozeptor und Agglutinin schließen zu dürfen, und ich glaube, daß die Bedingungen in meinen Versuchen derart lagen.

**) Dafür ist von BROWNING ein gleichzeitig vorhandener Ambozeptor verantwortlich gemacht worden.

treffen, handelt. Verwiesen sei auf die schon von BAIL gehegte, aber wenig akzeptierte Vorstellung, nach der auch die Agglutinine komplexer Konstitution sind und durch das Zusammenwirken des thermostabilen „Hemiagglutinins“ und des thermolabilen ,,Agglutinophors“ wirken. v. BAUMGARTEN ist zu der Auffassung gelangt, daß die Hämagglutinine thermolabil sind und im inaktiven Zustand durch nicht agglutinierendes Serum aktiviert werden. Er ist auf Grund mikroskopischer Beobachtungen der Ansicht, daß das durch Erhitzen auf 55 ⁰ inaktivierte Serum nicht mehr typisch agglutiniert, sondern nur eine „Agglomeration“ bedingt, die erst nach Zusatz eines geeigneten aktiven Serums zur wahren Agglutination wird. Man mag bezüglich einer verallgemeinernden Auffassung der Agglutinine als komplexer Stoffe Bedenken tragen, jedenfalls haben neuere Untersuchungen gezeigt, daß es eine Hämagglutination, die erst durch die kombinierte Wirkung zweier an und für sich nicht agglutinierender Sera bedingt wird, gibt. Es seien in dieser Hinsicht die Befunde von MUIR und BROWNING erwähnt, welche zeigen, daß Rinderblutzellen weder durch inaktives, vom Kaninchen gewonnenes Immunserum, noch durch aktives Rinderserum nennenswert agglutiniert werden, daß dagegen beide Sera vereint eine außerordentlich starke Agglutination hervorrufen, ohne dabei hämolytisch zu wirken. Die aktive Substanz des Rinderserums verhielt sich dabei wie ein echtes Komplement, indem sie beim Erhitzen auf 55 ⁰ ihre Funktion einbüßte. — LÜDKE hat neuerdings normale und immunisatorisch erzeugte Hämagglutinine vergleichend untersucht und bei Normalagglutininen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber thermischen Einflüssen beobachtet. Zu dem gleichen Resultat gelangten LANDSTEINER und REICH.

D. Ambozeptoren.

Wie schon mehrfach erwähnt, sind die Ambozeptoren die bei der Immunisierung mit Zellen im Blutserum neu auftretenden Bestandteile. Für die Definition des Ambozeptors kann aber die Wirkung auf die Zelle, die ja überdies erst durch die Funktion des Komplements herbeigeführt wird, nicht maßgebend sein. Denn, wie später noch ausführlich zu erörtern sein wird, gibt es auch Ambozeptoren, welche auf gelöste Eiweißstoffe wirken, und bei denen daher von der direkten Wahrnehmung einer Wirkung auf das empfindliche Substrat überhaupt abgesehen werden muß. Ebensowenig kann man heute die früher im Gegensatz zu dem Verhalten des Komplements hervorgehobene Thermostabilität des Ambozeptors als Kriterium für die Ambozeptornatur gelten lassen. Denn es ist bereits erwähnt worden, daß es Ambozeptoren gibt, die durch eine relativ große Thermolabilität ausgezeichnet sind, und andererseits Komplemente, welche eine recht hohe Resistenz thermischen Einflüssen gegenüber aufweisen. Wenn man nach den bisherigen Erfahrungen auch sagen kann, daß der Ambozeptor thermostabiler ist als das ihn aktivierende Komplement, so erscheint es durchaus nicht ausgeschlossen, daß gelegentlich das entgegengesetzte Verhalten beobachtet wird Wir kennen aber eine Eigenschaft, welche allen Ambozeptoren zukommt, und welche daher für die Definition des Ambzoeptors nach dem gegenwärtigem Stande unserer Kenntnisse bestimmend sein muß. Es handelt sich dabei zwar um die Wirkung des Ambozeptors, aber nicht um diejenige auf das empfindliche Substrat, sondern um eine allgemeinere, nämlich diejenige auf das Komplement. Man kann hierbei von theoretischen Fragen, ob der Ambozeptor in direkten Beziehungen zum Komplement steht oder

nicht, vollständig abstrahieren, jedenfalls kann man sich dahin ausdrücken, daß unter Ambozeptoren solche normale oder immunisatorisch gebildete Antikörper des Blutserums zu verstehen sind, welchen die Funktion zukommt, die Wirkung der Komplemente auf das zugehörige Antigen zu vermitteln, resp. durch ihre Verbindung mit dem zugehörigen Antigen (Rezeptor) die Komplemente zu absorbieren, die Komplementwirkung aufzuheben. Damit ist eine dem heute vorliegenden Tatsachenmaterial gerecht werdende Definition gegeben. Es ist damit nicht gesagt, daß nicht auch Ambozeptoren bereits an und für sich Komplemente binden können, und wir werden noch sehen, daß dies für normale Ambozeptoren in der Tat vielfach zutrifft. Aber wir können aus der komplementbindenden Fähigkeit eines Serums allein noch nicht auf die Gegenwart eines Ambozeptors schließen. Es kann sich hierbei auch um Einflüsse chemischer Art oder um Antikomplemente oder endlich auch um einen Komplex von Rezeptor und Ambozeptor handeln. Wenn wir also von einem Serum wissen, daß es Komplement bindet, so müssen wir zum Nachweise des Ambozeptors noch verlangen, daß es andererseits die Wirkung dieses Komplements auf das empfindliche Substrat vermittelt, und für diejenigen Ambozeptoren, welche auf Zellen wirken, die auf die Cytotoxinwirkung mit sinnlich wahrnehmbaren Reaktionen antworten, so auch für alle hämolytischen Ambozeptoren, ist diese Frage ja ohne weiteres zu entscheiden. Aus der gegebenen Definition geht zur Genüge hervor, daß der Nachweis des Ambozeptors stets nur indirekt vermittelst des Komplements geführt werden kann, sei es, daß der Ambozeptor die sinnlich wahrnehmbare Wirkung des Komplements auf das empfindliche Substrat (Hämolyse, Bakteriolyse, Stillstand der Eigenbewegung gewisser Zellarten) vermittelt, resp. sie erst ermöglicht, sei es, daß er in Gemeinschaft mit dem zugehörigen Antigen diese Wirkung aufhebt. Für das Studium der Ambozeptoren ist also die Kenntnis der Komplemente notwendig; da aber ebenso das Komplement nur mittels des Ambozeptors erkannt und analysiert werden kann, so ist es für die Darstellung gleichgültig, mit welcher der beiden Komponenten die Besprechung begonnen wird.

1. Bestimmung der Ambozeptoren.

Wenn man mit Ambozeptoren arbeitet, so empfiehlt es sich im Interesse reiner Versuchsbedingungen stets mit Serum zu arbeiten, in dem die Komplemente unwirksam gemacht sind. Dies geschieht in einfachster Weise durch das Inaktivieren der Sera, d. h. durch thermischen Einfluß. Da aber bei diesem Vorgehen einerseits Modifikationen der Komplemente, Komplementoide, zurückbleiben, welche zwar die hämolytische Funktion vollständig eingebüßt haben, aber durch hemmende Wirkung störend interferieren können, andererseits durch das Erhitzen in gewissen Fällen Ambozeptoren geschädigt werden, so muß man sich daran erinnern, daß es noch eine Reihe anderer, allerdings nicht so einfacher Wege gibt, um die Komplemente zu vernichten oder zu absorbieren. Diese Methoden, welche bei den Komplementen besprochen werden, sind heranzuziehen, wenn gelegentlich das einfache Inaktivieren der Sera nicht zu befriedigenden oder einwandsfreien Ergebnissen führen sollte. In den meisten Fällen wird aber das Inaktivieren der Sera durch Erhitzen ausreichen. Allerdings kann man nicht schematisch eine einheitliche Inaktivierungstemperatur angeben, die immer anzuwenden wäre. Wenn auch für die hämolytischen Immunsera das $^1/_2$stündige Erhitzen

auf 55° in der Regel zum Ziele führt, indem die Immunamboceptoren einem solchen Eingriff widerstehen*), so liegt für die normalen Ambozeptoren, wie schon mehrfahch erwähnt werden mußte, die geeignete Inaktivierungstemperatur in den meisten Fällen erheblich niedriger**).

Die normalen Ambozeptoren sind eben sehr oft durch eine gewisse Labilität ausgezeichnet, die ein Erhitzen auf 55° nicht gestattet. Es sei daher wiederholt darauf hingewiesen, daß es durchaus ratsam ist, bei dem Studium von Ambozeptorfunktionen normaler Sera zunächst die minimale Temperatur festzustellen, welche bei $^1/_2$ stündiger Einwirkung das Serum bereits inaktiviert, d. h. die ihm eigene hämolytische Wirkung beseitigt. So liegt nach Sachs die Inaktivierungstemperatur für das auf Meerschweinchenblut wirkende Hämolysin des Hundeserums bei 50°, und Einwirkung höherer Temperaturen bedeutet bereits eine Schädigung dieses Ambozeptors. Von weiteren bekannten thermolabilen Amboceptoren der normalen Sera seien genannt: der auf Meerschweinchenblut wirkende Ambozeptor des Hammelserums (Sachs), Inaktivierungstemperatur***) 50°; die auf Kaninchen- und Meerschweinchenblut wirkenden Ziegenambozeptoren, der im Pferdeserum enthaltene Ambozeptor für Meerschweinchenblut (Morgenroth); der auf Kaninchenblut wirkende Ambozeptor des Menschenserums (E. Neisser und Friedemann), Inaktivierungstemperatur 51°, die isolytischen Ambozeptoren des Menschenserums (Moreschi), Inaktivierungstemperatur 45°—48°, die hämolytischen Ambozeptoren des Froschserums (Lazar), Inaktivierungstemperatur 42°—45°†). Nach alledem empfiehlt es sich, prinzipiell alle normalen Sera, deren Ambozeptorfunktionen untersucht werden sollen, bei möglichst niedrigen Temperaturen zu inaktivieren. Solche sind ferner für Hunde- und Meerschweinchenserum 50°, für Rinderserum 52°, für Kaninchenserum 51°.

Um nun die Menge des in einem Serum vorhandenen Amboceptors festzustellen, muß die minimale Dosis des inaktivierten Serums ermittelt werden, welche die gegebene Blutmenge (1 ccm 5 %ige Aufschwemmung) im Verein mit Komplement grade noch komplett löst. Dabei ist zu berücksichtigen, daß:

1. die Wirkung des Ambozeptors verschieden stark sein kann, wenn die Sera verschiedener Tierarten als Komplemente fungieren (Ehrlich und Morgenroth);

2. die Wirkung des Ambozeptors verschieden stark ist, wenn verschiedene Mengen eines und desselben komplettierenden Serums verwendet werden, und mit der Komplementmenge zunimmt (v. Dungern, Gruber, Morgenroth und Sachs).

Es ergibt sich daraus, daß zu einer Angabe über die komplett lösende Dosis eines Ambozeptors gleichzeitig auch als Index die Bezeichnung des als Komplement benutzten Serums und dessen Menge gehört. Was die Wahl des Komplements betrifft, so sind die hierfür

---

*) Daß auch hierbei Ausnahmen von der Regel vorkommen können, zeigen die Beobachtungen von Michaelis und Fleischmann, nach denen die durch Injektion von Organzellen entstehenden hämolytischen Ambozeptoren eine verringerte Thermostabilität aufweisen.

**) Tiefen Temperaturen gegenüber sind die Ambozeptoren nach Lüdke sehr resistent.

***) Unter Inaktivierungstemperatur ist die niedrigste Temperatur verstanden, bei der die Hämolysine unwirksam werden.

†) Interessant ist die Angabe Lazars, daß die Ambozeptoren im gelagerten Froschserum thermostabiler sind, als im frischen.

maßgebenden Gesichtspunkte bereits im vorigen Kapitel besprochen worden, und es ist schon darauf hingewiesen worden, daß für die meisten Fälle das Meerschweinchenserum durch seinen Komplementreichtum und den ziemlich geringen Gehalt an normalen Ambozeptoren als Komplementquelle besonders geeignet ist. Nach dem Gesagten ist es zur Bestimmung der maximalen Wirkung eines Ambozeptors erforderlich, mit einem Komplementüberschuß zu arbeiten. Die Serummenge, welche einen solchen darstellt, kann man natürlich nur aus Erfahrung kennen, und sie wird dadurch etwas eingeschränkt, daß man nur solche Dosen wählen kann, welche an und für sich nicht hämolytisch wirken. Soweit die vom Kaninchen gewonnenen Immunambozeptoren für Rinder-, Hammel- oder Ziegenblut in Betracht kommen, ist bei Verwendung von Meerschweinchenserum als Komplement eine Menge von 0,1—0,05 ccm die geeignete Dosis, welche auch fast stets der hämolytischen Wirkung entbehrt. Kaninchen serum kann, wenn es sich um Rinderblut handelt, in der Menge von 0,4—0,3 ccm verwandt werden; soll Hammel- oder Ziegenblut als Antigen dienen, so muß die geeignete Dosis erst ermittelt werden, da Kaninchenserum für diese Blutarten mehr oder weniger stark hämolytisch wirkt. Es sei nochmals daran erinnert, daß man dann leicht dadurch in Verlegenheit kommen kann, daß die nicht mehr lösende Serummenge bereits zu wenig Komplement enthält, um aktivierend zu wirken. Man kann dann durch Kältetrennung versuchen, die normalen Amboceptoren zu entfernen, wenn man es nicht vorzieht, nach einer geeigneteren Komplementquelle zu fahnden.

Diejenige minimale Ambozeptormenge, welche bei optimalem Komplementzusatz eben noch zur vollständigen Hämolyse ausreicht, wird als „Ambozeptoreinheit“ bezeichnet (Morgenroth und Sachs). Natürlich gehört zur Ambozeptoreinheit die Angabe der Blutmenge und der Komplementquelle. Bei gut wirksamen hämolytischen Immunseris, welche durch Vorbehandeln von Kaninchen mit Rinderblut gewonnen sind, soll die Ambozeptoreinheit bei Einwirkung auf Rinderblut und Zusatz von 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement höchstens 0,002 bis 0,001 ccm betragen. Eine hinreichend erschöpfende Angabe für einen solchen Ambozeptor würde also lauten: „Ambozeptoreinheit (1 ccm 5%iges Rinderblut, Meerschweinchenserum) = 0,0015 ccm“. — Da immerhin der Komplementgehalt der aktivierenden Sera individuell wechseln kann, so kann es unter Umständen sich empfehlen, eine Probe eines bekannten Immunserums als Standardserum aufzubewahren, wie dies Morgenroth empfiehlt. Es ist dann die notwendige Komplementmenge zuerst mittels des bekannten Immunserums zu ermitteln und mit dieser dann die Amboceptorbestimmung des neuen Serums auszuführen.

Was die Konservierung der Ambozeptoren anlangt, so besteht in dieser Hinsicht, wenn man vielleicht von einigen sehr labilen, normalen Amboceptoren absieht, keine wesentliche Schwierigkeit. Die Amboceptoren der Immunsera halten sich bei sterilem Aufbewahren im Eisschrank bei 8° äußerst lange, wobei noch zu statten kommt, daß durch das, eventuell wiederholte, Erhitzen auf 55° gleichzeitig im Sinne der Sterilität gewirkt wird. Noch sicherer geht man, wenn man die Amboceptoren im gefrorenen Zustande aufbewahrt. Auch Eintrocknungsverfahren sind anwendbar, erscheinen aber im allgemeinen als eine unnötige Komplikation.

Zum Schluß dieses Abschnittes sei noch erwähnt, daß beim negativen Ausfall der Ambozeptorbestimmung das Fehlen der Ambozeptoren unter Umständen nur ein scheinbares sein kann. Zwar ist eine

Aufhebung der Ambozeptorwirkung durch Ambozeptorüberschuß im Sinne der NEISSER-WECHSBERGschen Komplementablenkung bei hämolytischen Seris nicht einwandfrei beobachtet, aber die Ambozeptoren können doch durch gleichzeitig vorhandene antikomplementäre Wirkungen larviert sein, wie es namentlich MORGENROTH beschreibt. In diesem Falle ist methodisch in der vorherigen Bindung des Ambozeptors und Entfernung der Zwischenflüssigkeit vor dem Komplementzusatz ein leichtes und zuverlässiges Hilfsmittel gegeben.

2. Bindung des Ambozeptors an die Zelle und ihre Wirkung.

Zu den wichtigsten Grundgesetzen der Hämolysinforschung gehört die von EHRLICH und MORGENROTH festgestellte Tatsache, daß die immunisatorisch erzeugten Ambozeptoren von den roten Blutkörperchen gebunden werden. Es ist schon ausführlich erwähnt worden, von wie großer Wichtigkeit die große Energie, mit der diese Bindung erfolgt, für die Analyse der komplexen Konstitution der Hämolysine mittels der Kältetrennungsmethode ist. In der Tat werden die Immunamboceptoren, und mit ihnen eine große Reihe normaler Ambozeptoren, wie schon EHRLICH und MORGENROTH erwiesen haben, nicht nur bei höherer Temperatur, sondern auch in der Kälte (0^0) von den roten Blutkörperchen gebunden. Wie die Bindung bei 0^0 ihre besondere Bedeutung durch die Möglichkeit der isolierten Verankerung des Ambozeptors aus dem aktiven Serum besitzt, so bietet die Bindung des Ambozeptors an die Blutzellen im allgemeinen eines der wichtigsten methodischen Hilfsmittel, die wir für die Analyse der Serumhämolysine besitzen. Es ist dadurch einmal die Möglichkeit gegeben, den Ambozeptor in reinem Zustande an der Reaktion teilnehmen zu lassen, während die übrigen Bestandteile des Serums entfernt werden, und wenn in demselben Serum verschiedene Ambozeptoren gleichzeitig vorhanden sind, so ist man in der Lage, dieselben durch die Bindung der für bestimmte Blutarten spezifischen Amboceptoren zu differenzieren. Dann aber werden auch die Versuchsbedingungen durch die Bindung des Ambozeptors an die Blutzellen vor dem Komplementzusatz insofern reiner, als etwaige hemmende Stoffe des ambozeptorhaltigen Serums ausgeschaltet werden, sei es, daß diese Hemmung in einer Verhinderung der Komplementverankerung, sei es, daß sie in einer direkten Einwirkung auf das Komplement gelegen ist. Endlich ist auch der Fall denkbar, wenn auch nicht beobachtet, daß der isolierte Ambozeptor mit der Zelle reagiert, diese Reaktionsfähigkeit aber durch die Vereinigung des Ambozeptors mit dem Komplement aufgehoben wird. Es ist immerhin möglich, daß unter solchen Bedingungen durch den an die Zelle gebundenen Ambozeptor die Komplementwirkung vermittelt wird, so daß also bei der vorherigen Bindung des Ambozeptors die sonst ausbleibende Hämolyse eintritt. Schließlich ist der Bindungsversuch selbstverständlich die geeignete Methode, um über die Beziehungen zwischen Ambozeptoren und Blutzellen und ihre quantitativen Gesetze Aufschluß zu erhalten.

Die Technik des Bindungsversuches ist überaus einfach: Man mischt gleiche Blutmengen (1 ccm $5^0/_0$ige Blutaufschwemmung) mit absteigenden Mengen des inaktivierten Ambozeptorserums, deren Extreme sich von der bei der Ambozeptoreinstellung ermittelten Ambozeptoreinheit nach beiden Seiten etwa gleich weit entfernen, läßt die Mischungen $1-1^1/_2$ Stunden bei 37^0 stehen und zentrifugiert die Röhrchen sodann. Die obenstehenden Flüssigkeiten gießt man auf die der ursprünglich verwandten ent-

sprechende Menge nativen Blutes*), die erhaltenen Blutsedimente beschickt man mit physiologischer Kochsalzlösung bis zum ursprünglichen Volumen. Man erhält also zwei Reihen, zu deren Röhrchen überall die gleiche Komplementmenge gefügt wird. Dann wird in der üblichen Weise verfahren: Schütteln, 2 Stunden bei 37°, Eisschrank. Die Bindung des Ambozeptors wird dadurch augenscheinlich, daß in den vorher mit Ambozeptor digerierten und dann abzentrifugierten Blutsedimenten Hämolyse eintritt, während sie in dem die Abgüsse enthaltenden Blutgemisch ausbleibt. Natürlich kann a priori eine vollständige Verankerung des Ambozeptors nur dann erwartet werden, wenn die Menge des ambozeptorhaltigen Serums die Ambozeptoreinheit nicht überschritt. Man darf also nicht überrascht sein, wenn bei den ein Multiplum der Ambozeptoreinheit enthaltenden Versuchsröhrchen auch in der Abgußreihe Hämolyse eintritt. In vielen Fällen sind aber die Blutkörperchen imstande, weit mehr Amboceptor zu binden, als zur Hämolyse notwendig ist. Diese Tatsache bietet zugleich den Schlüssel zu dem bekannten Versuch BORDETS, daß dieselbe Serummenge stärkere Hämolyse bewirkt, wenn eine bestimmte Blutmenge auf einmal zugefügt wird, als wenn der Zusatz der gleichen Blutmenge in zeitlich getrennten Fraktionen geschieht. Bei zeitlicher Beobachtung kann jedoch, wie CERNOVODEANU und HENRI gezeigt haben, die Intensität der Hämolyse zu einer gewissen Zeit umgekehrt sein. Das erklärt sich offenbar dadurch, daß zunächst die geringere Blutmenge stärker sensibilisiert ist und daher dann, wenn ein Teil der Blutmenge erst später zugesetzt wird, die Hämolyse der ersten Fraktion früher beginnt. Später aber muß sich das Verhältnis umkehren, da das bereits an die erste Fraktion gebundene Hämolysin für die zweite Fraktion nicht mehr in dem Maße zur Verfügung steht, wie bei gleichzeitiger Verteilung des Hämolysins auf die gesamte Blutmenge. Die näheren Details sind von EHRLICH und MORGENROTH eingehend analysiert worden. Man bezeichnet zweckmäßig mit EHRLICH die Bestandteile der roten Blutkörperchen, welche die Absorption des Ambozeptors vermitteln, als „Rezeptoren". Der Ambozeptoreinheit entspricht dann die „Rezeptoreinheit" als diejenige Rezeptormenge, welche die Ambozeptoreinheit bindet. Die Bindungskapazität der roten Blutkörperchen kann nun, wie EHRLICH und MORGENROTH gezeigt haben, in den verschiedenen Kombinationen sehr variieren; während in manchen Fällen die Blutzellen grade nur die Ambozeptoreinheit aufzunehmen imstande sind, gibt es Kombinationen, in denen bis zu 100 Ambozeptoreinheiten gebunden werden. Da ferner auch bei ein und derselben Kombination individuelle Variationen in dem Bindungsvermögen der roten Blutzellen in weiten Grenzen angetroffen werden können, so bietet die Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Erythrocyten nicht geringes Interesse. Die Ausführung entspricht durchaus dem geschilderten Bindungsversuch, nur muß man die Ambozeptordosen nach oben genügend weit vergrößern. Man bestimmt dann entweder, bei welcher maximalen Ambozeptormenge der Abguß eben unwirksam, oder bei welcher im Abguß weniger als

---

*) Um die Flüssigkeitsmenge nicht über Gebühr zu vermehren, empfiehlt es sich, dazu konzentriertes Blut zu verwenden, entweder die der Blutaufschwemmung entsprechende Menge unverdünnten Blutes (serumfrei gewaschen!), bei 1 ccm 5%iger Aufschwemmung also 0,05 ccm (1 Tropfen) Blut, oder die durch Zentrifugieren erhaltenen Sedimente der Blutaufschwemmung, oder entsprechende Mengen einer geeignet konzentrierteren Aufschwemmung (z. B. anstatt 1 ccm 5%iges Blut: 0,25 ccm 20%iges Blut).

eine Ambozeptoreinheit nachzuweisen ist, d. h. die durch den Abguß vermittelte Hämolyse noch nicht komplett ist. Im letzteren Falle ergibt sich aus der Menge der involvierten Ambozeptoreinheiten durch Verminderung um eins die Anzahl der mindestens gebundenen Ambozeptoreinheiten (vgl. Ehrlich und Morgenroth).

Die erschöpfende Absättigung sämtlicher Blutkörperchenrezeptoren ist von großer Wichtigkeit, wenn es sich darum handelt, nachzuweisen, daß die den Ambozeptor bindenden Bestandteile gleichzeitig auch das die Amboceptoren bei der Immunisierung auslösende Agens darstellen. Die Identität entspricht einem wichtigen Postulat der Seitenkettentheorie, und v. Dungern hat zuerst experimentell erwiesen, daß Blutkörperchen, welche mit einer reichlichen Ambozeptormenge digeriert sind, gleichzeitig ihre antigene Funktion eingebüßt haben. Es ist selbstverständlich, daß sämtliche Rezeptoren mit Ambozeptor abgesättigt sein müssen, wenn man diesen Befund erhalten will, und es ergibt sich daraus für derartige Zwecke die Forderung, die Blutkörperchen mit dem mehrfachen Multiplum der zu ihrer Auflösung notwendigen Ambozeptordosis zu digerieren. Nach Angaben von Sachs kann man sich dadurch von der Besetzung der Receptoren überzeugen, wenn man die mit Ambozeptor digerierten Blutkörperchen vor der Injektion abzentrifugiert und in der Zwischenflüssigkeit Ambozeptor noch nachweisen kann. Das Befreien der roten Blutkörperchen von der Flüssigkeit bietet zugleich den Vorteil, daß dadurch bei der Injektion eine passive Übertragung frei gebliebener Ambozeptoren vermieden wird. Dem steht, wie v. Dungern hervorhebt, als Nachteil gegenüber, daß dann etwa bei der Auflösung der amboceptorbeladenen Zellen frei werdende Rezeptoren keinen Ambozeptor mehr vorfinden, um abgesättigt zu werden. In der Tat hat Sachs in einigen Fällen bei Immunisierungsversuchen mit ambozeptorbeladenen Blutkörperchen trotz scheinbarer Sättigung derselben (der Abguß enthielt noch Ambozeptor) eine geringgradige Bildung von Amboceptoren eintreten sehen. Die Gründe, die dafür in Anspruch genommen werden können, seien kurz als folgende charakterisiert:

1. Die schon durch v. Dungern hervorgehobene Möglichkeit des Freiwerdens von Rezeptoren bei der Lyse in vivo;

2. die bereits von Sachs diskutierte Möglichkeit einer höheren Affinität der den Ambozeptoren identischen Gewebsreceptoren, die dann imstande wären, die Verbindung „Rezeptor—Ambozeptor" zu sprengen und den Rezeptor an sich zu reißen;

3. die Möglichkeit, daß scheinbar gesättigte Blutkörperchen noch freie Rezeptortypen besitzen, welche in dem zur Vorbehandlung dienenden Immunserum keine korrespondierenden Ambozeptoren vorfinden, aber im Organismus gewisser Individuen noch durch passende Rezeptoren verankert werden (Sachs);

4. die Interferenz von Massenwirkungen, die darin ihren Ausdruck finden würde, daß die Bindungskapazität der roten Blutkörperchen mit der Ambozeptormenge steigt, so daß das Freibleiben von Ambozeptor noch nicht für die vollständige Sättigung der Blutkörperchenrezeptoren mit Ambozeptoren beweisend wäre (Eisenberg und Volk).

Die Angabe dieser Möglichkeiten dürfte genügen, um auf die sich daraus für die Methodik, Beurteilung und Deutung der Versuche ergebenden Konsequenzen hinzuweisen.

Ebenso, wie man einen Ambozeptorüberschuß verwenden muß, wenn die Absicht besteht, die Rezeptoren der Blutkörperchen vollständig mit

Ambozeptor abzusättigen, ist es umgekehrt zweckmäßig, die Menge der Blutkörperchen zu steigern, wenn man aus einem Serum die für sie spezifischen Ambozeptoren durch Verankerung an die Rezeptoren entfernen will. Zum Nachweise der Tatsache, daß der Ambozeptor überhaupt gebunden wird, genügt ja das am Anfang dieses Kapitels geschilderte Vorgehen, indem verschiedene Ambozeptormengen mit der gleichen Blutkörperchendosis digeriert und Sedimente und Abgüsse in Reihenversuchen geprüft werden. Um aber aus dem Serum sämtliche Ambozeptoren oder gewisse Partialambozeptoren vollständig zu entfernen, ist es oft geraten, eine bestimmte Serummenge mit einem Überschuß von Blutkörperchen derart zu digerieren, daß etwa einer Ambozeptoreinheit das 2—4fache Multiplum der Rezeptoreinheit gegenübersteht. Man verwendet dann das Blutsediment, welches der berechneten Blutmenge entspricht, und muß, falls der Ambozeptorgehalt des Serums zu groß ist, mit geeigneten Verdünnungen des Serums arbeiten. Die Versuchsanordnung ist im übrigen die allgemein übliche, indem das Blutserumgemisch etwa eine Stunde bei 37° gehalten und sodann durch Zentrifugieren getrennt wird. Der Ambozeptorgehalt des Abgusses wird quantitativ bestimmt und mit dem der ursprünglichen Flüssigkeit verglichen. Dabei ist der durch das Zufügen des Blutes resultierende Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen. Dieses Verfahren hat auch den technischen Vorteil, daß ein vielfaches Zentrifugieren, das bei Reihenversuchen unvermeidlich ist, vermieden wird. Es ist bei der Ausfällung gewisser Ambozeptoren aus einem Serum, wie es zum Beispiel für die Demonstration der zuerst von Pfeiffer und Friedberger beim Studium bakteriolytischer Sera beobachteten, dann auch von Sachs bei hämolytischen Versuchen aufgefundenen sogenannten „antagonistischen" Stoffe erforderlich ist, die gegebene Methode. Auch kann man dadurch für solche Ambozeptoren, welche, wie eine große Reihe normaler Ambozeptoren, mit den Blutkörperchenrezeptoren nur mit geringer Avidität oder gar nicht reagieren, die Bindungsbedingungen günstiger gestalten.

Was nun die Art der Bindung des Ambozeptors an die Zelle anlangt, so kommen zur Analyse dieser Frage mehrere Methoden in Betracht. Zunächst ist die Abhängigkeit dieser Bindung von der Temperatur zu untersuchen, und wir wissen in dieser Hinsicht bereits durch die Arbeiten Ehrlichs und Morgenroths, daß in der Regel die Reaktion bereits bei 0° stattfindet. Daß die Bindungsenergie verschiedener Ambozeptoren sehr variieren und bei normalen Ambozeptoren bis zum Mangel jeglicher Affinität schwanken kann, ist schon mehrfach erwähnt worden. Im allgemeinen kann man aber auf Grund der bisherigen Erfahrungen sagen, daß Temperaturerhöhung die Bindung der hämolytischen Ambozeptoren begünstigt. Daß aber auch hier eine Regel ohne Ausnahme nicht aufzustellen ist, zeigen die interessanten Beobachtungen von Donath und Landsteiner. Diese Autoren haben den Nachweis erbracht, daß im Serum der an paroxysmaler Hämoglobinurie leidenden Patienten ein Ambozeptor vorhanden ist, der auf die eigenen Blutkörperchen wirkt, also ein Autoambozeptor. Die Eigentümlichkeit dieses hämolytischen Ambozeptors ist nun darin gelegen, daß er nur bei niedriger Temperatur (0°—10°) von den Blutzellen verankert wird, nicht bei höherer Temperatur.

Es ergibt sich aus dieser bedeutsamen Feststellung für die Methodik des Nachweises derartiger Ambozeptoren, daß man das aufgefangene Blut sofort auf niedrige Temperatur abkühlt und es sodann in den Brutschrank

bringt. Will man den Ambozeptor isoliert gewinnen, so muß man natürlich die niedrige Temperatur vermeiden und das Serum möglichst bei Körpertemperatur durch Zentrifugieren von den roten Blutkörperchen trennen oder von dem Blutkuchen abscheiden lassen. Die Eigenart der Erscheinung kommt also darin zum Ausdruck, daß das sofort in den Thermostaten gebrachte Blut der an paroxysmaler Hämoglobinurie leidenden Patienten keine Veränderungen aufweist, daß es aber der Hämolyse anheimfällt, wenn es den Umweg über eine niedrige Temperatur passiert hat. Man muß daraus schließen, daß die einmal in der Kälte stattgefundene Bindung dieses Ambozeptors auch bei höherer Temperatur nicht wieder rückgängig wird. Es erklären sich dadurch die teilweise widersprechenden Angaben früherer Autoren über die hämolytische Wirkung des Serums bei paroxysmaler Hämoglobinurie. Bezüglich des weiteren Studiums dieses Phänomens sei auf die Arbeiten von Kretz, Mattirolo und Tedeschi, Widal und Rostaine, Eason, Langstein, Donath und Landsteiner verwiesen.

Die von Widal und Rostaine vertretene Hypothese, nach welcher im normalen Serum ein Autohämolysin und eine antilytisch wirkende Substanz vorhanden sein, letztere aber bei der paroxysmalen Hämoglobinurie fehlen soll, wurde von Donath und Landsteiner als experimentell unbegründet und überflüssig zurückgewiesen. Es gelang letzteren Autoren auch, gelegentlich im normalen Kaninchenserum autolytische Ambozeptoren aufzufinden, die nur bei der Abkühlung des Blutes gebunden wurden und durch Meerschweinchenserum komplettierbar waren.

Wie schon gesagt, stellt dieses von Donath und Landsteiner beschriebene Verhalten des bei paroxysmaler Hämoglobinurie vorkommenden Autoambozeptors eine Ausnahme dar. Bei allen anderen bekannten Ambozeptoren erfolgt die Bindung an die Zelle bei höherer Temperatur ebensogut oder besser, als in der Kälte. Daß es besonders im normalen Blutserum nicht selten Ambozeptoren gibt, die überhaupt mit der Zelle sehr wenig oder gar nicht reagieren, ist schon bei der Besprechung der Kältetrennungsmethode erwähnt worden (cf. die Arbeiten von Ehrlich und Sachs, Sachs, Sachs und Bauer). In diesen Fällen wird die Reaktion mit der Zelle erst durch die zwischen Ambozeptor und Komplement erfolgte Bindung ermöglicht.

Man muß in solchen Fällen sich natürlich davon überzeugen, daß nicht etwa in dem als Komplement angesprochenen Serum der Ambozeptor vorhanden ist. Es muß daher letzteres der hämolytischen Wirksamkeit entbehren, wie es von dem anderen als Ambozeptor angesprochenen und inaktivierten Serum ohnedies der Fall ist.

Die Möglichkeit ist im Auge zu behalten, daß es sich um ein besonders thermostabiles Komplement im inaktiven Serum handelt. Man wird also untersuchen, ob die im aktiven Serum vorhandene Komponente von den roten Blutkörperchen gebunden wird, und ob die derart vorbehandelten Blutkörperchen sich im inaktiven Serum lösen. Ist letzteres der Fall, so muß man den im aktiven Serum enthaltenen Bestandteil als Ambozeptor, den Bestandteil des inaktivierten Serums dagegen als Komplement ansprechen, das in diesem Falle außergewöhnlich thermostabil wäre. Im anderen Falle kann trotzdem das wirksame Prinzip von den roten Blutkörperchen gebunden worden sein. Es handelt sich dann um die Bindung eines Komplements vermittelst eines Ambozeptors, für den dieses Komplement nicht zur hämolytischen Wirkung geeignet ist. Daß solche Fälle in der Tat vorkommen, ist durch Arbeiten von Klein und Browning bekannt.

Von BORDET und GAY ist die Auffassung vertreten worden, daß die Hämolyse dann doch eintreten kann, wenn noch ein dritter Faktor, der in dem als Ambozeptor angenommenen inaktiven Serum vorhanden ist, hinzukommt. Demgegenüber haben SACHS und BAUER gezeigt, daß in dem von BORDET und GAY herangezogenen Falle die Verhältnisse dieser Erklärung nicht zugänglich sind, und sie haben die Wege angegeben, mittels deren man die sich ergebenden Fragestellungen entscheiden kann. Es dürfte sich an späterer Stelle noch Gelegenheit finden, hierauf näher einzugehen.

Für die nähere Kenntnis der Bindungsverhältnisse kommt als methodisch wichtig die Feststellung des Absorptionsquotienten in Betracht, auf dessen Abhängigkeit von der absoluten Antikörpermenge zuerst EISENBERG und VOLK beim Studium der Bakterienagglutination aufmerksam gemacht haben. Man versteht unter Absorptionsquotienten denjenigen Bruch, welcher zum Zähler die Anzahl der gebundenen, zum Nenner die Anzahl der zum Bindungsversuch verwandten Ambozeptoreinheiten hat. Die letztere Größe ist naturgemäß bekannt, die erstere ergibt sich durch die Bestimmung der nach der Bindung im Abguß verbleibenden Ambozeptoreinheiten und Subtraktion dieser Zahl von der die ursprünglich verwandte Amboceptormenge ausdrückenden. Wie die Bestimmung des Absorptionsquotienten zu wichtigen Aufschlüssen führen kann, zeigen die Untersuchungen von P. TH. MÜLLER. MÜLLER konnte nämlich nachweisen, daß bei wiederholter Absorption eines hämolytischen Immunserums durch Blut der Absorptionsquotient immer kleiner wird, während der Absorptionsquotient bei fortschreitender Verdünnung des Ambozeptorserums gleich bleibt oder sogar zunimmt. MÜLLER schließt daraus, daß das Immunserum eine Reihe verschieden avider Ambozeptoren enthält. Bei wiederholter Absorption muß daher das Serum sukzessive an den avideren Ambozeptortypen verarmen, woraus sich die verminderte Bindungsenergie, welche sich in dem Sinken des Absorptionsquotienten dokumentiert, ergibt. An und für sich ist nämlich der Absorptionsquotient um so größer, je geringere Ambozeptormengen ein und derselben Blutmenge zur Verfügung stehen.

ARRHENIUS hat aus dem zahlenmäßigen Studium der Ambozeptorverbindung den Schluß gezogen, daß es sich bei diesem Vorgang um einen einfachen Verteilungsvorgang zwischen zwei Lösungsmitteln handelt. Nach zahlreichen Arbeiten MANWARINGS bestehen erhebliche Schwierigkeiten, welche eine zahlenmäßige Darstellung nach physikalisch-chemischen Gesetzen vereiteln. Der Aufklärung bedürftig erscheint die Angabe MANWARINGS, derzufolge er unter gewissen Bedingungen nach dem Digerieren mit Blutzellen mehr Ambozeptor auffand, als im nativen Serum. Ohne hier auf die Theorie des Bindungsvorgangs näher eingehen zu wollen, möchte ich doch nicht unerwähnt lassen, daß die mangelnde Reversibilität der Ambozeptorbindung, auf welche gleich näher einzugehen sein wird, geeignet erscheint, gegen die Zulässigkeit der physikalisch-chemischen Betrachtungsweise im Sinne einer einfachen Verteilung zu sprechen, und die von EHRLICH inaugurierte Lehre von der sekundären Verfestigung, welche die Bindung der Antikörper im Gefolge hat, auch hier zu bestätigen.

Man kann auch für das Studium des Bindungsprozesses in der Weise vorgehen, daß man die Reaktionsgeschwindigkeit feststellt, d. h. die Schnelligkeit der Bindung bestimmt und vergleicht, ein Verfahren, das bei anderen Antikörpern bereits zu wertvollen Aufschlüssen geführt hat (R. KRAUS), und das CERNOVODEANU und HENRI auch für die Frage

der Bindung von Serumhämolysinen herangezogen haben. Kraus hat bei Antitoxinen auf eine verminderte Reaktionsgeschwindigkeit normaler Antitoxine gegenüber immunisatorisch erzeugten hingewiesen, und die schon erwähnten Unterschiede im Verhalten normaler und Immunambozeptoren beim Bindungsversuch sprechen im gleichen Sinne. Auch weisen verschiedene Erfahrungen (Kraus und Dörr, Müller) auf eine kontinuierliche Steigerung der Avidität im Verlaufe des Immunisierungsprozesses, und es kommt daher auch in Betracht, die hämolytischen Ambozeptoren auf ihre Avidität sukzessive während der Immunisierung zu untersuchen, wofür als Methoden die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit (Kraus und Dörr) oder die Bestimmung der Absorptionsquotienten (Müller) zur Verfügung stehen.

Für die Frage der Festigkeit der einmal erfolgten Bindung und der Umkehrbarkeit der Reaktion kommt als weitere Methode die Wiedergewinnung des gebundenen Ambozeptors in Betracht. In dieser Hinsicht hat Morgenroth festgestellt, daß die einmal gebundenen Ambozeptoren durch Digerieren der gewaschenen Blutsedimente mit physiologischer Kochsalzlösung nicht wiedergenommen werden können. Auch Landsteiner und Reich konnten eine Abspaltung der gebundenen Ambozeptoren bei 45° nicht nachweisen. Es muß jedoch angenommen werden, daß eine sehr geringgradige Dissoziation der „Rezeptor-Ambozeptor"-Verbindung besteht. Zu ihrem Nachweis bedarf es aber einer besonderen Versuchsanordnung. Morgenroth und unabhängig davon Muir haben nämlich gezeigt, daß beim Hinzufügen von roten Blutkörperchen, zu solchen, die bereits mit einem Multiplum der Ambozeptoreinheit beladen, aber durch sorgfältiges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung von nachweisbaren Mengen freien Ambozeptors befreit sind, die im Überschuß gebundenen Amboceptoren auf die intakten Blutzellen übergehen. Dieses „Überspringen" der Amboceptoren von den Rezeptoren einer Blutzelle zu denjenigen einer anderen findet seine Erklärung in der von Morgenroth vertretenen Auffassung, daß „es sich bei der Bindung der Ambozeptoren um einen reversiblen Prozeß handelt, in dem aber der Gleichgewichtszustand so beschaffen ist, daß sich der in Lösung befindliche Anteil der Ambozeptoren für gewöhnlich der Beobachtung und Messung entzieht".

Man verfährt zur Demonstration der Tatsache in der Weise, daß man eine etwa 5%ige Blutaufschwemmung mit einem Multiplum der Ambozeptoreinheit eine Stunde bei 37° digeriert, sodann durch sorgfältiges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung die Zwischenflüssigkeit von ungebundenem Ambozeptor befreit und aus dem Sediment wieder eine Blutaufschwemmung von der ursprünglichen Konzentration bereitet. Mit dieser Aufschwemmung mischt man gleiche Teile einer nativen Blutaufschwemmung von derselben Konzentration, hält die Gemische eine Stunde bei 37° und fügt nun Komplement hinzu, das natürlich in hinreichender Menge vorhanden sein muß, um die gesamte involvierte Blutmenge unter Mitwirkung von genügendem Amboceptor komplett zu lösen. Geht der Ambozeptor von der beladenen Blutzelle zu der intakten über, so muß nunmehr vollständige Hämolyse erfolgen, während im anderen Falle ein der Menge des sekundär zugefügten Blutes entsprechender Teil der Blutkörperchen ungelöst bleibt. Wichtig ist es dabei, die Gemische von ambozeptorbeladenen und nativen Blutkörperchen vor dem Komplementzusatz eine gewisse Zeit — eine Stunde bei 37° — zu digerieren. Im anderen Falle beiben nämlich, wie Morgenroth

und MUIR gezeigt haben, die intakten Blutkörperchen ungelöst, und das erklärt sich dadurch, daß das Komplement sehr rasch von den amboceptorbeladenen Blutkörperchen gebunden wird und deren Hämolyse bewirkt, bevor die Ambozeptoren Zeit gehabt haben, auf die anderen Blutzellen überzugehen. MORGENROTH nimmt an, daß die Bindung des Komplements an den Amboceptor eine erhöhte Haftfähigkeit des Ambozeptor-Rezeptorkomplexes bedingt. MUIR gelangt allerdings auf Grund besonderer Versuchsanordnungen, deren detaillierte Wiedergabe hier zu weit führen würde, zu der Ansicht, daß auch Ambozeptor dann überspringen kann, wenn eine vollständige Sättigung mit Komplement stattgefunden hat, allerdings stets in Form freien Ambozeptors, nicht als Ambozeptor-Komplementverbindung.

Was die Bindungsverhältnisse bei den Hämagglutininen anlangt, so muß an erster Stelln auf die Arbeiten LANDSTEINERS und seiner Mitarbeiter hingewiesen werden. Wir wissen durch LANDSTEINER und REICH, daß die Agglutinine bei tiefer Temperatur besser gebunden werden als bei höherer, und daß es gelingt, die Agglutinine besonders bei höherer Temperatur aus den agglutinierten Zellen wiederzugewinnen. Besonders im Falle der Autoagglutination ändert sich, wie LANDSTEINER und REICH hervorheben, das Gleichgewicht in hohem Maße mit der Temperatur, so daß man nach LANDSTEINER Autoagglutinine, auf deren gelegentliches Vorkommen schon ASCOLI und KLEIN hingewiesen haben, durch einen kleinen, sich ergebenden Kunstgriff leicht nachweisen kann. Man muß nämlich Serum und Blutzellen sofort in der Wärme trennen und das Serum dann bei 0° einwirken lassen. GIRARD-MANGIN und HENRI haben auch in salzfreiem Medium (Rohrzuckerlösung) Agglutination der Blutkörperchen durch ihr eigenes Serum beobachtet. Bemerkt sei, daß nach LANDSTEINER und REICH auch bei den Agglutininen die Absorptions- und Spaltungskurve sich nicht decken, so daß man auch hier nicht von vollkommen reversiblen Prozessen sprechen kann. Nach weiteren Untersuchungen LANDSTEINERS und REICHS besteht ein Unterschied zwischen immunisatorisch erzeugten Hämagglutininen und homologen Normalagglutininen insofern, als die mit Immunserum agglutinierten Blutkörperchen beim Erwärmen weniger Agglutinin abgeben, als die mit entsprechenden Dosen normalen Serums agglutinierten. Es ergibt sich also aus diesem Vorgehen eine Differenz in der Festigkeit der beiden resultierenden Zelle-Agglutininverbindungen, aus der man wohl auf eine höhere Avidität der Immunagglutinine schließen darf, und die besondere Eigenart der von LANESTEINER und REICH zu diesem Zweck benutzten Methode sei besonders hervorgehoben.

Was nun die Wirkung der Ambozeptoren anlangt, so ist bei den minimalen Mengen, in welchen die hämolytischen Immunsera wirken, die Frage naheliegend, ob es sich hier etwa um eine fermentative Funktion handelt. Indes sprechen eine Reihe von Tatsachen und besonders die quantitativen Verhältnisse der Ambozeptorwirkung dagegen. Zwar ist die Thermostabilität der Ambozeptoren nicht als ein prinzipiell die Fermentnatur ausschließender Grund anzusehen; wenn man sich aber an die Definition des Ferments als des Vermittlers einer Reaktion zwischen anderen Stoffen hält, so erscheint bereits die durch v. LIEBERMANN herangezogene Versuchsanordnung geeignet, gegen die Fermentnatur des Ambozeptors zu sprechen. Nach v. LIEBERMANN geht man in der Weise vor, daß man Gemische von gleichen Teilen Blut und Ambozeptoren und aufsteigenden Mengen von Komplement herstellt. Die Blutmenge

muß so gewählt sein, daß auch bei größter Komplementmenge eine vollständige Hämolyse nicht stattfindet. Nach einer bestimmten Zeit wird zentrifugiert, und die Abgüsse werden kalorimetrisch miteinander verglichen. Würde der Ambozeptor als Ferment fungieren, so müßte das gelöste Hämoglobin proportional mit der Komplementmenge stetig zunehmen. Man kann sich aber davon überzeugen, daß die hämolytische Wirkung des Ambozeptors trotz erheblicher Komplementvermehrung nicht über ein gewisses Maß gesteigert werden kann.

Daß der Ambozeptor an und für sich keine eigentliche Giftwirkung ausübt, sondern nur gebunden wird, und daß auch bei dieser Bindung nicht etwa eine latente Giftwirkung stattfindet, zeigen die schon erwähnten Untersuchungen von MORGENROTH und MUIR, denen es gelang, den bereits gebundenen Ambozeptor in seiner ursprünglichen Aktivität wiederzugewinnen. Für die Frage, ob die Zelle durch die Bindung des Ambozeptors eine Schädigung oder Verminderung ihrer Resistenz erfährt, kommt auch das von FRIEDBERGER und RÖSSLE geübte Vorgehen in Betracht. Dasselbe besteht darin, daß ambozeptorbeladene Blutkörperchen solchen physikalischen und chemischen Einflüssen ausgesetzt werden, welche erfahrungsgemäß bei gewissen Graden der Einwirkung eine Schädigung der Blutzellen bedingen. Es handelt sich dann darum, festzustellen, ob die amboceptorbeladenen Erythrocyten fragiler sind, als die nativen. Die genannten Untersuchungen erstrecken sich, soweit sie mit ambozeptorbeladenem Blut angestellt sind, hauptsächlich auf den Einfluß osmotisch wirkender Schädlichkeiten, und es zeigte sich kein Unterschied zwischen normalen und ambozeptorbeladenen roten Blutkörperchen. Nach RÖSSLE können die letzteren sogar resistenter sein, und in gleichem Sinne ist die Beobachtung HECKERS anzuführen, derzufolge ambozeptorbeladenes Blut durch oleinsaures Natron in geringerem Grade gelöst wird, als das native (vgl. auch v. DUNGERN und COCA).

Da es die Verhältnisse oft erfordern, daß man mit ambozeptorbeladenem (präpariertem, sensibilisiertem) Blut arbeitet, so sei kurz die Herstellung desselben angegeben: Man mischt gleiche Teile 5 %iger Blutaufschwemmung und Ambozeptorlösung. Die letztere wird durch Verdünnen des inaktivierten ambozeptorhaltigen Serums mit so viel Kochsalzlösung hergestellt, daß die der Blutaufschwemmung entsprechende Menge die gewünschte Anzahl von Ambozeptoreinheiten enthält. Das Gemisch wird eine Stunde lang bei 37° unter häufigem Schütteln gehalten, sodann zentrifugiert. Nach ein- oder mehrmaligem Waschen des Blutsediments (die Häufigkeit der Prozedur muß von der involvierten Serummenge abhängig gemacht werden) mit physiologischer Kochsalzlösung wird aus demselben wieder eine 5 %ige Blutaufschwemmung bereitet.

3. Spezifität der Ambozeptoren.

Was die Spezifität der Ambozeptoren anbetrifft, so liegen die Verhältnisse ganz analog, wie bei den Antikörpern im allgemeinen. Das Verständnis und das methodische Vorgehen ergibt sich ohne weiteres aus dem von EHRLICH und MORGENROTH ausgesprochenen Satz, „daß von einer Spezifität der durch Immunisierung mit Zellen erhaltenen Ambozeptoren nur in dem Sinne gesprochen werden kann, daß hierunter jedesmal die spezifischen Beziehnungen zwischen den einzelnen Typen von Ambozeptoren und von Rezeptoren verstanden werden“. Spezifisch

ist also das Immunisierungsprodukt in bezug auf das eingeführte Antigen*). Da aber dieselben Rezeptoren auch an anderen morphologischen Elementen oder bei anderen Tierarten vorkommen können, so ergibt sich, daß die Spezifität nicht im strengen morphologisch-zoologischen Sinne zum Ausdruck kommt. Man prüft die Spezifität, indem man den Ambozeptor (Immun- oder Normalserum) auf verschiedene Zellsubstrate einwirken läßt und findet, daß z. B. ein durch Immunisieren mit Rinderblut erhaltenes Immunserum auch auf Ziegen- und Hammelblut in hohem Grade hämolytisch wirkt (Ehrlich und Morgenroth, vergl. auch Lüdke), daß ebenso ein durch Injektion von Menschenblut gewonnenes Hämolysin auch auf Affenblut wirkt (Marshall) und umgekehrt. Es liegt dies daran, daß diese Blutarten eine große Zahl gemeinsamer Rezeptorentypen besitzen. Im allgemeinen kann man sagen, daß die Identität des Rezeptorenapparates um so ausgesprochener ist, je näher die betreffenden Tierarten verwandt sind. Da aber nach dem von Ehrlich und Morgenroth aufgefundenen Gesetz des „Horror autotoxicus" der Organismus nicht befähigt ist, gegenüber solchen Rezeptoren, die er selbst besitzt, Antikörper zu bilden, so wird eine um so größere Spezifität der Ambozeptoren resultieren, je näher verwandt die zur Immunisierung gewählte Tierart dem Blutspender ist. Den höchsten Grad erzielt man, wenn man nach dem Vorgang von Ehrlich und Morgenroth Isolysine erzeugt, d. h. die Blutzellen eines Tieres einem anderen Individuum derselben Art einspritzt. Man erhält dann isolytische Ambozeptoren, welche nur auf die Blutzellen gewisser Individuen wirken, nämlich solcher, die gerade diejenigen Rezeptorentypen mit den zur Injektion verwandten Blutzellen gemeinsam haben, welche dem mit Blut immunisierten Tiere fehlen. Derartige Isolysine können auch auf das Blut verwandter Tiere wirken, z. B. Ziegenblutisolysine auf Hammelblut.

Ebenso, wie eine Spezifität im zoologischen Sinne streng nicht besteht, fehlt sie mehr oder weniger in morphologischer Hinsicht. Ambozeptoren, welche durch Injektion von Blutzellen erzeugt sind, können auch auf andere Körperzellen wirken, und umgekehrt entstehen durch Injektion der verschiedensten Gewebe und Körperflüssigkeiten meist auch hämolytische Ambozeptoren. Der Grund für diese Erscheinung ist in sehr einfacher Weise darin zu suchen, daß die Rezeptoren eben nicht morphologisch-anatomisch differenziert sind. Es seien nur die durch v. Dungern, Metchnikoff, Moxter erhobenen Befunde erwähnt, nach denen bei Vorbehandlung von Tieren mit Flimmerepithelien, Milch, Spermatozoen auch Hämolysine gebildet werden. Es würde zu weit führen, alle diesbezüglichen Einzelbeobachtungen der Autoren anzuführen. Als Paradigma für die sich darbietenden Verhältnisse sei der von Michaelis und Fleischmann analysierte Fall erwähnt. Er betrifft die durch Injektion von Blut- und Leberzellen einer und derselben Tierart gewonnenen Antisera. Beide Antisera besaßen hämolytische Ambozeptoren und Antikörper, die von den Leberzellen gebunden wurden. Jedoch war der durch Leberzellen erzeugte Ambozeptor durch eine größere Labilität charakterisiert. Daß aber ein Teil der durch Leberzellen erzeugten Ambozeptoren nicht auf rote Blutkörperchen wirkte und insofern spezifisch

*) Wenn auch dieser Grad der Spezifität für eine biologische Bluteiweißdifferenzierung hinreicht, so ist die von Deutsch zuerst vorgeschlagene Anwendung der hämolytischen Immunsera für die forensische Blutdiagnostik doch aus dem Grunde praktisch nicht anwendbar, weil es sich meist nicht mehr um intakte Blutzellen handelt, so daß die hämolytische Reaktion benutzt nicht werden kann.

war, ließ sich dadurch zeigen, daß beim Digerieren des Leberzellenantiserums mit den Blutzellen noch eine Ambozeptorfraktion im Abgusse blieb, welche nur auf Leberzellen wirkte.

Es handelt sich hier um das Prinzip der sogenannten „elektiven Absorption", eines Verfahrens, das, durch EHRLICH und MORGENROTH eingeführt, von großer Bedeutuug für die Analyse der Ambozeptoren und der Antikörper im allgemeinen ist. Wirkt ein Antiserum auf mehrere Zellarten ein, so können die quantitativen Beziehungen dabei doch recht verschiedene sein. Betrachten wir z. B. den Fall eines hämolytischen Immunserums, das durch die Blutzellen der Tierart A erzeugt ist und auch auf die Blutzellen der Spezies B wirkt. Die homologen Blutzellen besitzen nun sämtliche Gegengruppen (Rezeptoren), welche zur Bindung der im Immunserum vorhandenen Ambozeptoren erforderlich sind. Nach Digerieren mit den Blutzellen A wird mithin das Immunserum die hämolytische Wirkung sowohl gegenüber A, als auch gegenüber B eingebüßt haben. Der Ambozeptorenapparat ist eben vollständig gebunden worden. Anders, wenn man das Immunserum mit den Zellen B digeriert. Die heterologe Blutart B hat wohl einen Teil von Rezeptoren mit A gemeinsam; deshalb wirkt ja das Immunserum auch auf B hämolytisch. Aber die Blutzellen A besitzen daneben eine mehr oder weniger große Anzahl von Rezeptorentypen, welche der Zellart B fehlen. Auch für diese Rezeptoren enthält das Immunserum korrespondierende Ambozeptoren. Diese werden natürlich bei dem Digerieren mit den Blutzellen B frei bleiben müssen, während die auf B wirkende Ambozeptorfraktion gebunden wird. So erhält man also nach dem Digerieren des durch die Zellen A erzeugten Immunserums mit den Zellen B ein Zentrifugat, das nur noch auf die Zellart A, nicht mehr auf B wirkt. Dabei braucht die Wirksamkeit gegenüber den Blutzellen A gar nicht vermindert zu sein, wenn der Gehalt der *nur* auf A wirkenden Ambozeptoren im Immunserum mindestens ebenso groß oder größer ist wie derjenige der auch auf B wirkenden Ambozeptorfraktion. Man gelangt also durch die Methode der elektiven Absorption dazu, ein von vornherein auf zwei oder mehrere Zellarten wirkendes Immunserum künstlich so zu beeinflussen, daß es nur auf eine von diesen Zellarten wirkt. Das Immunserum ist also im anatomisch-zoologischen Sinne spezifischer geworden. Diese erworbene Spezifität kann natürlich nur eine relative sein und sich nur auf die Relation zwischen den in Frage kommenden Zelltypen beziehen. Auf andere Zellarten kann das absorbierte Immunserum noch immer wirken, nämlich auf diejenigen, welche, um bei dem obigen Beispiel zu bleiben, Rezeptoren mit den Zellen A gemeinsam haben, die der Zellart B fehlen. Auf die mannigfachen Anwendungen, welche das Verfahren der elektiven Absorption bei den verschiedensten Antikörpern gefunden hat, einzugehen, ist hier nicht der Ort. Der von EHRLICH und MORGENROTH zuerst analysierte Fall betrifft die durch Injektion von Rinder-, Ziegen- oder Hammelblut gewonnenen hämolytischen Immunsera, von denen jedes auf alle drei Blutarten wirkt (vergl. auch LÜDKE). MARSHALL hat in anologer Weise die gleichen Verhältnisse für die durch Menschen- und Affenblut erzeugten Immunsera klargelegt. Es erübrigt sich, die detaillierte Technik derartiger Untersuchungen zu beschreiben. Sie entspricht durchaus dem eingehend abgehandelten Bindungsversuch, der in diesem Falle im allgemeinen unter Verwendung eines Überschusses von Blutkörperchen vorzunehmen ist. Will man allerdings bestimmte Ambozeptortypen aus einem Serum absorbieren und

dabei die anderen möglichst quantitativ unbeeinflußt lassen, so wird man einen Blutüberschuß vermeiden müssen. Die Veränderungen durch die Absorption ergeben sich in einfacher Weise durch die Bestimmung der Ambozeptoreinheit für jede der in Frage kommenden Blutarten vor und nach der Bindung.

Auch im normalen Serum können durch die elektive Absorption die verschiedenen Ambozeptortypen differenziert werden. Hier handelt es sich naturgemäß von vornherein um Gemische der verschiedensten Ambozeptoren, die aber im einzelnen als spezifisch in dem oben erörterten Sinne angenommen werden können.

Für die Hämagglutinine gelten dieselben Prinzipien wie für die Ambozeptoren. Malkoff benutzte zuerst die elektive Absorption, um auf verschiedene Blutarten wirkende Agglutinine des normalen Serums von einander zu trennen. Sehr geeignet für das Studium der Agglutinine erscheint auch die von Landsteiner entdeckte und von ihm und seinen Mitarbeitern oft geübte Methode der Abspaltung des gebundenen Agglutinins durch thermische Eingriffe. Auch bei Berücksichtigung des heutigen Standes der Forschung steht wohl nichts im Wege, die Hämagglutinine des normalen Serums ebenso wie die Antikörper überhaupt als spezifisch anzusprechen, wenn man nur im Sinne der von Ehrlich und Morgenroth gegebenen Definition unter Spezifität die Beziehungen zwischen Antikörper und dem korrespondierenden Rezeptor des jeweiligen Antigens versteht. Es hat sich aber schon seit Jahren gezeigt, daß die Rezeptoren nicht nach dem zoologischen System charakterisiert sind, sondern daß sich dieselben Rezeptoren oft in der ganzen Tierreihe, wenn auch in verschiedener Quantität wiederfinden. Besonders die Erfahrungen mit den Präzipitinen haben ja gezeigt, daß man von einer Spezifität im zoologischen Sinne nur in quantitativer Hinsicht sprechen kann. Wenn daher Landsteiner und Reich in ihrer neuesten Arbeit „die Agglutinine des Normalserums als nicht spezifisch bezeichnen, insofern sie eben nicht vorwiegend auf eine Zellart wirken", so ist das doch wohl nur ein anderer Ausdruck dafür, daß eine Spezifität im zoologischen oder morphologischen Sinne bei den Immunitätsreaktionen streng genommen nicht existiert. Definiert man aber die Spezifität der Normalagglutinine im Sinne der von Ehrlich und Morgenroth für die Antikörper zunächst am Beispiel der Ambozeptoren gegebenen Darlegungen, so entsprechen die von Landsteiner und Reich gezogenen Schlußfolgerungen im allgemeinen den sich ergebenden Postulaten. Es ergibt sich nämlich übereinstimmend, daß „die Agglutinine des normalen Serums ein Gemenge von Substanzen darstellen", und daß „jedes einzelne Agglutinin des Normalserums Affinität für eine sehr große Zahl von Blutarten hat, und zwar eine Affinität verschiedener Grade, bis zu so geringen, daß sie beim Versuch unter den gewöhnlichen Bedingungen untermerklich sind" (Landsteiner und Reich). Die den einzelnen Blutarten gegenüber verschiedengradige Affinität ist eben entsprechend den Vorstellungen Ehrlichs auf den verschiedenen Gehalt der Blutarten an passenden Rezeptoren zurückzuführen. Das Agglutinin ist aber in dem Sinne spezifisch, daß es nur auf solche Blutarten wirkt, welche diese Rezeptoren besitzen, und um so stärker, je mehr resp. je avidere Rezeptoren vorhanden sind. Die einzelnen Rezeptorentypen können aber, wie dies schon Ehrlich in den „Schlußbetrachtungen" (Spezielle Pathologie und Therapie [Nothnagel], Bd. VIII, 1901) ausgeführt hat, der Mehrzahl oder der Gesamtheit der Tierarten gemeinsam oder aber auf gewisse Tierarten mehr oder weniger beschränkt

sein. Es sprechen daher auch die von LANDSTEINER mitgeteilten interessanten Versuche, nach denen man durch Abspaltung der an eine bestimmte Blutart gebundenen Agglutinine Lösungen enthält, welche nicht nur diese eine Blutart, sondern auch viele andere in schwächerem Maße agglutinieren, durchaus nicht gegen die Spezifität der Agglutinine in dem von EHRLICH vertretenen Sinne. Man kann sogar theoretisch erwarten, daß bei der Absorption mit einem reichlichen Blutüberschuß auch zoologisch nicht spezifische Agglutinine merklich gebunden werden, und es ist methodisch ratsam, die quantitativen Verhältnisse, insbesondere die Blutmenge, erst empirisch in geeigneter Weise zu bestimmen, wenn man eine Trennung im zoologischen Sinne erreichen will. Gelingt diese aber bei einer geringeren Blutmenge, dagegen bei einem Blutüberschuß nicht, so ist das eben der Ausdruck dafür, daß Spezifität besteht, die zoologische Differenzierung aber eine nur quantitative ist.

Daß durch die Immunisierung mit einer Blutart die Spezifität der Agglutinine stark zunimmt, wird auch durch LANDSTEINER und REICH demonstriert. Nach der entwickelten Auffassung ergibt sich aber daraus nicht die Annahme, daß die Immunagglutinine spezifischer sind als die Normalagglutinine. Die Immunsera besitzen eine größere Spezifität als die Normalsera; jedoch steht nichts im Wege, anzunehmen, daß die einzelnen Komponenten der Normalsera ebenso spezifisch sind, wie diejenigen der Immunsera und die letzteren die Analoga der ersteren darstellen, nur daß eben der durch den Immunisierungsstoff determinierte Teil der normalen Antikörper eine Steigerung erfährt. Dabei ist natürlich eine absolute Identität nicht erforderlich. Hat sich doch aus den Untersuchungen P. TH. MÜLLERS ergeben, daß sogar während der Dauer der Immunisierung eine fortgesetzte Verschiedenheit der gebildeten Antikörper zu konstatieren ist, insofern als sie stetig an Avidität zunehmen. In gleichem Sinne wird man auch Unterschiede zwischen Normal- und Immunagglutinin annehmen dürfen, wie sie ja von LANDSTEINER und REICH für die Hämagglutinine erwiesen sind. Aber dadurch dürfte keine prinzipielle Scheidung bedingt sein, da sich wohl Normalagglutinine von gewissen Immunagglutininen nicht mehr unterscheiden als Immunagglutinine verschiedener Stadien untereinander. Immerhin sind unterscheidende Merkmale, wie die von LANDSTEINER und REICH eruierte leichtere Absorption durch Kasein und höhere Thermolabilität (cf. auch LÜDKE) der Normalagglutinine, beachtenswert.

4. Vielheit der Ambozeptoren.

Daß sowohl normale Sera, als auch die durch Vorbehandeln mit einer bestimmten Zellart gewonnenen Immunsera ein Gemisch von Ambozeptortypen darstellen, ist schon im vorigen Abschnitt erwähnt worden; gleichzeitig wurde auch die elektive Absorption als eine dominierende Methode zur Erkenntnis und zum Nachweis der Pluralität charakterisiert. Mittels der Methode der elektiven Absorption wurde zuerst durch EHRLICH und MORGENROTH in normalen und Immunseris eine Vielheit von Ambozeptoren nachgewiesen. Die Vielheit der Amboceptoren ergibt sich auch aus dem Verhalten der Isolysine. Wie EHRLICH und MORGENROTH gezeigt haben, wirken diese isolytischen Immunsera gegenüber den Blutzellen verschiedener Individuen derselben Spezies ganz variierend, woraus unbedingt eine Pluralität der Ambozeptoren und der korrespondierenden Zellrezeptoren abgeleitet werden muß. Die ge-

nannten Wege zum Nachweis der Ambozeptorenvielheit beziehen sich auf die Differenzierung der cytophilen Gruppe. Die früher von Ehrlich und Morgenroth herangezogene Differenzierung mittels Antiambozeptoren kann nicht mehr als beweiskräftig gelten, seitdem wir durch Bordet wissen, daß die als Antiambozeptoren beschriebenen Immunstoffe nicht Antikörper der cytophilen Gruppe sind (vergl. auch Ehrlich und Sachs). Die Möglichkeit ist freilich nicht ausgeschlossen, daß es durch besondere Maßnahmen noch gelingt, Antikörper der cytophilen Gruppe zu erzeugen und sie zur Differenzierung der Ambozeptoren zu verwenden.

Dagegen bietet sich in den Antiambozeptoren ein Mittel, um eine Differenzierung der komplementophilen Gruppen nachzuweisen. Wie nämlich die Untersuchungen Pfeiffers und Friedbergers sowie Bordets gezeigt haben, wirken die Antiambozeptoren spezifisch in der Weise, daß sie sämtliche von einer Tierart gewonnenen Ambozeptoren neutralisieren, aber nicht auf die Ambozeptoren anderer Tierarten wirken. In Anerkennung des daraus gezogenen Schlusses, daß der Antiambozeptor nicht gegen die cytophile Gruppe wirkt, haben Ehrlich und Sachs auf Grund ihrer Untersuchungen die Auffassung vertreten, daß die Antiambozeptoren Antikörper der komplementophilen Gruppen sind. Für die Frage der Verschiedenheit der von verschiedenen Tierarten durch Vorbehandeln mit derselben Zellart gewonnenen Ambozeptoren, ist das gleichgültig. Aus den tatsächlichen Befunden ergibt sich, daß eine solche durch Antiambozeptoren zu erweisende Differenz besteht. Stellt man sich auf den Boden der von Ehrlich und Sachs vertretenen Auffassung, so ergibt sich, daß diese Differenz in dem komplementophilen Apparat lokalisiert ist, und man gelangt damit zu einem schon früher von Ehrlieh theoretisch formulierten Postulat, daß nämlich bei den Ambozeptoren der gleichen Tierart eine weitgehende Übereinstimmung im komplementophilen Apparat besteht. Die letztere Schlußfolgerung ergibt sich daraus, daß die Antiambozeptoren gegen alle von der gleichen Tierart stammenden Ambozeptoren wirken. Es kann wohl auch keinem Zweifel unterliegen, daß die von verschiedenen Tierarten durch Vorbehandlung mit der gleichen Zellart gewonnenen Ambozeptoren in bezug auf die cytophile Gruppe variieren. Bei der Vielheit der Zellrezeptoren ist ja auch zu erwarten, daß bei den einzelnen Tierarten nicht sämtliche Rezeptortypen antikörperauslösend wirken, daß vielmehr je nach dem Rezeptorenapparat der zur Immunisierung gewählten Tierart eine entsprechende Auslese stattfindet und daher das Immunisierungsprodukt different konstituiert sein wird. Man kann sich davon leicht überzeugen, wenn man etwa einerseits Kaninchen, andererseits Ziegen mit Rinder- oder Hammelblut vorbehandelt. Im ersteren Falle bildet sich ein System von Ambozeptoren, das auf Rinder-, Hammel- und Ziegenblut etwa gleich stark wirkt, im letzteren werden auf Ziegenblut wirkende Ambozeptoren nicht gebildet oder nur als Isolysine, also in einer Weise, durch die sie bereits an und für sich von den im Kaninchenorganismus gebildeten auf Ziegenblut wahllos wirkenden Ambozeptoren zu differenzieren sind.

Man muß also nach alledem an dem einzelnen Partialambozeptor eine zweifache Spezifität unterscheiden; der Ambozeptor ist spezifisch:

1. in bezug auf die cytophile Gruppe,
2. in bezug auf die Tierart von der er stammt.

Im zweiten Fall verlegen wir die spezifische Konfiguration des Ambozeptors in den komplementophilen Apparat ohne aber damit eine vollständige Identität desselben bei allen Ambozeptoren derselben Tierart anzunehmen. Wenn man von der EHRLICHchen Konzeption des Polyceptors ausgeht, nach welcher der Ambozeptor eine Schar von komplementophilen Gruppen besitzt, so kann man sich vorstellen, daß ein mehr oder weniger großer Teil dieser Gruppen durch die Tierart charakterisiert ist, und zwar in der Weise, daß durch deren Besetzung ein dominierender Einfluß auf den gesamten komplementophilen Komplex ausgeübt wird. Daneben aber kann man auch differente komplementophile Gruppen bei den einzelnen Partialambozeptoren eines und desselben Serums annehmen, und nach EHRLICH und MORGENROTH besteht ein Weg zu ihrer Differenzierung darin, daß man unter Verwendung verschiedener normaler Tiersera als Komplement die Ambozeptoreinheit bestimmt. Bei diesem Vorgehen haben EHRLICH und MORGENROTH oft bei einem und demselben Immunserum recht erhebliche Differenzen aufgefunden, woraus sie auf eine Verschiedenheit der Komplemente und dementsprechend der komplementophilen Ambozeptorengruppen schließen. Die Pluralität der Ambzoeptoren ist bei der Deutung der Versuchsergebnisse sehr zu berücksichtigen. Sie bietet bei der Analyse komplexer und scheinbar paradoxer Erscheinungen oft eine relativ einfache Handhabe, um zu einer Konzeption des Wesens der Versuchsbefunde zu gelangen; als ein Beispiel in dieser Hinsicht sei die Arbeit von SACHS und BAUER erwähnt, in der das von BORDET und GAY beschriebene Phänomen der Hämolyse von ambozeptorbeladenem Rinderblut durch das Zusammenwirken von inaktivem Rinderserum und aktivem Pferdeserum auf Grund der Pluralität der Ambozeptoren im Immunserum dem Verständnis zugänglich gemacht wird.

Schließlich sei auch an dieser Stelle noch kurz der Unterschiede zwischen Normal- und Immunambozeptoren gedacht. Sie sind nicht prinzipieller Art, aber doch vorhanden und durch die Arbeiten des Frankfurter Instituts zuerst erkannt worden. Dahin gehört zunächst die oft verringerte Thermostabilität der normalen Ambozeptoren*), ferner der Umstand, daß die normalen Ambozeptoren meist eine relativ geringe Avidität der cytophilen Gruppen aufweisen. Dieses Umstandes ist schon bei der Besprechung der Kältetrennungsmethode eingehend gedacht worden, und die neueren Untersuchungen P. Th. MÜLLERS haben ja gezeigt, daß im Laufe der Immunisierung eine sukzessive fortschreitende Steigerung der cytophylen Avidität angenommen werden muß. Die Methode zum Nachweise der Aviditätsdifferenzen ist der Bindungsversuch unter Variationen von Zeit und Temperatur. Dagegen sprechen, wie noch zu erörtern sein wird, viele Erfahrungen dafür, daß den normalen Ambozeptoren in der Regel eine erhöhte Avidität der komplementophilen Gruppen zukommt. Das von GRUBER aufgestellte normale und Immunambozeptoren differenzierende Gesetz, demzufolge normale Ambozeptoren die Blutkörperchen niemals für ihr eigenes Serum empfindlich machen sollen, ist hingegen, wie MORGENROTH und SACHS gezeigt haben, irrtümlich.

Wenn auch trotz der erwähnten differenzierenden Momente normale und immunisatorisch erzeugte Ambozeptoren in bezug auf Kon-

*) Erwähnt seien in dieser Hinsicht auch analoge Versuche LANDSTEINERS mit aktivem Serum und die Befunde SHIBAYAMAS, nach denen normale Sera bei der Dialyse das hämolytische Vermögen leichter verlieren als Immunsera. Dabei kann es sich allerdings um eine Einwirkung auf die Komplemente handeln.

stitution und Wirkungsweise als wesensgleich gelten müssen, so wäre es doch irrig daraus zu schließen, daß der Ambozeptorenapparat des Immunserums nun etwa einen einfach einseitig vergrößerten Abklatsch der normalen Ambozeptoren darstellte. Es können sehr wohl bei der Immunisierung Ambozeptoren gebildet werden, die im normalen Serum überhaupt fehlen oder nicht in nachweisbarer Form oder Menge vorhanden sind. Hat doch MORGENROTH gezeigt, daß die bei der Immunisierung von Kaninchen mit Ziegenserum entstehenden Immunambozeptoren (Immunisierung mit Ziegenblut würde die gleichen Verhältnisse reproduzieren) auch auf Rinderblut wirken, während dem normalen Kaninchenserum derartige Ambozeptoren fehlen. Die auch von MORGENROTH gezogene Konsequenz kann unter Umständen methodisch wichtig sein. Wenn man nämlich eine Tierart mit einer Blutart vorbehandelt, für welche das normale Serum bereits Ambozeptoren besitzt und man bei nicht sehr hochwertigem Immunserum im Zweifel ist, ob eine Immunitätsreaktion überhaupt stattgefunden hat, so kann sich der folgende evtl. zu sicherem Aufschluß führende Ausweg empfehlen. Man wählt eine Blutart, für welche im normalen Serum Ambozeptoren fehlen oder erfahrungsgemäß nur in sehr geringer Menge vorhanden sind. Ist diese Blutart der zur Immunisierung benutzten ziemlich nahe verwandt, so kann man bei gelungener Immunisierung erwarten, daß das Immunserum auch auf diese wirkt*).

Für den Nachweis der Vielheit der Hämagglutinine im normalen und Immunserum gelten methodisch die gleichen Prinzipien wie für die Vielheit der Ambozeptoren. Die Methode der elektiven Absorption ist zuerst von MALKOFF geübt worden. Als weiteres Verfahren kommt die von LANDSTEINER und seinen Mitarbeitern eingeführte Abspaltung der gebundenen Agglutinine bei höherer Temperatur in Betracht. Dieser Vorgang gelingt nach LANDSTEINER und REICH besser bei Normalagglutininen als bei denen des Immunserums, woraus diese Autoren auf eine größere Affinität der Immunagglutinine schließen. Andererseits ist zu bemerken, daß nach FORD ein durch Vorbehandeln mit normalem Serum erzeugtes Antiagglutinin auch die Wirkung des entsprechenden Immunagglutinins aufhebt und umgekehrt. Wenn man den Agglutininen nur eine haptophore Gruppe, die cytophile, vindiziert, so kann man daraus mit WASSERMANN auf die Identität der cytophilen Gruppen normaler und immunisatorisch erzeugter Agglutinine schließen, wenn auch natürlich ihre Reaktionsgeschwindigkeit (Avidität) eine differente sein kann. LÜDKE ist auch zum Nachweis der Vielheit der Hämagglutinine im normalen Serum in der Weise vorgegangen, daß er die agglutinierenden Funktionen des Serums gegenüber den einzelnen Blutarten bei verschiedenen Individuen verglich und aus Abweichungen in den Proportionen auf eine Vielheit von Agglutininen schloß, ein Verfahren, das bereits M. NEISSER zum Nachweis mehrerer Antitoxine in einem und demselben Serum geübt hat. Auch bediente sich LÜDKE thermischer Einflüsse zur Differenzierung von Partialagglutininen. Es ist zweifellos, daß man bei derartigen Differenzierungsversuchen quantitativ vorgehen und auch die Agglutinabilität der Blutzellen in Rechnung ziehen muß. Gelingt es aber, ein Serum so zu verändern, daß es nach dem Eingriff bei Verwendung einer und derselben

*) Es sei hier davor gewarnt, sich lediglich auf die vergleichende Untersuchung des Serums vor und nach der Blutinjektion zu verlassen. Wenn es sich nicht um ziemlich große Steigerungen handelt, so können zeitliche Schwankungen im Ambozeptorengehalt leicht zu Trugschlüssen führen.

Blutkörperchenaufschwemmung einseitige markante quantitative Differenzen aufweist oder gar eine Umkehrung der Agglutinationstitres gegenüber zwei verschiedenen Blutarten, so kann man wohl nicht umhin, auf eine Vielheit von reagierenden Stoffen zu schließen. Nochmals sei hervorgehoben, daß unter Vielheit ebenso wie unter Spezifität die Beziehungen zu den Rezeptoren zu verstehen sind, die im allgemeinen nicht in zoologischer oder morphologischer Auslese verteilt sind. Da man aber mit isolierten Rezeptorentypen als Antigen im allgemeinen nicht arbeiten kann, so muß die Erforschung der Vielheit unter den gegebenen ungünstigeren Verhältnissen mit den bereits eine große Schar differenter Rezeptoren repräsentierenden morphologischen Elementen geschehen. Bei einfachen vergleichenden Messungen der Agglutinationsstärken verschiedener Sera oder eines und desselben Serums gegenüber verschiedenen Blutarten dürfte das quantitative Arbeiten um so mehr erforderlich sein, als nach den Untersuchungen Hirschfelds die verschiedenen Blutarten gegenüber allen normalen Seris die gleiche Skala der Agglutinabilität aufweisen. Nach dem gleichen Autor sollen auch die normalen Sera verschiedener Tierarten bei den einzelnen Blutarten die gleiche Reihenfolge agglutinierender Wirkung zeigen. Zu der Annahme der Pluralität der Normalagglutinine befinden sich diese Befunde, wie auch Hirschfeld hervorhebt, in keinem Widerspruch. Man muß wohl nach dem Stande der Forschung zwischen den beiden Phänomenen der Agglutininbindung und der Fällung der Zellen unterscheiden, und letztere Erscheinung wird ja in neuerer Zeit nach dem Vorgang von Landsteiner und Jagič, M. Neisser und Friedemann, Zangger und zahlreicher anderer Autoren vom Standpunkt der Kolloidreaktionen aus aufgefaßt (vergl. auch die Studien von Girard-Mangin und Henri, sowie Gengou über die Hämagglutination).

5. Beziehungen der Ambozeptoren zu den Komplementen.

Die Frage nach den Beziehungen zwischen Ambozeptoren und Komplementen spielt besonders in bezug auf den Mechanismus der Ambozeptorenwirkung eine große Rolle. Es stehen sich hier bekanntlich seit Beginn der Cytotoxinforschung zwei Anschauungen gegenüber. Die eine, von Ehrlich und Morgenroth aufgestellte, die sogenannte Ambozeptortheorie, vindiziert dem Ambozeptor zwei bindende Funktionen, eine Affinität zur Zelle und eine zum Komplement. Der Ambozeptor fungiert also danach als Bindeglied zwischen Zellrezeptor und Komplement. Die andere Anschauung, die besonders durch Bordet vertretene Sensibilisierungstheorie, nimmt einen mehr negativen Standpunkt ein, indem sie Beziehungen zwischen Ambozeptor und Komplement leugnet, dagegen keine bestimmten Vorstellungen über die Art der Wirkung präzisiert. Sie vergleicht den Ambozeptor mit einer Art Beize, welche die Zelle derart alteriert, daß sie nunmehr der Einwirkung des Komplements unterliegt. Leider ist der direkte Weg zur Entscheidung, welcher darin bestehen würde, zu eruieren, ob man aus den beiden Komponenten (Ambozeptor und Komplement) das cytotoxisch wirkende Reaktionsprodukt darstellen kann oder nicht, nicht gangbar. Auch ist vorläufig nicht viel Aussicht dazu vorhanden, weil alle daraufhin gerichteten Versuche an der hohen Labilität der reagierenden Stoffe, besonders der Komplemente scheitern*).

*) Beim Kobragift, das in Analogie zu den Ambozeptoren erst durch das Zusammenwirken mit einer anderen Komponente, dem Lecithin, zum hämolytischen Agens wird, ist die Darstellung des Reaktionsproduktes, des Kobralecithids, bekanntlich Kyes gelungen (s. darüber im I. Bande dieses Handbuches: „Antigene tierischen Ursprungs").

Trotzdem stehen eine Anzahl von indirekten Methoden zur Verfügung, deren Studium zu einer recht eingehenden Analyse der bei der Hämolysinwirkung sich abspielenden Vorgänge geführt hat. Die über die Verhältnisse zu stellenden Fragen sind zunächst zweierlei Art:

1. Bestehen Beziehungen zwischen Komplement und Blutzelle?

2. Bestehen solche zwischen Ambozeptor und Komplement?

ad. 1. Was die erste Frage anlangt, so liegen die Verhältnisse für die Erforschung günstig. Man kann hier, da das Komplement keine sichtliche Wirkung auf die Blutzellen ausübt und die letzteren aus dem Gemisch durch Zentrifugieren wieder abgeschieden werden können, in einfachster Weise ebenso, wie bei der Analyse der Beziehungen zwischen Ambozeptor und Zelle, durch Anwendung des Bindungsversuches vorgehen. So ist es Ehrlich und Morgenroth in der Tat frühzeitig gelungen, das Fehlen von Beziehungen des Komplementes zu den intakten Erythrocyten nachzuweisen; das Komplement bleibt auch beim Digerieren mit den roten Blutkörperchen bei 37° quantitativ in der Flüssigkeit. Die Versuchsanordnung ergibt sich aus den Ausführungen über den Bindungsversuch ohne weiteres: Gleiche Mengen der Blutaufschwemmung werden mit absteigenden Mengen des als Komplement fungierenden Serums (gleiches Volumen!) eine Stunde oder länger bei 37° digeriert, sodann wird zentrifugiert, die Abgüsse werden mit frischem Blut unter Zusatz eines beliebigen Multiplums der Ambozeptoreinheit digeriert, die Sedimente eventuell von den anhaftenden Spuren von Serum durch Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung befreit und ebenfalls im Verein mit der gleichen Ambozeptormenge in physiologischer Kochsalzlösung bei 37° digeriert. Das Ergebnis ist dann, daß die mit den Abgüssen digerierten Blutkörperchen gelöst werden, während die Sedimente intakt bleiben. Natürlich darf das komplementhaltige Serum nicht gleichzeitig normale Ambozeptoren enthalten, da sonst durch deren Vermittlung das Komplement absorbiert wird. Im allgemeinen wird ein Ambozeptorgehalt des Normalserums nicht zu Irrtümern führen, da die bei dem einstündigen Digerieren bei 37° bereits in Erscheinung tretende Hämolyse den Ambozeptorgehalt anzeigt. Allein, es kommen Fälle vor, in denen trotz Ausbleibens der Hämolyse ein Ambozeptor interferiert und das Komplement daher ohne den Eintritt von Hämolyse gebunden wird. Es handelt sich dann um Ambozeptoren, welche das im gleichen Serum befindliche Komplement binden, ohne durch dasselbe „aktiviert“ zu werden. Das Komplement ist also im Sinne Ehrlichs „nicht dominant“. Auf diese Weise erklären sich Befunde, wie sie von Klein erhoben wurden. Klein fand nämlich, daß Pferdeserum durch Digerieren mit Meerschweinchenblut, ohne dabei hämolytisch zu wirken, seine Komplementwirkung einbüßt. Wie Browning dann gezeigt hat, ist dafür ein im Pferdeserum vorhandener Ambozeptor verantwortlich zu machen, und nicht der von Klein supponierte Vorgang der Deglutination. Die Methode zur Entscheidung ergibt sich aus den Versuchen Brownings. Es ist nur notwendig, das Pferdeserum mit dem Meerschweinchenblut bei niedriger Temperatur (0°) zu digerieren. Der Ambozeptor wird dann gebunden, das Komplement aber nicht. Auf diese Weise wird das Pferdeserum derart verändert, daß es nunmehr noch komplementreich, aber ambozeptorenarm ist. Wird es jetzt bei 37° mit Blut digeriert, so kann die Komplementbindung nur nach Maßgabe des noch vorhandenen Ambozeptorgehaltes erfolgen und ist daher auch tatsächlich stark reduziert oder aufgehoben.

Hat sich bisher in keinem Fall erweisen lassen, daß die roten Blutzellen ohne Vermittlung von Ambzoeptoren Komplemente binden, so besitzen nach MUIR die aus den Erythrocyten dargestellten Stromata die Fähigkeit, Komplemente zu absorbieren. Das steht in Analogie zu der bereits durch VON DUNGERN festgestellten Fähigkeit der Komplementabsorption durch Organ- und Bakterienzellen. Man wird dabei in erster Linie an eine nicht spezifische physikalische Absorption denken müssen, die, wie noch zu erörtern sein wird, bei der leichten Haftfähigkeit der Komplemente zu erwarten ist. Man kann aber auch daran denken, daß es sich dabei häufig und eine Komplementbindung durch komplementophile Gruppen handelt, da ja Rezeptoren III. Ordnung vom Ambozeptortypus auch an den Organzellen anzunehmen sind. So haben HESS und RÖMER elektive antikomplentäre Eigenschaften, welche sie im Pigmentepithel, der Retina und der Linse entdeckten, auf sessile Rezeptoren III. Ordnung (Ambozeptoren) bezogen.

Darin ist aber gerade ein eminenter Vorteil für das Studium der Cytotoxinwirkung bei den Hämolysinen gelegen, daß die roten Blutkörperchen der Komplementbindung entbehren.

ad 2) Welche Beziehungen können nun zum Komplement nachgewiesen werden? Da muß zuerst die von EHRLICH und MORGENROTH entdeckte Tatsache angeführt werden, daß die ambozeptorbeladene Blutzelle im Gegensatze zur nativen das Komplement bindet und seiner Wirkung anheimfällt. Aus dieser wichtigen Feststellung kann natürlich nicht geschlossen werden, daß das Komplement von der Zelle unter dem Einfluß des Ambozeptors gebunden wird. Die von EHRLICH und MORGENROTH vertretene Auffassung geht im Gegenteil dahin, daß sich das Komplement mit dem Ambozeptor verbindet. Das soll aber nicht etwa heißen, daß auch der freie Ambozeptor sich mit dem Komplement zu einer festen Verbindung vereinigt. Gerade EHRLICH und MORGENROTH waren es wieder, die den Nachweis erbrachten, daß Ambozeptor und Komplement im Serum wenigstens zu einem großen Teil neben einander bestehen müssen. Der Versuch, welcher sie zu dieser Auffassung veranlaßte, war folgender: wurde Blut mit einem geigneten Gemisch von Ambozeptor und Komplement bei 37—40° digeriert und nach einer gewissen Zeit, zu der Hämolyse noch nicht eingetreten war, zentrifugiert, so zeigte es sich, daß der Ambozeptor vorwiegend bereits an die Erythrocyten gebunden war, während das Komplement zu einem großen Teil frei in dem Abguß nachgewiesen werden konnte. Ambozeptor und Komplement existieren also nicht nur bei niedriger Temperatur (0°), wie es das Kältetrennungsverfahren zeigt, sondern auch bei höherer Temperatur mindestens zu einem sehr beträchtlichen Anteil nebeneinander. Die Ambozeptortheorie faßt daher die Beziehungen zwischen Ambozeptor und Komplement im Sinne einer stark dissoziierten Verbindung auf, und so konnten sich EHRLICH und MORGENROTH bereits in ihrer ersten Arbeit über Hämolysine dahin aussprechen, „daß der Immunkörper (Ambozeptor) unter gewissen Bedingungen mit dem Addiment (Komplement) eine lockere chemische, sehr leicht dissoziationsfähige Verbindung eingeht.“

Ob nun die zwischen Ambozeptor und Komplement bestehende Dissoziation in der Kälte sich noch steigert, muß dahingestellt bleiben. Notwendig erscheint eine solche Annahme nicht, da, wie MORGENROTH gezeigt hat, mehr als 20% der zur kompletten Hämolyse erforderlichen Ambozeptor-Komplementmenge sich dem Nachweis entziehen und daher

in der Kälte ein gewisser Anteil der Verbindung gebunden werden kann, ohne daß sich die Sedimente in der Wärme lösen müssen. Aber es ist immerhin möglich, daß eine vollständige Dissoziation in der Kälte stattfindet. Gegenüber der andersartigen Auffassung Grubers hat Morgenroth geltend gemacht, daß ein Fortschreiten der Dissoziation mit der Temperaturerniedrigung durchaus denkbar ist und nur dafür sprechen würde, daß die Verbindung zwischen Ambozeptor und Komplement unter Wärmeverbrauch, endothermisch, vor sich ginge.

Steht man mithin auf dem Boden der Ambozeptortheorie, so muß man ohne weiteres aus den erwähnten Experimenten Ehrlichs und Morgenroths die Schlußfolgerung ziehen, daß die Verankerung des Ambozeptors an den Zellrezeptor eine Steigerung der komplementophilen Ambozeptoravidität zur Folge hat. Daraus ergibt sich wiederum die wichtige Konsequenz, daß in einem Gemisch von freien und bereits an die Zellen verankerten Ambozeptoren das Komplement stets von den letzteren gebunden werden muß*). Wenn daher Bordet zugunsten seiner Sensibilisierungstheorie einen Versuch angeführt hat, welcher den eben gefolgerten Befund veranschaulicht, so spricht das keineswegs gegen die Ambozeptorkonzeption. Es ergibt sich sogar aus diesem Versuch nicht einmal ein bindender Schluß auf lockere Beziehungen zwischen Ambozeptor und Komplement, da man ja vom Standpunkte der Pluralität der Komplemente aus es begreiflich finden muß, daß durch den freien Ambozeptor nur das für ihn „dominante" Komplement gebunden wird, während das einen anderen Ambozeptor aktivierende in Lösung bleibt. Dagegen wissen wir sicher, und diesen Nachweis verdanken wir Bordet, daß nach der Verankerung des Ambozeptors an die Zelle ein aktives Serum seiner sämtlichen Komplementfunktionen beraubt werden kann. Diese Tatsache ist theoretisch und praktisch-methodologisch sehr bedeutungsvoll, steht aber, wie gleich im Vorhinein erwähnt werden mag, mit der Vielheit der Komplemente nicht in dem von Bordet gewollten Widerspruch. Denn das Immunserum besitzt nach den von Ehrlich und Morgenroth gegebenen Feststellungen und Ausführungen eine große Schar komplementophiler Gruppen, und zahlreiche neuere Erfahrungen haben nach dem Vorgange von Ehrlich und Marshall es wahrscheinlich gemacht, daß der einzelne Ambozeptortyp bereits über einen umfangreichen komplementophilen Apparat verfügt, in bezug auf die komplementophile Affinität also ein „Polyzeptor" ist. Die Umstände, welche Ehrlich und Marshall zur Konzeption des „Polyzeptors" geführt haben, sind besonders darin gelegen, daß ihnen der Nachweis gelang, daß die Bindung eines Komplementes an die ambozeptorbeladene Blutzelle von der vorherigen Bindung eines anderen Komplements abhängen kann. Als Mittel zum Zweck geeignet erwies sich ein von Marshall und Morgenroth in einer menschlichen Ascitesflüssigkeit entdecktes Partialantikomplement, welches von zwei untersuchten Komplementfunktionen des Meerscheinchenserums nur die eine paralysierte. Ehrlich und Marshall konnten nun zeigen, daß aus

*) Auf die von M. Neisser und Wechsberg beschriebene Komplementablenkung durch überschüssigen Ambozeptor soll hier nicht näher eingegangen werden, da es sich dabei um bakterizide Ambozeptoren handelt. Obwohl die Möglichkeit gegeben ist, daß bakterizide Ambozeptoren bereits an und für sich eine hohe Avidität zum Komplement besitzen, so sind doch die Erklärungsversuche von Buxton und Gay, welche auf eine Deutung im Sinne der Komplementbindung durch das Zusammenwirken von Antigen und Antikörper hinweisen, zu berücksichtigen (vergl. auch Levaditi).

Gemischen dieser Ascitesflüssigkeit mit Meerschweinchenserum von den ambozeptorbeladenen Blutkörperchen, für welche das Komplement durch die Ascitesflüssigkeit gebunden worden war, nunmehr auch die andere Komplementfunktion nicht absorbiert wird, während aus dem nativen Meerschweinchenserum beide Komplementfunktionen verbraucht werden. Es ist also mit EHRLICH und MARSHALL zu schließen, daß die Bindung des einen Komplementes in diesem Falle die Funktion der vorherigen Bindung eines anderen ist. EHRLICH und MARSHALL haben dasjenige Komplement, welches im speziellen Falle zur Wirkung gelangt, als „dominant", die übrigen als „nicht dominant" bezeichnet. In dem erwähnten Versuch wird also die Bindung des „nicht dominanten" Komplementes erst durch die Bindung des „dominanten" ermöglicht. Versuche von EHRLICH und SACHS weisen darauf hin, daß dies keinesfalls immer der Fall sein muß, daß sogar unter Umständen „nicht dominante" Komplemente rascher gebunden werden, als das dominante. Auch zeigten EHRLICH und SACHS, daß man bei Verwendung normaler Ambozeptoren zu einer isolierten Bindung von Partialkomplementen gelangen kann. Schließlich muß man wissen, daß auch die Komplemente eines Serums, dem ein dominantes Komplement für einen bestimmten Ambozeptor überhaupt fehlt, durch das mit diesem beladene Blut gebunden werden können. So hat BROWNING gezeigt, daß ambozeptorbeladenes Rinderblut Pferdeserum seiner kompletierenden Funktion für ein anderes System beraubt, ohne dabei gelöst zu werden.

Aus Untersuchungen von SACHS und BAUER hat sich ergeben, daß in diesem Falle die Bindung des nicht dominanten Komplements abhängig ist von der vorherigen Bindung eines anderen „nichtdominanten" Komplementes, das man ganz ähnlich, wie in dem von EHRLICH und MARSHALL analysierten Falle, durch inaktives Rinderserum ausschalten kann. Diese Hinweise mögen genügen, um auf die mannigfachen Kombinationen, welche sich ergeben können, hinzuweisen. Sie zeigen zugleich die Bedeutung, welche der Betrachtungsweise unter der Annahme der Polyzeptor-Konzeption zukommt.

Die bisher erörterten Verfahren und Feststellungen über die Beziehungen zwischen ambozeptorbeladenen Blutzellen und Komplement stehen insgesamt im vollständigen Einklang mit der Ambozeptorauffassung. Allerdings sind sie nicht geeignet, die Vereinigung von Ambozeptor und Komplement direkt zu erweisen. Andererseits hat die Annahme, daß das Komplement nicht an den Ambozeptor, sondern an einen Bestandteil der Zelle nach der Verankerung des Ambozeptors eingreift, insofern etwas Gezwungenes, als bei der intakten Blutzelle, obwohl es hier methodisch leicht möglich wäre, eine Beziehung zum Komplement nicht nachgewiesen werden kann. Es kann daher die Annahme, daß nach der Verankerung des Ambozeptors an die Zelle, eine neue Affinität für das Komplement auftritt, nur hypothetischer Art sein, und zu ihrer Stütze muß man sich damit begnügen, Befunde, welche für direkte Beziehungen zwischen Ambozeptor und Komplement sprechen, zu widerlegen zu versuchen. Ist aber selbst dies gelungen, so ist die Ambozeptortheorie damit nicht widerlegt. Es folgt dann höchstens, daß sich beide Anschauungen als gleichberechtigte gegenüberstehen. Nun gibt es aber eine Reihe von Erfahrungen und Methoden, die direkt als Beweise für direkte Beziehungen zwischen Ambozeptor und Komplement angesprochen werden müssen. Ich erwähne hier zunächst die allgemeine Erfahrung, daß die Ambozeptoren fast stets durch die Komplemente der gleichen Tierart

am besten komplettiert werden (Ehrlich), ferner Beobachtungen von Muir, denen zufolge Komplementverbrauch und Menge des gebundenen Ambozeptors in direkter Proportion stehen. Ferner muß hier daran erinnert werden, daß es ja direkt gelungen ist, am Ambozeptor noch andere Gruppen als die cytophilen nachzuweisen. Den einen Weg dazu hat Bordet selbst entdeckt. Er hat gezeigt, daß man durch Immunisieren mit Ambozeptoren Antikörper erhält, welche nicht an der zytophilen Gruppe angreifen, aber in der Weise wirken, daß sie sich mit dem an die Zellen verankerten Ambozeptor vereinigen und dem Komplement den Zugang sperren. Diese schönen Befunde sind von Ehrlich und Sachs, Muir und Browning, Browning und Sachs vollinhaltlich bestätigt worden. Ihre notwendige Konsequenz ist, dem Ambozeptor noch andere Affinitäten als diejenigen zur Zelle zuzuschreiben, und da durch die Wirkung der Bordetschen Antikörper die Verankerung der Komplemente verhindert wird, haben Ehrlich und Sachs diese Antiambozeptoren als Antikörper der komplementophilen Gruppen angesprochen. Das zweite Verfahren, welches zu gleichsinnigen Resultaten führt, verdanken wir einer neueren Entdeckung von Friedberger und Moreschi. Die Autoren haben gefunden, daß in gewissen Fällen bei der Immunisierung einer Tierart mit dem Serum einer anderen Spezies an Stelle der die Hämolyse hemmenden Antiambozeptoren Antikörper entstehen, welche eine beschleunigende Wirkung auf die Hämolyse durch die homologenen Ambozeptoren haben. Da es sich hier um eine artspezifische Wirkung handelt, so muß man mit Friedberger und Bezzola annehmen, daß es sich um eine Zulenkung des Komplements an den Ambozeptor mittels der als Antikörper fungierenden beschleunigenden Substanzen handelt. Es liegt also eine Komplementbindung durch Eiweißantigen und Antikörper vor. Da aber hier der Ambozeptor als Eiweißantigen fungiert und das gebundene Komplement zur hämolytischen Wirkung gelangt, so folgt daraus einmal wiederum, daß der Ambozeptor außer der zytophilen Gruppe, noch andere haptophore Gruppen besitzt. Dann aber ist darin ein gewichtiger Beweis dafür zu erblicken, daß das zur Wirkung gelangende Komplement durch Vermittlung des Ambozeptors und nicht direkt an einen Zellbestandteil angreift.

Es sei darauf hingewiesen, daß Moreschi in ganz analoger Weise eine Auslösung der Hämagglutination durch das Zusammenwirken von zwei an und für sich nicht agglutinierenden Antiseris festgestellt hat. Es ergab sich, „daß Erythrocyten, die mit einer an sich nicht agglutinierenden Dosis des entsprechenden Immunserums beladen werden, beim Hinzutritt kleiner Mengen von präzipitierendem Serum außerordentlich schnell und stark verklumpen, wenn man als Antieiweißserum ein für die Tierspezies präzipitierendes Serum benutzt, welche den Ambozeptor geliefert hat“.

Gewissermaßen der direkteste Weg zum Nachweis der Bindung des Komplements an den Ambozeptor besteht in dem Auffinden solcher Kombinationen, bei denen der Ambozeptor an sich von den roten Blutkörperchen überhaupt nicht gebunden wird. Zwar ist bei den Immunambozeptoren die hohe Avidität zur Zelle die Regel. Das kann aber nicht überraschen, wenn man bedenkt, daß bei der Immunisierung gewissermaßen eine Auslese der avidesten cytophilen Gruppen stattfindet, und es sind ja bereits experimentelle Belege dafür angeführt worden, daß die cytophile Avidität der Ambozeptoren im Laufe der Immuni-

sierung sukzessive ansteigt. Es wäre aber irrig, wollte man allgemein annehmen, daß die relative Avidität von komplementophiler und cytophiler Gruppe stets dem für die Immunambozeptoren geltenden Schema folgt. Es ist schon ausführlich erörtert worden, daß gerade die normalen Ambozeptoren mit der Zelle mehr oder weniger schwach reagieren. Andererseits scheinen die normalen Ambozeptoren vielfach eine recht erhebliche Avidität zum Komplement zu besitzen; darauf sind von Ehrlich und Morgenroth die oft zu bemerkenden antikomplementären Wirkungen normaler Sera, und von Sachs die zuerst von Pfeiffer und Friedberger beschriebenen sogenannten „antagonistischen" Serumstoffe bezogen worden. Man wird also gerade unter den normalen Ambozeptoren darauf rechnen können solche anzutreffen, welche an und für sich nicht mit der Zelle reagieren, sich aber mit dem Komplement verbinden. Der direkte Nachweis, daß es sich um derartige Ambozeptoren handelt, kann aber nur dann erbracht werden, wenn das durch die Vereinigung von Ambozeptor und Komplement entstehende Reaktionsprodukt eine cytotoxische Wirkung entfalten kann, mit anderen Worten, wenn der Ambozeptor durch die Vereinigung mit dem Komplement die Fähigkeit erlangt, mit der Zelle zu reagieren. Ein solcher Fall, der einen zwingenden Beweis für die Richtigkeit der Ambozeptorkonzeption erbringt, ist zuerst von Ehrlich und Sachs beschrieben, und von Sachs sind später eine Reihe analoger Kombinationen angeführt worden.

Die einschlägigen Verhältnisse sollen an dem von Ehrlich und Sachs aufgefundenen Paradigma, das den Gegenstand eingehender Diskussion gebildet hat, etwas näher erörtert werden. Es handelt sich hier um die Hämolyse von Meerschweinchenblut durch das Zusammenwirken von inaktivem Rinderserum (Ambozeptor) und aktivem Pferdeserum (Komplement). Die Versuchsanordnung zur Demonstration der von Ehrlich und Sachs beschriebenen Tatsache ist sehr einfach. Man digeriert Meerschweinchenblut mit dem als Ambozeptor fungierenden inaktiven Rinderserum bei 37°, zentrifugiert und prüft einerseits die Sedimente auf gebundenen Ambozeptor durch Zusatz von Pferdeserum als Komplement, andererseits die Abgüsse auf freien Ambozeptor durch Zusatz von Meerschweinchenblut uud Pferdeserum. Die Sedimente bleiben dann ungelöst, während die Abgüsse Hämolyse bewirken. Der freie Ambozeptor wird also nicht gebunden, während er sich mit dem Komplement vereinigt und danach auch mit der Blutzelle reagiert.

Der früher von Bordet erhobene Einwand, daß in diesem Falle die Reaktion zwischen Zelle und Ambozeptor reversibel wäre und die Blutkörperchen die Sensibilisierung wieder verlören, umschreibt eigentlich nur die Tatsache, daß eine nachweisbare Bindung zwischen freiem Ambozeptor und Zelle nicht stattfindet. Er tangiert aber nicht den Umstand, daß diese Bindung unter dem Einfluß des Komplements doch erfolgt.

Komplizierend ist nun in diesem Falle der Umstand, daß, wie Klein gezeigt hat, das Pferdeserum durch Digerieren mit Meerschweinchenblut die kompletierende Wirkung einbüßt*). Diese Bindung des Pferdekomplementes erklärt sich aber durch die Vermittlung eines im Pferdeserum enthaltenen Ambozeptors, für welchen das eigene Komplement nicht dominant ist. Um die störende Wirkung dieses Ambozeptors zu beseitigen, verfährt man nach Browning mittels der Kältetrennungs-

*) Die hier vorliegende Bindung des im Pferdeserum vorhandenen Ambozeptor-Komplement-Komplexes soll nach Klein sowie Bordet und Gay besser erfolgen, wenn das Pferdeserum-Blutgemisch mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt ist.

methode. Bei 0° wird das Pferdekomplement nicht absorbiert, dagegen der Ambozeptor. Die Bindung des letzteren ist zwar bei 0° keine vollständige, immerhin aber läßt sich zeigen, daß ein bei 0° mit Meerschweinchenblut vorbehandeltes Pferdeserum beim Digerieren mit Meerschweinchenblut bei 37° einen erheblichen Teil seines Komplementvorrats (nachgewiesen durch die Komplementierung des Rinderambozeptors) bewahrt (vergl. auch Sachs und Bauer). Das erwähnte methodische Vorgehen von Browning bietet zugleich den Schlüssel zu Befunden, welche von Bordet und Gay erhoben worden sind. Der eine Teil dieser experimentellen Daten deckt sich mit den schon durch Klein und Browning bekannten Tatsachen: Das Pferdekomplement wird durch Vermittlung des Pferdeambozeptors von den Meerschweinchenblutkörperchen gebunden. Aber Bordet und Gay schließen daraus, daß der Pferdeambozeptor auch der bei der Hämolyse des Meerschweinchenbluts im Verein mit inaktivem Rinderserum zur Wirkung gelangende ist. Nach diesen Autoren enthält also bei der von Ehrlich und Sachs beschriebenen Kombination das Pferdeserum sowohl Ambozeptoren als auch Komplement. Daß das Pferdeserum trotzdem nicht hämolytisch wirkt, liegt nach Bordet und Gay nur daran, daß zum Eintritt der Hämolyse noch die Mitwirkung eines unbekannten, im inaktiven Rinderserum enthaltenen thermostabilen Stoffes, eines „Kolloids“ erforderlich ist*). Dieses Kolloid soll aber erst dann zur Wirkung gelangen, wenn die Blutkörperchen Ambozeptor und Komplement gebunden haben. Dem widerspricht es aber, daß, wie schon Bordet und Gay gefunden haben, Meerschweinchenblut, das mit aktivem Pferdeserum vorbehandelt wurde, sich in inaktivem Rinderserum nicht löst. Dafür suchen Bordet und Gay die bei sukzessivem Zusatz von Pferdeserum und Rinderserum auftretende starke Agglutination verantwortlich zu machen**). Der Bordet-Gayschen Beweisführung kann aber experimentell der Boden entzogen werden, indem man nach dem Vorgang von Sachs und Bauer nachweist, daß Meerschweinchenblut, welches mit aktivem Pferdeserum bei 37° vorbehandelt ist und nunmehr mit inaktivem Rinderserum digeriert wird, letzteres nicht seines wirksamen Bestandteiles beraubt. Die mit Pferde-(Ambozeptor-)Komplement beladenen Meerschweinchenerythrocyten binden aber den Rinderbestandteil nicht.

Für derartige Streitfragen, wie sie hier vorliegen, bei denen es sich also wesentlich um die Entscheidung der Frage handelt, ob zwischen Bestandteilen zweier Sera eine Reaktion vor sich geht, welche zu einem wirksamen Reaktionsprodukt führt, kann sich oft ein von Sachs und Bauer in der behandelten Frage geübtes Vorgehen nützlich erweisen. Wenn nämlich eine Reaktion zwischen zwei Seris eintritt, so muß die zu beobachtende cytotoxische Wirkung rascher erfolgen, wenn die beiden Sera vor dem Blutzusatz einige Zeit gemischt waren. Es handelt sich also dann um eine zeitliche Kontrolle des Eintritts der Hämolyse. Man stellt zwei Versuchsreihen an, digeriert in der einen, um bei dem obigen Beispiel zu bleiben, Gemische von aktivem Pferdeserum und inaktivem Rinderserum etwa eine Stunde bei 37° vor dem Blutzusatz, in der anderen Pferdeserum allein vor dem Zusatz von inaktivem Rinderserum und Blut. Die Hämolyse tritt, wie Sachs und Bauer gezeigt haben,

*) Es sei an dieser Stelle auf die Untersuchungen Manwarings verwiesen, der als „Auxilysine“ thermostabile, die Hämolyse befördernde Serumstoffe beschrieben hat.

**) Über analoge Befunde betreffs des Zusammenwirkens von zwei Substanzen bei der Agglutination vergl. Muir und Browning.

im ersteren Falle weit rascher ein, wodurch auf einem direkten Wege bewiesen ist, daß der von BRODET-GAY supponierte Sachverhalt nicht zutrifft, daß vielmehr in der Tat das Rinderserum einen Ambozeptor enthält, der sich ganz in dem von EHRLICH und SACHS ursprünglich vertretenen Sinne erst mit dem Komplement vereinigt, bevor er mit der Zelle reagiert.

Im Anschluß an die eben erörterten komplizierten Verhältnisse muß noch eines in gewisser Hinsicht analogen Falles gedacht werden, der von BORDET und GAY entdeckt ist. Die tatsächlichen Verhältnisse liegen folgendermaßen: Rinderblut, das mit einem vom Kaninchen gewonnenen spezifischen Ambozeptor digeriert, „sensibilisiert“ ist, löst sich in einem Gemisch von aktivem Pferdeserum und inaktivem Rinderserum, ohne sich in einer der beiden Komponenten zu lösen. Da eine formale Analogie mit der oben beschriebenen Kombination von EHRLICH und SACHS besteht, das Rinderserum aber im Falle des sensibilisierten Rinderblutes nicht als Ambozeptor fungieren kann, zogen BORDET und GAY den Schluß, daß daß Rinderserum auch in der EHRLICH-SACHSschen Kombination nicht den Ambozeptor darstellt. Sie erklärten die Wirkung des Rinderserums bei der Hämolyse des sensibilisierten Rinderblutes durch Pferdeserum in dem gleichen Sinne, den sie für die Hämolyse des Meerschweinchenbluts durch die kombinierte Wirkung der beiden Sera supponierten. SACHS und BAUER haben indessen durch ein ganz entsprechendes methodisches Vorgehen gezeigt, daß auch für die Hämolyse des sensibilisierten Rinderblutes die BORDET-GAYsche Anschauung nicht zu Recht besteht. Durch die Methode des Digerierens der beiden Sera und der Beobachtung des zeitlichen Verlaufes der Hämolyse kann man nämlich auch hier feststellen, daß eine Reaktion zwischen Bestandteilen des aktiven Pferdeserums und des inaktiven Rinderserums stattfindet. Hier kann es sich aber nicht um die Bildung eines cytotoxisch wirksamen Reaktionsproduktes handeln, sondern vielmehr um die eliminierende Bindung einer die Komplementwirkung störenden Komponente des Pferdeserums. Über die Natur dieser Komponente und die Art ihrer Wirkung erhielten SACHS und BAUER einigen Aufschluß durch die Feststellung der Tatsache, daß mit wenig Amboceptor beladenes Rinderblut das Pferdekomplement gleichfalls bindet, ohne aber unter Mitwirkung von Rinderserum gelöst zu werden, daß hingegen die Gegenwart des Rinderserums die Bindung des Pferdekomplements verhindert. Die Prüfung auf Komplementbindung muß dabei, da schwach sensibilisiertes Rinderblut nicht gelöst wird, unter Verwendung von stark sensibilisiertem Rinderblut erfolgen. Man muß aus den mitgeteilten Tatsachen den Schluß ziehen, daß ein (komplementartiger) Bestandteil des Pferdeserums von einem bereits in geringen Ambozeptormengen, also stark konzentriert im Immunserum enthaltenen Ambozeptor gebunden wird und diese Bindung die Verankerung des wirksamen Pferdekomplements an nicht dominanter Stelle zur Folge hat. Das Rinderserum neutralisiert aber diese Komponente des Pferdeserums, so daß das wirksame Komplement von schwach sensibilisiertem Blut nicht gebunden wird, dagegen bei Verwendung von stark sensibilisiertem Blut an einem anderen, nur schwach konzentrierten Ambozeptor an dominanter Stelle zur Wirkung gelangt und dadurch Hämolyse bedingt. Bezüglich näherer Details muß auf die Arbeit von SACHS und BAUER*) verwiesen werden.

*) Es sei auch auf die in der gleichen Arbeit dargestellte schematische Skizzierung der einschlägigen komplizierten Verhältnisse aufmerksam gemacht. Ein Blick auf derartige figürliche Zusammenfassungen der sich darbietenden Erscheinungs-

Weitere Wege zum Nachweise direkter Beziehungen zwischen Ambozeptor und Komplement sind darin gelegen, Modifikationen des Ambozeptors nachzuweisen, in denen nur noch die eine der beiden reaktionsfähigen Gruppen nachweisbar ist. Ist die cytophile Gruppe zerstört, so würde es sich um komplementophile, bei Zerstörung der komplementophilen Gruppe um cytophile „Ambozeptoide" handeln. Der Nachweis der ersteren (komplementophile Ambozeptoide) entspricht dem Nachweis von Antikomplementen. Die Wirkung solcher Ambozeptoide ist analog derjenigen von Ambozeptoren, welche eine relativ hohe Avidität zu Komplementen besitzen, ohne auf die zur Verwendung gelangende Zellart zu wirken. Da, wie schon erwähnt, gerade die Ambozeptoren normaler Sera durch hohe Avidität ihrer komplementophilen Gruppen ausgezeichnet sind, so dürfte der Nachweis von komplementophilen Ambozeptoiden von vornherein aussichtsreicher bei normalen Ambozeptoren erscheinen, wenn nicht gerade mit der Denaturierung der cytophilen Gruppe eine Steigerung der komplementophilen Avidität verknüpft ist, was aber durchaus möglich erscheint. Man wird besonders an das Interferieren derartiger Ambozeptoide denken müssen, wenn eine antikomplementäre Wirkung erst bei Beeinflussungen des Serums in Erscheinung tritt. So sind von P. Th. Müller Befunde beschrieben worden, nach denen die hemmende Wirkung gewisser Sera erst nach dem Inaktivieren wahrgenommen wurde. Besonders aber waren es E. Neisser und Friedemann, die im Anschluß an das von E. Neisser und Döring beschriebene Phänomen der Hemmung der hämolytischen Wirkung des Menschenserums gegenüber Kaninchenblut durch das gleiche bei 56° inaktivierte Serum bei Urämie Befunde erhoben, die sie im Sinne der Bildung von komplementophilen Ambozeptoiden deuteten. Das Serum war nämlich beim Erhitzen auf 51° bereits inaktiv, ohne die Hämolyse zu hemmen, während es, auf 56° erhitzt, antikomplementär wirkte*). Von Bergmann und Keuthe sahen in einem Falle von Karzinom die Hemmung bereits beim Erhitzen auf 51° auftreten. Sie stellten fest, daß die hemmende Wirkung des Serums beim Erhitzen auch dann eintritt, wenn die Ambozeptoren — nach vorheriger Absorption der Komplemente mittels Hefe — durch Kaninchenblut vorher ausgefällt waren. Daraus ziehen sie den Schluß, daß es sich nicht um Ambozeptoide handeln könne, und vertreten die

---

komplexe gestattet es in der Tat, rasch einen Überblick über kompliziertere Phänomene zu gewinnen, ähnlich wie die graphische Darstellung einen gesetzmäßigen Zusammenhang zwischen zahlenmäßigen Versuchsdaten anschaulicher vor Augen führt. Um so verwunderlicher erscheint es, wenn Mouton in einem Referat (Bulletin de l'Institut Pasteur 1908, Nr. 2), das die erwähnte Arbeit behandelt, derartige schematische Darstellungen als überflüssige oder schädliche Spielerei zu charakterisieren bemüht ist, sich allerdings in seinen Argumenten auf ein „il n'est peut-être pas utile" beschränken muß. Vielleicht hätte indes Mouton gerade eine etwas eingehendere Betrachtung der Tafel vor der in einem wesentlichen Teil irrigen Wiedergabe der tatsächlichen Verhältnisse bewahrt. Jedenfalls erscheint es im allgemeinen nur wünschenswert, wenn bei Auffindung neuer Komplikationen, welche bei cytotoxischen Wirkungen interferieren, dem Leser durch schematische Skizzen die Orientierung erleichtert wird.

*) Dieser zuerst für Urämie spezifisch angenommene Befund ist zum Gegenstand zahlreicher Arbeiten gemacht worden. Bei nicht unerheblichen Differenzen der einzelnen Autoren (v. Bergmann und Keuthe, Hedinger, Laqueur, Lüdke, Micheli, Senator, Strauss, Wolze u. a.) hat sich doch als Fazit ergeben, daß das Phänomen weder bei Urämie konstant anzutreffen, noch für diese Krankheit spezifisch ist. Versuche von Laqueur, analoge Verhältnisse im Tierexperiment durch Erzeugung künstlicher Urämie darzustellen, sind fehlgeschlagen. Indes ist es Eva Hoffmann gelungen, das Hemmungsphänomen bei Hunden durch Injektionen

Auffassung, daß die hemmende Wirkung des Serums durch Antikomplemente verursacht sei, die im frischen Serum durch gebundenes Komplement larviert wären und erst beim Erhitzen frei würden. Die Deduktion, daß es sich nicht um Ambozeptoide handeln könne, erscheint allerdings nicht zwingend. Man muß sich nämlich stets bewußt bleiben, daß im normalen Serum eine große Schar verschiedener Ambozeptoren vorhanden ist, und wenn man mit einer bestimmten Zellart absorbiert, so entfernt man nur einen verschwindenden Teil des Ambozeptorvorrats. Prüft man auf cytotoxische Wirkung, d. h. die cytophile Gruppe, mit eben dieser Zellenart, so ist dieser Teil natürlich ausschlaggebend. Prüft man aber die komplementophile Gruppe auf ihre Reaktionsfähigkeit, so dürfte das Fehlen eines so geringfügigen Anteils gleichgiltig sein. Wenn überhaupt Ambozeptoide beim Erhitzen entstehen, so ist ja nur anzunehmen, daß sämtliche Ambozeptoren diese Alteration erfahren. Auch von Bergmann und Keuthe sind sich des hier erörterten Einwandes bewußt gewesen. Der Einwand kann aber wohl nicht ohne weiteres fallen gelassen werden; denn auch die von Bergmann—Keutheschen Ergebnisse sind nach den obigen Auseinandersetzungen mit der Ambozeptoridtheorie konform. Man könnte vielleicht zur weiteren Klärung in der Weise verfahren, daß man bei sukzessivem Erhitzen des Serums den Amborzeptorgehalt durch Bindungsversuche bestimmt (Morgenrothsche Methode zum Nachweise larvierter Ambozeptoren). Findet man dann, daß die Ambozeptorwirkung parallel mit dem Eintritt des Hemmungsphänomens aufhört, so würde das immerhin im Sinne der Ambozeptoridbildung zu sprechen geeignet sein. —

Außer komplementophilen Ambozeptoiden sind noch Modifikationen des Ambozeptors durch einseitige Zerstörung der komplementophilen Gruppen denkbar. Solche „cytophile Ambozeptoide“ müssen sich dadurch nachweisen lassen, daß sie Zellrezeptoren besetzen und dadurch, ohne selbst wirken zu können, dem intakten Ambozeptor den Zugang sperren. Methodisch ist also in der Weise zu verfahren, daß die Blutzellen mit dem Serum, in dem cytophile Ambozeptoide vermutet werden, digeriert und sodann einem wirksamen Ambozeptor-Komplement-Gemisch ausgesetzt werden. Die Hämolyse muß dann ausbleiben, vorausgesetzt, daß es tunlich ist, sämtliche Rezeptoren mit Ambozeptoiden zu besetzen. Dabei ist noch zu bedenken, daß die cytophile Avidität der Ambozeptoide herabgesetzt sein kann, so daß auch beim Vorhandensein cytophiler Ambozeptoide ihr Nachweis durch die höhere Avidität der intakten Ambozeptoren vereitelt wird. E. Neisser und Friedemann halten nach ihren Beobachtungen die Bildung cytophiler Ambozeptoide nicht

von Urannitrat zu erzielen, allerdings auch durch parenterale Einverleibung von artfremdem Eiweiß, so daß Hoffmann diese Eigenschaft des Serums allgemein als Ausdruck einer chronischen Schädigung der Körperzellen auffaßt. Von Bergmann und Savini haben jüngst beschrieben, daß man die hemmende Fähigkeit des Serums bei Kaninchen auch durch experimentelle Phosphorvergiftung und durch Hunger erzeugen kann. Sie fanden dabei die hemmende Wirkung des Serums parallell gehend mit der unter diesen Umständen schon von anderen Autoren beobachteten Komplementverarmung. Es erscheint diesen Autoren nunmehr wahrscheinlich, „daß eine Fülle der verschiedensten Antigene, die sonst nicht in die Zirkulation gelangen, bei den verschiedensten Krankheiten im Organismus zirkulieren und dadurch Antikörper auslösen, die bei Vorhandensein des Antigens sich direkt, sonst erst bei Zusatz des Antigens in vitro nachweisen lassen.“ Zur Stütze dieser Anschauung dienen v. Bergmann und Savini Versuche, in denen sie eine Komplementbindung erzielten durch das Zusammenwirken nichthemmender Dosen des Serums und des Leberextraktes von durch Phosphor vergifteten Kaninchen.

für unwahrscheinlich, und Morerchi berichtet über die Bildung cytophiler Ambozeptoide aus den isolytischen Ambozeptoren des Menschenserums durch Erhitzen auf 55°.

Schließlich gehört zu den Methoden, welche über die Beziehungen zwischen Ambozeptor und Komplement Aufschluß geben, noch die Analyse über die quantitativen Verhältnisse, welche in bezug auf Ambozeptormenge und Komplementbedarf und umgekehrt bestehen. Schon v. Dungern erkannte, daß bei einem Ambozeptorüberschuß eine erheblich geringere Komplementmenge zur kompletten Hämolyse hinreicht, als bei der für eine große Komplementmenge ermittelten Ambozeptoreinheit erforderlich ist. Weitere Beobachtungen in dieser Hinsicht erwähnte dann Gruber und Morgenroth und Sachs haben dieses Problem eingehend analysiert. Dabei stellte es sich heraus, daß die Verhältnisse je nach der herangezogenen Kombination außerordentlich schwankten. Am ausgesprochensten erwies sich die Herabsetzung des Komplementbedarfs bei Steigerung der Ambozeptormenge für den von Ziegen gewonnenen Immunambozeptor für Hammelblut unter Verwendung von Meerschweinchenserum als Komplement. Hier variierten die erforderlichen Komplementmengen bis zu einem zwanzigfachen Multiplum. Bei Verwendung der vom Kaninchen gewonnenen Ambozeptoren für Rinderblut hatte die Relation weit engere Grenzen, indem die Komplementmenge maximal auf den 5.—6. Teil, und dies schon bei einem geringfügigen Ambozeptorüberschuß herabgesetzt wurde. Ähnlich verhielt sich der zuerst genannte Ambozeptor bei Komplettierung durch Hammel- oder Pferdeserum. Für einen dritten Ambozeptor endlich, Immunserum für Rinderblut von der Ziege, war der Komplementbedarf unabhängig von der Ambozeptormenge. Die Verhältnisse liegen also durchaus nicht einheitlich, und Morgenroth und Sachs haben daher verschiedene Momente zur Erklärung herangezogen. Ohne auf diese hier näher einzugehen, sei nur erwähnt, daß im wesentlichen auf folgende Faktoren Rücksicht zu nehmen ist:

1. die Bindungskapazität der Erythrozyten;
2. die Vielheit der Ambozeptoren;
3. die Avidität der komplementophilen Gruppen;
4. die Verhältnisse der Massenwirkung.

Arrhenius will allein das zuletzt angeführte Moment gelten lassen. Er berechnete die quantitativen Verhältnisse, welche sich auf Grund der Annahme einer reversiblen Reaktion zwischen Ambozeptor und Komplement ergeben, und fand in der zur Wirkung gelangenden Hämolysinmenge gute Übereinstimmung zwischen Versuchsbefund und Berechnung. Arrhenius erblickt darin einen entscheidenden Beweis für die Richtigkeit der Ambozeptortheorie und nimmt an, daß Ambozeptor und Komplement sich innerhalb der roten Blutkörperchen zum Hämolysin vereinigen. Man wird allerdings dieses nur auf rein formalem Analogieschluß basierende Beweisglied ebenso wenig als zwingend anerkennen können, wie die aus den gleichen Berechnungen von Arrhenius gezogene Schlußfolgerung, daß die beobachtete Hämolyse das Resultat einer zwischen einheitlichem Ambozeptor und einheitlichem Komplement sich abspielenden Reaktion ist. —

6. Mechanismus der Ambozeptorwirkung.

Wenn wir nach den gegebenen Darlegungen den Mechanismns der Cytotoxinwirkung präzisieren, so wird dem gegenwärtigen Stande der

Forschung etwa folgende Zusammenfassung gerecht, die als Leitfaden für das methodische Vorgehen gelten kann:

Der Ambozeptor geht mit dem Komplement eine Verbindung ein, die mehr oder weniger dissoziiert ist, oft in dem Maße, daß die Menge des gebildeten Reaktionsproduktes unterhalb der Schwelle der Nachweisbarkeit liegt. Man darf annehmen, daß im allgemeinen die cytophile Avidität der entstandenen Ambozeptor-Komplement-Komplexe eine höhere ist, als die der freien Ambozeptoren. Ganz besonders trifft dies für eine große Reihe von Ambozeptoren der normalen Sera zu, deren cytophile Avidität oft zu einer nachweisbaren Reaktion nicht ausreicht und erst nach der Verbindung mit dem Komplement manifest wird. Bei den Immunambozeptoren ist aber in der Regel die Avidität der cytophilen Gruppen genügend groß, um mit ziemlicher Energie mit der Zelle zu reagieren. Mit der Bindung des Ambozeptors an die Zelle ist eine Steigerung der komplementophilen Avidität verknüpft, welche eine ergiebige Bindung der Komplemente ermöglicht. Diese Verankerung der Komplemente bezieht sich dann in den meisten Fällen nicht nur auf das im gegebenen Fall zur Wirkung gelangende „dominante“ Komplement, sondern auf den gesamten Komplementvorrat, die „nicht dominanten“ Komplemente. Indes kann durch eine isolierte Besetzung des Ambozeptors an dominanter oder nicht dominanter Stelle ein Einfluß auf die übrige Reaktionsfähigkeit im positiven oder negativen Sinne ausgeübt werden.

Was die Charakterisierung und die Spezifität der Ambozeptoren anlangt, so kennen wir zwei Merkmale, welche den Ambozeptor als spezifisch charakterisieren:

1. die Tierart, von welcher der Ambozeptor stammt,
2. das Antigen, durch welches er erzeugt ist, oder auf welches er wirkt. —

Anhang.

Zum Schluß dieses Kapitels sei noch auf den Versuch von Liebermanns, die Natur der Ambozeptoren zu ergründen, verwiesen. Ausgehend von der Anschauung, daß die Ambozeptoren säureartige Körper sind, hat v. Liebermann sie zu isolieren gesucht. Nach seinen Angaben kann man die Ambozeptoren aus ambozeptorbeladenen Blutzellen durch Behandeln mit $^1/_{100}$ normal Salzsäure extrahieren. Wenn auch K. Meyer diese Resultate nicht erhielt und v. Eisler prinzipielle Bedenken gegen die Säurenatur der Ambozeptoren äußert, so haben v. Liebermann und v. Fenyvessy doch neuerdings mitgeteilt, daß man durch Digerieren der ambozeptorbeladenen Blutzellen mit $^1/_{100}$ Normalsalzsäure einen Extrakt erhält, der nach Entfernung der beim Neutralisieren ausfällenden Niederschläge und Ausschütteln mit Äther bei saurer Reaktion eine absolut farblose, klare Flüssigkeit ergibt, welche Ambozeptoren und Agglutinine enthält, ohne Eiweißreaktionen zu geben*).

Bemerken möchte ich, daß nach Untersuchungen, mit denen Herr Dr. Rondoni beschäftigt ist, und über welche ich in der zweiten Tagung

*) In einer soeben erschienenen Arbeit wendet sich v. Liebermann gegen die Ausführungen v. Eislers und präzisiert ihnen gegenüber seinen Standpunkt dahin, daß die Wirkung der Ambozeptoren nicht eine allgemeine Säurewirkung sei, sondern die Wirkung eines als schwache Säure gedachten Körpers von besonderen Eigenschaften, der auch, in Form einer salzartigen Verbindung zugegen, zur Wirkung gelangen kann.

der Freien Vereinigung für Mikrobiologie in Berlin vorläufig berichtet habe, es gelingt, an Hammelblut gebundene Immunambozeptoren von Kaninchen durch Digerieren mit $^{1}/_{200}$ Normalnatronlauge zu extrahieren, ohne daß dabei Hämolyse eintritt.

Was Versuche über die chemische Natur der hämolytischen Ambozeptoren anlangt, so sei noch auf die älteren Arbeiten von Landsteiner, Fuhrmann, Quinan verwiesen. Sie gehen davon aus, daß die Ambozeptoren eiweißartiger Natur sind, und beschäftigen sich im wesentlichen mit der Frage, zu welcher Eiweißfraktion sie gehören. K. Meyer, der neuerdings Untersuchungen darüber angestellt hat, gelangt zu folgenden Schlüssen:

„1. Die Löslichkeitsverhältnisse des hämolytischen Immunkörpers sprechen gegen seinen Lipoidcharakter.

2. „Seine Zerstörbarkeit durch Pankreasferment deutet auf seine Eiweißnatur.

3. „Sein Verhalten gegen chemische Reagentien spricht nicht gegen seinen Eiweißcharakter.

4. „In seinem amphoteren Verhalten gegenüber elektropositiven und elektronegativen Kolloiden, resp. Suspensionen folgt er den Eiweißkörpern.

5. „Er ist an den Globulinanteil des Blutserums gebunden; innerhalb dieses ist eine weitere Beschränkung auf einzelne Fraktionen weder durch Dialyse noch durch Ammonsulfatfällung möglich.

6. „Beim Eintrocknen ändern sich seine Löslichkeitsverhältnisse.“

E. Komplemente*).

Die Komplemente sind Stoffe des normalen Blutserums, welche bei der Cytotoxinwirkung insofern die wesentliche Komponente darstellen, als sie — einmal gebunden — auch zur Wirkung gelangen, während der Ambozeptor auch nach seiner Bindung an die Zelle eine Schädigung auf dieselbe nicht ausübt, wenn nicht ein geeignetes Komplement in Aktion tritt. Dieser durch die vermittelnde Funktion des Ambozeptors determinierte Wirkungsmechanismus muß auch das Entscheidende für die Definition des Komplementes bleiben. Die früher als durchgreifendes differenzierendes Prinzip betrachtete Thermolabilität kann diesen Anspruch nicht mehr erheben, seitdem man eine Reihe von normalen Ambozeptoren kennen gelernt hat, welche an Thermoresistenz die Komplemente nicht wesentlich oder gar nicht übertreffen. Dagegen ist die relative Labilität für die hämolytischen Komplemente doch eine sehr allgemeine Eigenschaft, wenn man von einigen bisher bekannten Ausnahmen absieht. Von den letzteren sind zu nennen das von Ehrlich und Morgenroth im Serum einiger Ziegen, aber nicht aller, aufgefundene bei 56° thermostabile Komplement, und Beobachtungen von Remy sprechen in gleicher Richtung. Im allgemeinen kann man aber sagen, daß eine die Temperatur von 55°—56° übersteigende Thermostabilität es in hohem Maße unwahrscheinlich macht, daß es sich um ein Komplement handelt. Dagegen schließt Thermolabilität die Ambozeptornatur nicht aus. Die Thormolabilität ist bei den Komplementen, wie zahlreiche Beobachtungen lehren, in sehr verschiedenem Grade vorhanden. Diejenigen Komplemente, welche Ambozeptoren der normalen Sera aktivieren, weisen in der Regel eine höhere Labilität auf als die Komplemente für die Immun-

*) Synonyma: Alexin, Cytase (Addiment).

ambozeptoren. Den höchsten Grad der Thermolabilität scheinen nach den Untersuchungen NOGUCHIS und LAZARS die Komplemente der Kaltblüter zu besitzen, indem bereits Temperaturen von 45°—50° eine vollständige Inaktivierung verursachen.

1. Vorkommen und Nachweis der Komplemente.

Die Komplemente sind Bestandteile des normalen Organismus. In größter Menge vorhanden und am leichtesten nachzuweisen sind sie in der Blutflüssigkeit, und es ist daher am einfachsten, wie dies allgemein geschieht, das Blutplasma oder das Blutserum als komplementhaltiges Reagens zu benutzen. Das Blutsereum ist natürlich im allgemeinen durch die einfachere Technik der Gewinnung und Konservierung zu bevorzugen. Nach neueren Untersuchungen von GAY, die an menschlichen Leichen angestellt sind, kann man die Komplemente auch ungeschwächt mindestens noch nach 3 Tagen im Blutserum von Leichen nachweisen, wenn letztere bei 0° gehalten werden. Der Komplementgehalt wurde sogar zuweilen höher als beim Lebenden gefunden, was GAY mit dem postmortal erfolgenden Leukocytenzerfall in Beziehung bringt.

Außerdem sind Komplementwirkungen nachgewiesen in Transsudaten, Exsudaten und in der Lumbalflüssigkeit. BERGEL fand hämolytische Komplemente (auch Ambozeptoren) im Fibrin; bakterizide Komplementwirkungen des Fibrins wurden schon früher von OTTOLENGHI beschrieben. Nach PFAUNDLER und MORO sollen auch in der Milch hämolytische Komplemente vorkommen. Dagegen enthält der Humor aquens der vorderen Augenkammer normaler Weise keine Komplemente. Indes haben SWEET und RÖMER in der nach Entfernung des Humor aquens in die vordere Augenkammer sich ergießenden Flüssigkeit Komplemente nachgewiesen (RÖMER übrigens auch Ambozeptoren).

Zum Nachweis der Komplemente ist natürlich eine genaue Kenntnis der antikomplementären Wirkungen, welche interferieren können, erforderlich. Dieselben werden im folgenden Kapitel gesondert besprochen werden. Der qualitative Nachweis ist insofern einfach, als jede thermolabile hämolytische Serumwirkung das Vorhandensein von Komplement im höchsten Grade wahrscheinlich macht.

Zum strikten Beweis ist allerdings noch die komplexe Konstitution erforderlich, deren Nachweis früher eingehend erörtert wurde. Indes wird man auf Grund der bisherigen Empirie hämolytische Serumwirkungen, welche thermolabil sind, besonders in der höheren Tierreihe von vornherein mit größter Wahrscheinlichkeit auf komplexe Hämolysine, also in letzter Instanz auf Komplemente zurückführen dürfen. Bisher ist der Nachweis der komplexen Konstitution bei dem Hämolysin des Aalserums nicht gelungen, und FRIEDBERGER und SEELIG berichteten neuerdings über die Hämolysine des Froschserums, die als komplex in keiner Weise zu erweisen waren. FRIEDBERGER und SEELIG sprechen daher das Hämolysin des Frosches, nachdem ihnen die immunisatorische Erzeugung von Antilysinen gelungen ist, als ein echtes Hämotoxin an. Man wird ja allerdings einwenden können, daß die komplexe Konstitution bei positivem Ausfall einer Differenzierungsmethode zwar ohne weiteres erwiesen, aber bei negativem Ausfall aller methodischen Hilfsmittel nicht auszuschließen ist. Auch der von FRIEDBERGER und SEELIG herangezogene Umstand, daß bereits ein relativ geringfügiger Überschuß von Frosch-

serum die neutralisierende Wirkung des antilytischen Serums vereitelt, dürfte nicht ganz stichhaltig sein. Zwar ist nicht zu erwarten, daß eine so geringe Vermehrung von Eiweißantigen eine etwaige Komplementablenkung bereits aufhebt, aber es ist zu bedenken, daß mit der Steigerung des Eiweißantigens auch gleichzeitig Komplement vermehrt wird, und so könnte man die Aufhebung der Komplementablenkung durch Komplementüberschuß wohl verstehen*). In der Tat hat LAZAR in einer früheren Arbeit auch die hämolytischen Stoffe des Froschserums als komplexe Hämolysine aufgefaßt. Er inaktivierte Froschserum durch Erhitzen auf 45° und konnte dann durch Zusatz von frischem, nicht hämolytischen Froschserum eine Aktivierung erzielen, während sich Warmblütersera zur Komplettierung ungeeignet erwiesen.

Was nun die quantitative Bestimmung der Komplemente anlangt — und auf diese kommt es ja bei wissenschaftlichen und praktischen Untersuchungen wesentlich an —, so muß man sich an erster Stelle daran erinnern, daß der Grad der Komplementwirkung abhängig ist von der vorhandenen Ambozeptormenge. Die Wahl der Ambozeptormenge muß dem jeweilig vorliegenden Bedürfnis angepaßt werden. Handelt es sich um quantitative Untersuchungen über den Komplementgehalt und seine Veränderung bei verschiedenen Maßnahmen, so wird man meist mit einem Überschuß von Ambozeptor vorteilhaft arbeiten. Dadurch bietet sich ein größerer Spielraum, Schwankungen im Komplementgehalt nach oben und nach unten zu überschauen, und außerdem ergibt sich eine größere Sparsamkeit im Verbrauch der komplettierenden Sera. Unter letzteren wird das Meerschweinchenserum besonders bevorzugt, einerseits wegen seines starken Komplementgehalts, andererseits wegen des meist sehr geringen Vorrats an normalen Ambozeptoren. Benutzt man Rinder- oder Hammelblut und die dazu gehörigen von Kaninchen gewonnenen Immunsera als Ambozeptoren, so kann die Komplementwirkung des Meerschweinchenserums bei 1 ccm 5% Blut um das 10—20fache variieren. Wird gerade mit der Ambozeptoreinheit gearbeitet, so beträgt die minimale komplett lösende Dosis des Meerschweinchenserums meist 0,1—0,05 ccm. Bei einer Steigerung auf 10—20 Ambozeptoreinheiten kann aber die minimale komplettierende Dosis auf 0,01—0,005 ccm heruntergehen. Trotzdem empfiehlt es sich aus später zu erörternden Gründen dann, wenn es sich um den Nachweis von antikomplementären Wirkungen (Komplementbindung) handelt, mit einer geringen Ambozeptormenge (etwa 1,5—2,0 Ambozeptoreinheiten) zu arbeiten. Es ist dann zwar eine größere Komplementmenge erforderlich, die antikomplementären Wirkungen sind aber meist in ihrer Stärke der Ambozeptormenge umgekehrt proportional (vergl. MORGENROTH und SACHS). Als Grenzwerte der komplementären Wirkungen empfiehlt es sich, wie bei der Bestimmung hämolytischer Wirkungen überhaupt, die komplette und eventuell die eben noch nachweisbare Hämolyse in Betracht zu ziehen. Kolorimetrische Bestimmungen bei partieller Hämolyse dürften nur in besonderen Fällen am Platze sein.

Es ergibt sich ohne weiteres aus der komplexen Konstitution der Hämolysine, daß eine einfache Bestimmung der hämolytischen Funktion von Blutseris ohne Zwischenschaltung von Ambozeptoren einen Einblick

---

*) Es sei an dieser Stelle noch auf die interessante Entdeckung FRIEDBERGERS und SEELIGS hingewiesen, daß entleberte Frösche einen fast vollständigen Schwund des im Serum enthaltenen Hämotoxins aufweisen.

in den wirklichen Komplementgehalt der Sera nicht gewähren kann. Denn die hämolytische Wirkung der nativen Sera ist nicht nur der Ausdruck der vorhandenen Komplementmenge, sondern in gleichem Maße eine Funktion des Ambozeptorvorrates. So muß natürlich beim Fehlen geeigneter Ambozeptoren die Hämolyse trotz Anwesenheit von Komplement ausbleiben, und ebenso kann eine Verstärkung der hämolytischen Wirkung lediglich durch Vermehrung der Ambozeptoren bedingt sein. Endlich kann sogar beim Gleichbleiben der hämolytischen Wirksamkeit eine Verschiebung im Sinne einer Komplementvermehrung und Ambozeptorverarmung oder umgekehrt stattgefunden haben. Trotzdem wird die einfache Bestimmung der hämolytischen Serumwirkung, des „hämolytischen Blankwertes“, wie es Moro nennt, zur vorläufigen Orientierung oft geboten und im Interesse einer Ersparnis an Material und Zeit nicht zu umgehen sein. Nur dürfen aus einer Erhöhung oder Verminderung des hämolytischen Blankwertes nicht ohne weiteres Rückschlüsse auf Komplementschwankungen gezogen werden. Um eine Interferenz der Ambozeptoren auszuschließen, muß man dann eine reichliche Ambozeptormenge gesondert hinzufügen. Hierfür sind, wenn tunlich, Immunambozeptoren geeignet. Das auf Komplementgehalt zu prüfende Serum darf aber dann nicht Normalambozeptoren für die benutzte Erythrocytenart enthalten oder wenigstens nicht in merklicher Menge. Es resultiert sonst eine Fehlerquelle, auf die Moro letzthin besonders hingewiesen hat. Es konkurrieren dann nämlich zwei Komplementwirkungen, von denen die eine den Immunambozeptor, die andere den Normalambozeptor des Komplement liefernden Serums betrifft. Wenn die letztere überwiegt, so ist die komplementierende Kraft wiederum von dem Gehalt an Normalambozeptoren abhängig. Man muß also entweder die hämolytischen Systeme derart wählen, daß Ambozeptoren des kompletierenden Serums nicht in Betracht kommen, oder aber man muß die Normalambozeptoren in konstanter reichlicher Menge zusetzen, indem man das gleiche Serum, inaktiviert oder auf irgend eine Weise der Komplemente beraubt, als Ambozeptor heranzieht. Handelt es sich um den Nachweis von Komplementschwund beim Erhaltensein der Ambozeptoren, so ist die Gegenwart letzterer auf die im Kapitel „Ambozeptoren“ erörterte Weise nachzuweisen. Besonders wird es sich dabei darum handeln, isolierte Komplemente durch Kältetrennung zu gewinnen oder die Komplettierung durch minimale nicht lösende Dosen des normalen Serums zu erzielen, vorausgesetzt, daß das Serum einen Komplementüberschuß enthält, oder aber als Komplemente fötale Sera zu verwenden, die meist durch Ambozeptormangel ausgezeichnet sind.

Für Versuche am Menschen und die Zwecke der Klinik bilden oft die nur spärlich zur Verfügung stehenden Blutmengen eine gewisse Kalamität. Trotzdem dürften in den meisten Fällen die Serummengen zu einem kurzen Reihenversuch und zur Bestimmung der minimalen komplettlösenden Dosis ausreichen. Man kann sich leicht durch die Verwendung sehr geringer Blutkörperchenmengen (etwa 0,1 ccm einer 5 %igen Aufschwemmung) helfen. Auch ist selbst, wie ich mich wiederholt überzeugen konnte, die Anstellung von hämoytischen Reihenversuchen nach dem zu anderem Zwecke von Wright geübten Vorgang ausführbar. Man bestimmt dazu willkürlich an dem Ende einer lang ausgezogenen Kapillare durch eine Markierung eine beliebig zu wählende Maßeinheit, mischt die einzelnen abgemessenen Komponenten auf einem

Objektträger und nimmt dann den der Maßeinheit entsprechenden Teil der Mischung in der Kapillare als erstes Glied der Reihe auf. Durch Zwischenschaltung von Luftblasen gelingt es dann, in einer Kapillare eine ganze Reihe von einzelnen Gliedern anzulegen und so auch mit sehr geringem Material auszukommen, Die Kapillare wird dann zugeschmolzen und kommt in den Thermostaten.

Obwohl Reihenversuche stets wegen der weit größeren Exaktheit zu bevorzugen sein dürften, wird von vielen Autoren, besonders in der Klinik, die Komplementbestimmung doch mit einer einheitlichen Serummenge geübt. Man sucht dann die quantitative Bestimmung entweder durch die Beobachtung des zeitlichen Verlaufes der Hämolyse zu ersetzen, indem man die Reaktionsgeschwindigkeit als eine Funktion der vorhandenen Komplementmenge betrachtet, oder man ermittelt den Grad der Komplementwirkung durch kolorimetrische Bestimmung des gelösten Hämoglobins oder der in dem ungelösten Blutkörperchenrest zurückgebliebenen Hämoglobinmenge. In letzterer Hinsicht sei auf die Arbeiten Moros verwiesen, der sich besonders bemüht hat, die Komplementbestimmung für die Zwecke der Klinik auszuarbeiten. Moro verfährt dabei nach dem Sahlischen Prinzip der kolorimetrischen Hämoglobinbestimmung, indem er das ungelöste Blutkörperchensediment in $^1/_{10}$ Normalsalzsäure aufnimmt und den Farbstoff dadurch in salzsaures Hämatin überführt. Die Nuancen der braunen Farbe des salzsauren Hämatins sollen leichter zu beurteilen und dauerhafter sein, als der rubinrote, leicht veränderliche Farbenton des Hämoglobins.

Schließlich sei auch an dieser Stelle auf eine störende Interferenz hingewiesen, welche die Anwesenheit von Komplementen verdecken kann. Wenn nämlich das als Ambozeptor zugesetzte Serum außerdem antikomplementär wirkende Stoffe enthält, so kann natürlich trotz der Gegenwart von Komplementen im aktivierenden Serum die Hämolyse ausbleiben. Man kann diese Fehlerquelle dadurch vermeiden, daß man die Blutkörperchen mit dem ambozeptorhaltigen Serum vorbehandelt und die störenden Serumbestandteile durch Zentrifugieren entfernt. Jedoch wird es bei Verwendung normaler Ambozeptoren wegen deren oft nur geringen oder fehlenden Reaktionsfähigkeit Fälle geben, in denen dieses Verfahren nicht angängig ist. Die antilytische Beeinflussung der Komplementwirkungen wird im übrigen in einem späteren Kapitel ausführlich erörtert werden.

2. Konservierung und Inaktivierung.

Da die Komplemente sehr labile Stoffe sind, so ist eine geeignete Konservierung der komplettierenden Sera von größter praktischer Bedeutung. Es handelt sich hauptsächlich darum, Licht und Wärme fernzuhalten. Ersterer Faktor ist ohne weiteres zu vermeiden. Um den Einfluß der Wärme auszuschalten, ist es nach den Erfahrungen des Frankfurter Institutes für experimentelle Therapie (vergl. Morgenroth) am geeignetsten, die Sera im gefrorenen Zustande aufzuheben. Wenn maschinelle Einrichtungen zur Erzielung von Kühlkammern von niedriger Temperatur fehlen, so kann der nach den Angaben von Morgenroth durch F. und M. Lautenschläger (Berlin) hergestellte Apparat „Frigo“ einen hinreichenden Ersatz bieten. Einer Temperaturverminderung nach unten ist keine Grenze gesetzt, da die Untersuchungen von Petrie und Lüdke gezeigt haben, daß selbst bei der Temperatur der flüssigen Luft

eine Schädigung der Komplemente nicht eintritt. Die Konservierung im gefrorenen Zustande kommt natürlich nur bei längerer Aufbewahrung der Sera in Betracht. Für ein- bis zweitägigen Gebrauch genügt in der Regel das Lagern auf Eis.

Eine weitere Konservierungsmethode, die sich an ältere, aber mit der komplexen Konstitution der Cytotoxine noch nicht rechnende Versuche BUCHNERS anschließt, verdanken wir den Arbeiten FRIEDBERGERS. Das Prinzip der Methode beruht auf dem konservierenden Einfluß eines erhöhten Salzgehaltes. Durch die Besalzung findet eine Erhöhung der Resistenz gegenüber der schädigenden Wirkung des Lichtes, des Lagerns bei Zimmer- oder Körpertemperatur, sowie chemischer Substanzen (Phenol), aber nicht gegenüber höheren Temperaturen statt. Die optimale konservierende Wirkung wird nach FRIEDBERGER, namentlich bei Zimmer- und Eisschranktemperatur, durch einen Kochsalzzusatz von 6—8 % erzielt Für die Praxis empfiehlt sich 8 % Kochsalz zuzusetzen, so daß das Serum dann bei 10fachem Verdünnen mit destilliertem Wasser gebrauchsfähig ist. Dabei zeigte sich übrigens die merkwürdige Erscheinung, daß das Komplement, welches durch einen entsprechenden Salzzusatz lange Zeit erhalten war, beim Verdünnen auf den isotonischen Salzgehalt sehr rasch vollständig aus dem Serum verschwand. Andererseits wurden die Komplemente in Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung besser erhalten als im unverdünnten Serum.

Eine gewisse Komplementkonservierung erreichte FRIEDBERGER auch durch das Eintrocknen der Sera. Zwar nimmt der Komplementgehalt während des Eintrocknens, auch im Exsikkator ab, aber der noch immer nicht unerhebliche Rest des Komplementgehaltes im getrockneten Serum hält sich dann sehr lange. Die Komplemente der getrockneten Sera erwiesen sich gegenüber der Einwirkung höherer Temperaturen (64° durch 1½ Stunde) außerordentlich resistent.

Die Erklärung der konservierenden Wirkung erhöhter Salzkonzentration und des Eintrocknens erblickt FRIEDBERGER in einer Hemmung der Tätigkeit des von SACHS und TERUUCHI im Serum supponierten Komplement zerstörenden Fermentes.

Was die Methoden der Inaktivierung anlangt, so ist das auf der Thermolabilität der Komplemente basierende Verfahren des Erhitzens das wichtigste und gebräuchlichste. Genauere Untersuchungen über die Inaktivierungstemperatur (relatives Verhältnis von Zeit und Wärmegrad) rühren von MANWARING, sowie von FAMULENER und MADSEN her.

Ebenso wie Licht und Wärme wirken eine Reihe auch sonst schädlicher Agentien zerstörend auf die Komplemente. So können die Komplemente durch Säure (EHRLICH und MORGENROTH), sowie durch Alkali (EHRLICH und SACHS) dauernd inaktiviert werden. Über die erforderliche Alkali- und Säurekonzentration läßt sich nichts Bestimmtes sagen. Sie muß umso höher sein, je konzentrierter das Serum zur Verwendung gelangt, da ein Teil der Säure resp. des Alkalis durch das Serumeiweiß entzogen wird.

v. LIEBERMANN gibt an, daß die Hydroxylionenkonzentration der Sera beim Inaktivieren nicht unerheblich gesteigert wird*), weist aber

---

*) In Bezug auf Veränderungen der Reaktionsfähigkeit des Serums in physikalischer Hinsicht beim Inaktivieren, die offenbar mit der Alkaleszenzsteigerung im Zusammenhang stehen, sei auf die Arbeiten von DIEUDONNÉ und MOLL (Globulinvermehrung und Alkalialbuminatbildung), CERNOVODEANU und HENRI (Fällung durch kolloidales Eisenhydrat), SACHS und ALTMANN, CITRON (Einwirkung des destilierten Wassers, KLAUSNERsche Reaktion), TOYOSUMI (Ausflockung des Lecithins), sowie SACHS (Säurefällung) verwiesen.

gleichzeitig nach, daß dieser Umstand nicht für die Inaktivierung der Komplemente in der Wärme verantwortlich gemacht werden kann. Zusatz von Säure zum inaktivierten Serum führt nicht zu einer Restitution der komplettierenden Wirkung. Die Alkaleszenzzunahme beim Erhitzen bestätigt Seligmann durch einfache titrimetrische Bestimmungen, gelangt aber ebensowenig zu einer Reaktivierung durch Säurezusatz. Die Alkaleszenz steigt nach Seligmann auch beim einfachen Lagern. Die Tatsache, daß die Sera nach dem Inaktivieren hemmende Funktionen annehmen, sucht Seligmann auf physikalische Momente zurückzuführen. Nach Traube wird beim Inaktivieren der Sera die Oberflächenspannung erniedrigt; die chemische Seite des Vorganges sieht er in erster Linie in einer Hydrolyse gelegen.

Systematische Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Säuren und Alkalien rühren von Noguchi her. Nach Noguchi kann die Wirkung der durch Säure und Alkali inaktivierten Komplemente bei der Neutralisation gänzlich oder teilweise wieder hergestellt werden. Nach Hecker inaktivieren größere Säure- und Alkalikonzentrationen dauernd, geringere Alkalikonzentrationen bedingen eine beim Neutralisieren reversible Modifikation (Versuche mit Salzsäure und Natronlauge). Nach v. Liebermann wäre die beim Neutralisieren umkehrbare hemmende Wirkung der Natronlauge allerdings durch eine Einwirkung auf den Ambozeptor bedingt, was durch v. Eisler bestritten wird.

Was den Einfluß der Neutralsalze anlangt, so ist bereits durch Nolf, Markl, Ehrlich und Sachs der die Komplementwirkung hemmende Einfluß einer erhöhten Salzkonzentration bekannt. Es handelt sich dabei um eine „antireaktive" Funktion der Salze, indem die Vereinigung von Ambozeptor und Komplement gehindert ist. Durch einfaches Verdünnen mit Wasser gelingt es, wie Sachs gezeigt hat, die Komplementwirkung wieder zu restituieren. Daß die erhöhte molekulare Konzentration an sich nicht zerstörend auf die Komplemente wirkt, ergibt sich ja bereits aus dem von Friedberger beschriebenen konservierenden Einfluß der Salze. Auch Manwaring beschreibt, daß nach Ausfällung der hemmenden Salze die Komplementwirkung wieder hergestellt ist. Indessen verhalten sich äquimolekulare Lösungen verschiedener Salze in dem Grade ihrer hemmenden Wirkung recht verschieden.

Hektoen und Ruediger beschreiben eine besonders starke antilytische Wirkung der Calcium-, Barium- und der SO_4-Ionen. Sie sehen die Ursache für diese Funktion der Salze, wie auch Manwaring in einer Reaktion zwischen Salzen resp. Ionen und Komplementen, welche zu unwirksamen Komplexen führt. Auch Friedberger sah eine verschiedene Begünstigung der Komplementkonservierung durch die einzelnen Salze. Außer dem Kochsalz gestaltete sich der konservierende Effekt bei Kaliumsulfat, Kaliumoxalat, Kaliumacetat, Kaliumnitrat, sowie bei Kaliumchlorid am günstigsten. Zerstörend wirkten nach Friedberger Magnesiumsulfat, Chlorcalcium, Kaliumjodat, Natriumjodat, Baryumchlorid; dabei ist jedoch zu bemerken, daß bei Friedberger die Salze nicht entfernt, sondern nur durch Verdünnen mit Wasser auf den isotonischen Gehalt gebracht wurden. Nach Cernovodeanu und Henri sollen kleine Mengen von Magnesiumsalzen die hämolytische Kraft mancher Sera steigern. Noguchi, der eine Reihe systematischer Untersuchungen mit einer Reihe der verschiedensten Salze in äquimolekularer Form durchgeführt hat, gelangt zu folgenden Angaben: „Salze von starken Säuren und starken Basen wirken nicht hemmend, außer

wenn ihre Konzentration $^1/_1$ normal nahezu erreicht; in $^1/_8$ Normallösung wirken sie auf ein Komplement nicht inaktivierend. Salze starker Säuren und schwacher Basen und Salze schwacher Säuren und starker Basen inaktivieren in $^1/_{10}$ Normal- oder sogar in schwächeren Lösungen. Calcium- und Baryumsalze haben die stärkste hemmende Wirkung auf Komplemente. Salze von schwachen Säuren und schwachen Basen besitzen keine inaktivierende Eigenschaft.

Der weiteren Angabe NOGUCHIS*), daß gewisse lösliche Ölseifen die Wirkung der Komplemente erhöhen, scheinen Befunde von SACHS und ALTMANN über die antikomplementäre Wirkung des ölsauren Natrons zu widersprechen. Auch NOGUCHI gibt an, daß die durch Salze inaktivierten Komplemente nach Entfernen der hemmenden Salze (bei Calcium- und Barniumsalzen durch Hinzufügen von Natriumkarbonat) die kompletierende Funktion, wenn auch unterhalb der ursprünglichen Höhe wieder erlangen, und auch GENGOU berichtet, daß die im BORDETschen Institut entdeckte, die Komplementbindung verhindernde Wirkung des Natriumcitrats durch Zusatz von Kalksalzen aufgehoben wird. In gleichem Sinne sprechen die von v. DUNGERN und COCA mit Barium-, Calcium- und Magnesiumsalzen erhobenen Befunde. Diese Autoren beziehen die Wirkung dieser Salze auf eine Hemmung der Reaktionsfähigkeit zwischen Komplement und ambozeptorbeladenen Blutzellen (vergl. auch RUFFER und CRENDIROPOULO).

Im Gegensatz zu der konservierenden Wirkung einer erhöhten Salzkonzentration hat es sich gezeigt, daß Salzarmut oder gar Salzmangel des Mediums die Komplementwirkung aufhebt. Nachdem bereits BUCHNER und ORTHENBERGER gezeigt hatten, daß die bakterizide Wirkung des Serums durch Dialyse oder Verdünnen mit Wasser aufgehoben wird und BUCHNER den Nachweis erbracht hatte, daß die bakterizide Kraft des Serums durch nachträgliches Besalzen wiederhergestellt wird, kam die Frage erst in letzter Zeit durch die auf Veranlassung von MORGENROTH vorgenommenen Untersuchungen FERRATAS einerseits, durch Versuche von SACHS und TERUUCHI andererseits wieder in Fluß. Dabei hat sich übereinstimmend gezeigt, daß die hämolytischen Komplemente in salzfreiem, resp. salzarmem Medium nicht wirken. Um die lösende Wirkung des Wassers zu vermeiden, muß man dabei die Versuche in isotonischer — 7,8 %iger — Rohrzuckerlösung anstellen. Es wird also für alle Verdünnungen und die Blutaufschwemmung**) die genannte Rohrzuckerlösung verwandt. Nach dem Vorgang FERRATAS kann man auch 4,15 %ige Traubenzuckerlösung als Verdünnungsflüssigkeit benutzen. Da die Immunambozeptoren in ziemlich starker Verdünnung zur Verwendung gelangen, spielt der Salzgehalt des nativen Serums keine Rolle. Für die komplettierende Sera empfiehlt sich zur vollständigen Entfernung der Salze die von FERRATA herangezogene Dialyse. Wie schon erwähnt, bleibt nun in salzfreiem Medium die Hämolyse aus. Der Ambozeptor wird zwar gebunden, aber das Komplement gelangt nicht zur Wirkung***).

---

*) Der übrigens v. DUNGERN und COCA insofern beitreten, als sie finden, daß „Ölseife die Blutkörperchen für geringe Komplementmengen sensibilisieren" kann (Summation?).

**) Da in Rohrzuckerlösung leicht Spontanagglutination der Erythrocyten auftritt, soll es sich nach SACHS und TERUUCHI empfehlen, die Blutaufschwemmung vor Gebrauch über Nacht auf Eis liegen zu lassen, oder das zweimal in 7,8 %iger Rohrzuckerlösung gewachsene Blut in einer 6 % Rohrzuckerlösung aufzuschwemmen.

***) Normale Serumhämolysine scheinen nach den Beobachtungen von GIRARD-MANGIN und HENRI, sowie von SACHS und TERUUCHI in Rohrzuckerlösung stärker zu wirken als in Kochsalzlösung.

Die Ursache der Unwirksamkeit der Komplemente in salzfreien Lösungen, die von Ferrata gleichfalls erkannt wurde, wird an späterer Stelle noch zu erörtern sein. Hier sei noch auf die Tatsache der dauernden Inaktivierung der Komplemente im salzfreien Medium, wie sie von Sachs und Teruuchi beschrieben wurde, hingewiesen. Benutzt man, wie das gewöhnlich der Fall ist, Meerschweinchenserum als Komplement, so muß das Serum frisch gewonnen sein oder sofort nach der Gewinnung in gefrorenem Zustande aufbewahrt werden. Um die Inaktivierung zu erzielen, verfährt man in der Weise, daß man 0,5 ccm Meerschweinchenserum mit 4,1 ccm destillierten Wassers $1^1/_4$ Stunde bei 37° digeriert, sodann wird zur Herstellung der Isotonie 0,4 ccm 10%iger Kochsalzlösung hinzugefügt. Das Optimum der Inaktivierung tritt bei 9—10facher Wasserverdünnung ein, jedoch ist auch schon bei 2—3facher Verdünnung eine geringe Schwächung der komplettierenden Wirkung wahrzunehmen.

Was das Wesen dieser Inaktivierung anlangt, so haben die Untersuchungen von Sachs und Terruuchi gezeigt, daß die Inaktivierung abhängig ist von dem Alter des Serums, indem beim Lagern die Inaktivierbarkeit durch Wasser aufhört. Ebenso kann man durch kurzes Erhitzen des frisch gewonnenen Serums (10—15 Minuten auf 51°) das Serum derart alterieren, daß die komplettierende Wirkung durch Wasser nicht mehr aufgehoben ist. Bei stärkerer Verdünnung (20—40fach) bleibt die Inaktivierung auch bei frisch gewonnenem Serum aus. Schließlich ist die Inaktivierung abhängig von der Temperatur, indem sie bei 0—9° nicht eintritt. Große Ambozeptormengen scheinen das Komplement vor der Inaktivierung zu schützen. Sachs und Terruuchi haben den Vorgang in der Weise erklärt, daß die Inaktivierung im salzfreien Medium durch einen fermentartigen Serumbestandteil veranlaßt wird, der nur in einer gewissen Konzentration wirkt und dessen Quantität individuell sehr variiert. Daß die Unwirksamkeit der Komplemente im salzarmen Medium auf andere Ursachen zurückzuführen ist, als die dauernde Inaktivierung, ergibt sich daraus, daß Meerschweinchenserum bei 40facher Verdünnung mit Wasser (Rohrzuckerlösung) gleichfalls nicht hämolytisch wirkt, obwohl nach der Restitution des erforderlichen Salzgehaltes das Komplement ungeschwächt zur Wirkung gelangt, also nicht zerstört ist.

Tsuda hat die Angaben von Sachs und Terruuchi unter Verwendung von normalem Rinderserum als Hämlysin im wesentlichen bestätigt und macht nur insofern abweichende Angaben, als er gerade im älteren Rinderserum das Optimum der Inaktivierung erzielen konnte. Diese Widersprüche dürften eine Erklärung finden durch neuere Untersuchungen von Sachs und Altmann, die demnächst mitgeteilt werden sollen, und über welche ich anläßlich der zweiten Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie vorläufig berichtet habe. Es hat sich nämlich ergeben, daß die Reaktion des Mediums von ausschlaggebender Bedeutung ist für die Inaktivierung der Komplemente im salzfreien Medium, ein Befund, der vielleicht auch die von Sachs und Terruuchi ursprünglich vertretene Fermenthypothese entbehrlich macht.

Von weiteren Inaktivierungsmethoden wäre noch die Zerstörung der hämolytischen Komplementwirkung durch Äther zu nennen, die bereits von Kyes und Sachs und Sclavo erwähnt wurde, und die Ottolenghi und Mori zum Gegenstand einer eingehenden Studie gemacht haben. Nach letzteren Autoren soll der Äther nur auf die hämolytischen, nicht auf die bakteriziden Komplemente diese Wirkung ausüben. Ebenso

übt übrigens nach eigenen Erfahrungen auch Alkohol eine zerstörende Wirkung aus.

Nach LICHTWITZ gelingt es auch, die hämolytischen Komplemente durch die kombinierte Einwirkung fluoreszierender Stoffe und des Lichtes zu zerstören*).

Erwähnt sei noch die von EHRLICH und SACHS vorgenommene Zerstörung der Komplemente mittels Papainverdauung. Auf eine Reihe anderer Maßnahmen, durch welche eine Bindung resp. Absorption der Komplemente zu erzielen ist, wird beim Kapitel „Antihämolytische Wirkungen“ näher einzugehen sein.

3. Wirkungsmechanismus der Komplemente. (Komplementoide).

Was den Wirkuńngsmechanismus der Komplemente anlangt, so haben ja die ersten Versuche von EHRLICH und MORGENROTH gezeigt, daß die Komplementwirkung abhängig ist von der Temperatur, indem in der Kälte (0—3°) die Hämolyse ausbleibt, dabei der Ambozeptor gebunden wird, das Komplement aber in geeigneten Verdünnungen in der Flüssigkeit erhalten ist. Das Optimum der Wirkung liegt etwa zwischen 30 und 40°. Höhere Temperaturen wirken verlangsamend auf die Reaktion, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß unter diesen Bedingungen die Komplemente während des Reaktionsverlaufes schon eine nicht unerhebliche Schädigung erfahren können. Nach SIMNITZKI bleibt die Komplementwirkung auch erhalten, wenn der Sauerstoff durch alkalische Pyrogalluslösung entfernt und Kohlensäure und Wasserstoff durch die Mischung geleitet wird.

Die äußeren Analogien, welche die Komplemente in ihrem Verhalten und ihrer Wirkung mit den Fermenten aufweisen, haben es nahegelegt, die Komplemente als Fermente anzusprechen. Wenn auch eine Reihe von Ähnlichkeiten formaler Art vorhanden sind, wie auch zwischen Fermenten und Toxinen (vergl. OPPENHEIMER), so fehlt doch ein wesentlicher Umstand, der für die Auffassung der Komplemente als Katalysatoren erforderlich wäre. Es findet nämlich, wie speziell v. LIEBERMANN nachgewiesen hat, ein quantitativer Verbrauch der Komplemente bei ihrer Wirkung statt, und in gleichem Sinne hat HENRI gezeigt, daß die Blutmenge, welche durch eine gegebene Menge von Serum gelöst werden kann, begrenzt ist.

EHRLICH und MORGENROTH haben von Anfang an die Komplemente mit den Toxinen in Parallele gestellt und dementsprechend an dem Komplementmolekül eine haptophore und eine toxophore oder zymotoxische Gruppe nachgewiesen. Die zymotoxische Gruppe bewirkt die eigentliche hämolytische Wirkung, und ihre Intaktheit wird aus dem Eintritt der Hämolyse ambozeptorbeladener Blutzellen erkannt.

Schwieriger ist aber der Nachweis einer gesonderten haptophoren Gruppe. Dieser Nachweis ist überhaupt nur dann möglich, wenn die beiden Gruppen sich gegenüber den Einflüssen, die eine Alteration des Komplements bedingen, verschieden verhalten. Besitzen aber beide dieselben Eigenschaften und dieselben Labilitätsgrade, so muß sich naturgemäß mit dem Schwinden der einen Gruppe auch die andere dem Nachweis entziehen. Man muß sich daher von vornherein darüber klar sein, daß

*) Nach H. PFEFFER sollen dabei bei längerer Belichtung die Ambozeptoren leiden, dagegen die Agglutinine resistenter sein.

ein negatives Ergebnis zu Schlußfolgerungen nicht berechtigt. Da nun ferner die zymotoxische Gruppe nur durch Vermittlung der haptophoren zur Wirkung gelangt, so ist ein isolierter Nachweis der zymotoxischen Gruppe ausgeschlossen. Methodisch ist man daher lediglich auf den Nachweis der isolierten haptophoren Gruppe angewiesen und daher davon abhängig, ob die haptophore Gruppe gewissen Einflüssen gegenüber stabiler ist als die zymotoxische. Es ist daher ratsam, bei der Inaktivierung durch thermischen Einfluß, die in der Regel für derartige Untersuchungen geübt wird, möglichst niedrige Inaktivierungstemperaturen zu wählen. Der Nachweis der Komplementoide — so haben Ehrlich und Morgenroth die durch Verlust der zymotoxischen Gruppe entstandenen Komplementmodifikationen benannt — kann dann methodisch in zweierlei Weise versucht werden:

1. durch das Immunisierungsverfahren: Ehrlich und Morgenroth glaubten ursprünglich auf diese Weise zum Ziele gelangt zu sein, indem sie die antikomplementäre Funktion der durch Vorbehandeln mit inaktiviertem Serum erhaltenen Antisera auf immunisatorisch erzeugte Antikomplemente bezogen. Nachdem sich aber gezeigt hat, daß alle diejenigen Erscheinungen, welche ursprünglich auf die Bildung von Antikomplementen zurückgeführt wurden, durch Komplementbindung, verursacht durch das Zusammenwirken von Eiweißantigen und Antikörper erklärt werden können, ist diese Beweisführung hinfällig geworden.

2. Der zweite Weg zum Nachweis der Komplementoide besteht in der Demonstration einer interferierenden Wirkung der inaktivierten Sera. Sind die haptophoren Gruppen noch vorhanden, so werden sie die komplementophilen Gruppen der Ambozeptoren besetzen und dadurch dem wirksamen Komplement den Zugang sperren. Diese „Verstopfung“ der Ambozeptoren kann aber nur dann eintreten, wenn die haptophore Gruppe des Komplements beim Inaktivieren eine Steigerung der Avidität erfährt oder wenigstens in bezug auf letztere unverändert bleibt*). Bei einer Aviditätsverminderung oder völligen Zerstörung der haptophoren Gruppe ist eine interferierende Wirkung nicht zu erwarten. Da nun die einzelnen Komplemente der verschiedenen Sera sich in dieser Hinsicht sehr variabel verhalten, so ist man mehr oder weniger vom Zufall abhängig, ob man eine geeignete Modifikation für die erforderlichen Versuche in die Hände bekommt.

Im allgemeinen scheint sogar mit der Inaktivierung der Sera eine Herabsetzung der Avidität verbunden zu sein, und so gelang es erst Ehrlich und Sachs nach vielfachen vergeblichen Bemühungen Ehrlichs und Morgenroths ein zum Nachweis der Komplementoide geeignetes hämolytisches System aufzufinden. Dasselbe betrifft die Hämolyse von Meerschweinchenblut durch die kombinierte Wirkung von inaktivem Hundeserum (als Ambozeptor) und Meerschweinchenserum (als Komplement).

Die hemmende Wirkung des Komplementoids muß sich darin äußern, daß inaktives Serum die Hämolyse durch wirksames Komplement hemmt. Daraus ergibt sich die erforderliche Versuchsanordnung. Man mischt Blut mit Ambozeptor und inaktivem Serum, läßt eine Zeitlang (eine Stunde bei 37°) stehen und fügt sodann wirksames Komplement

*) Im letzteren Falle wird man entweder einen verzögerten Eintritt der Komplementwirkung wahrnehmen, unter Umständen auch ein Ausbleiben, das dann durch die Verfestigung der Bindung zwischen haptophorer Komplementgruppe und ambozeptorbeladener Blutzelle verursacht ist.

hinzu. Die Hämolyse muß dann ausbleiben. Durch besondere Kontrollversuche müssen dann aber verschiedene Momente, welche bei gleicher Anordnung eine Hemmung der Hämolyse verursachen können, ausgeschlossen werden. Es könnte hier besonders das inaktive Serum eine antikomplementäre Wirkung ausüben. Diese Möglichkeit ist leicht dadurch auszuschließen, daß man vor dem Zusatz des wirksamen Komplements zentrifugiert und die erhaltenen Sedimente der Komplementwirkung aussetzt. Sehr oft aber wird in demselben inaktiven Serum gleichzeitig Ambozeptor und Komplementoid vorhanden sein, und dann ist auch beim Zentrifugieren die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß der Ambozeptor vielleicht überhaupt nicht gebunden worden ist. Ehrlich und Sachs haben in dem von ihnen zuerst beschriebenen Falle die erforderlichen Methoden angegeben, welche eine einwandfreie Analyse ermöglichen. Es kommen dabei in Betracht:

1) die isolierte Bindung des Ambozeptors bei 0°. Da bei 0° nur der Ambozeptor, aber nicht das Komplement gebunden wird, so ist anzunehmen, daß auch die Komplementoide dabei in Lösung bleiben und man auf diese Weise Sedimente erhält, welche sich im wirksamen Komplement lösen. Das ist in der Tat der Fall. Man verfährt, um bei dem von Ehrlich und Sachs zuerst gefundenen Beispiel zu bleiben, in der Weise, daß man je 1 ccm 5%iges Meerschweinchenblut mit absteigenden Mengen inaktiven Hundeserums digeriert, die Röhrchen einmal eine Stunde bei 37°, das andere Mal bei 0° stehen läßt. Sodann wird abzentrifugiert, und die Sedimente werden in physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von Meerschweinchenserum (0,4 ccm) aufgenommen. Die bei 0° vorbehandelten Blutkörperchen lösen sich dann auf, während in den bei 37° vorbehandelten, bei denen eine Komplementoidverstopfung eingetreten ist, die Hämolyse ausbleibt.

2) Das zweite Verfahren bildet eine Ergänzung zu dem zuerst angeführten. Man kann nämlich nachweisen, daß in dem bei 0° mit Blut digerierten inaktiven Serum das Komplementoid frei zurückbleibt und seine hemmende Wirkung auf die bei 0° vorbehandelten Blutsedimente ausüben kann.

3) Das dritte Verfahren besteht darin, daß man ebenso wie bei der Trennung von Ambozeptor und Komplement durch einen geeigneten Salzzusatz eine isolierte Bindung des Ambozeptors erzielt und wiederum das Komplementoid in Lösung behält.

4) Kann man sich zur Inaktivierung des Serums einer Methode bedienen, welche die Komplemente nicht modifiziert, sondern durch Absorption entfernt. Auf diese Weise erhält man inaktive Sera, welche sich von den durch Hitze inaktivierten dadurch unterscheiden, daß sie wohl Ambozeptoren, aber keine Komplementoide enthalten. Von den hierzu geeigneten Methoden kommt an erster Stelle die von v. Dungern entdeckte und von Ehrlich und Sachs angewandte Absorption der Komplemente durch Hefe in Betracht*).

Wie sehr man von dem variierenden Verhalten der einzelnen Komplemente abhängig ist, ergibt sich daraus, daß Sachs zeigen konnte, daß Meerschweinchenblutkörperchen, welche nach Vorbehandlung mit inaktivem Hundeserum infolge der Komplementoidverstofung durch Meerschweinchenserum nicht mehr gelöst werden, durch die Komplemente

*) 5 ccm Serum werden mit etwa 0,1—0,2 g Trockenhefe digeriert, eine Stunde geschüttelt, sodann filtriert oder zentrifugiert.

des Hundeserums noch gelöst werden können. Es ergibt sich daraus einerseits, daß das im Hundeserum enthaltene Komplement eine größere Avidität hat als das Meerschweinchenkomplement, andererseits daß auch die Komplemente des Hundeserums bei der Komplementoidbildung eine Herabsetzung ihrer Avidität erfahren müssen.

Einwände, welche gegen die von Ehrlich und Sachs geübte Beweisführung von seiten Gays erhoben worden sind, konnten gegenüber einer kritischen und experimentellen Nachprüfung von Sachs nicht standhalten. Gay hat nämlich bei dem auf 51° erhitzten Hundeserum noch eine geringgradige hämolytische Wirksamkeit bemerkt und schließt daraus, daß das Komplement im ganzen abgeschwächt, aber nicht in ein Komplementoid übergegangen sei. Man kann aber das Hundeserum ohne weiteres derart inaktivieren, daß es vollständig unwirksam ist, aber doch durch die Komplementoidverstopfung interferiert. Man muß allerdings, wie ich schon erwähnt habe, die Inaktivierungstemperatur bei derartigen Versuchen äußerst genau bestimmen, denn die Schwierigkeit des Komplementoidnachweises ist eben darin gelegen, daß die Temperatur, welche die zymotoxische Gruppe zerstört, offenbar nicht weit entfernt von derjenigen ist, welche bereits einen wesentlichen Einfluß auf das Vereinigungsbestreben des Komplements ausübt. Für die Differenzierung von haptophorer und zymotoxischer Gruppe genügt übrigens vollständig der von Gay zugegebene Befund, daß das Komplement bei geeignetem Erhitzen noch ein starkes Vereinigungsbestreben mit den an die Zelle gebundenen Ambozeptoren aufweist und dabei nur eine sehr geringgradige hämolytische Wirkung ausübt.

Nach Befunden von Fuhrmann scheint übrigens die Avidität der haptophoren Gruppe weniger zu leiden, wenn man die Sera durch Lagern der spontanen Abschwächung und Inaktivierung überläßt, als wenn man sie durch Erwärmen inaktiviert. Fuhrmann beschreibt nämlich, daß ein vom Kaninchen gewonnenes Immunserum, welches im aktiven Zustande aufbewahrt wurde, nach drei Wochen das Phänomen der Komplementoidverstopfung aufwies, während das gleiche Serum, das frisch inaktiviert wurde, die für Komplementoide charakteristischen Eigenschaften entbehrte.

Weitere Erfahrungen über den Nachweis der Komplementoide verdanken wird Muir und Browning. Diese Autoren verfuhren zunächst in der Weise, daß sie die Wirkung inaktivierter Sera auf das Zustandekommen der Vereinigung von Komplement und Antikomplement untersuchten. Es zeigte sich, daß inaktivierte Sera diese Reaktion hemmen können*).

Ferner haben Muir und Browning eine neue Methode zum Nachweis der Komplementoide aufgefunden. Die letztere beruht auf dem Umstand, daß offenbar die komplementophilen Gruppen der an die Blutzellen verankerten Ambozeptoren nach der Hämolyse eine gesteigerte Bindungsenergie besitzen. Man verfährt dabei nach Muir und Browning in der Weise, daß man die mit einem Überschuß von Ambozeptor beladenen Blutzellen durch minimale Komplementmengen auflöst und dann die lackfarbene Blutlösung dem inaktivierten Serum aussetzt. Muir und Browning prüften auch die Mengen von Komplementoid quantitativ und fanden in manchen Fällen einen Komplementoidvorrat, der dem ursprünglichen Komplementgehalt entsprach, in manchen aller-

*) Natürlich bleiben diese Versuche auch jetzt beweiskräftig, wenn es sich auch bei den antikomplementären Wirkungen um die komplementbindende Funktion der mit Antikörpern beladenen Eiweißstoffe gehandelt hat.

dings geringere Werte. Andererseits machen MUIR und BROWNING darauf aufmerksam, daß die Unwirksamkeit der Komplemente nicht immer notwendig auf mangelnder Bindung beruhen muß. Es können in der Tat Fälle vorkommen, in denen das Komplement gebunden wird, die zymotoxische Gruppe aber nicht zur Wirkung gelangt, im Sinne EHRLICHS nicht „dominant" ist. Beispiele solcher nichtdominanten Komplementwirkungen hat besonders BROWNING in einer schon besprochenen Arbeit angeführt.

Nach der Ansicht MUIRS und BROWNINGS ist eine solche relative Unempfindlichkeit der Zelle gegenüber der Komplementwirkung besonders dann wahrzunehmen, wenn als Komplement die Sera derjenigen Tierart, welche auch die Blutkörperchen liefert, benutzt werden. MUIR und BROWNING erblicken darin eine Schutzvorrichtung des Organismus gegen autocytotoxische Prozesse. Man wird allerdings in Zukunft daran denken müssen, daß es sich in solchen Fällen um eine komplementbindende Wirkung durch die mit Antikörpern beladenen Eiweißstoffe handeln könnte, wozu die Bedingungen ja gegeben sind. Auch GAY hat Befunde beschrieben, aus denen sich ergibt, daß Komplemente gebunden werden können, ohne zur Wirkung zu gelangen. Diese Bindung nichtdominanter Komplemente bietet natürlich ein weiteres Beweisglied für die Differenzierung einer haptophoren und zymotoxischen Gruppe im Komplementmolekül.

Schließlich sei noch auf Versuche von MUIR und BROWNING hingewiesen, welche die bekannte Tatsache betreffen, daß das gleiche Serum, welches aktiv komplettierend wirkt, im inaktiven Zustande die Hämolyse durch das artgleiche Komplement hindert. Es gelang den Autoren durch Digerieren des aktiven Serums mit ambozeptorbeladenem Stromata, mit der Bindung der Komplemente das Serum gleichzeitig derart zu alterieren, daß es im inaktivierten Zustande nicht mehr die Hämolyse hemmte. Allerdings gelangt SELIGMANN in einer jüngst erschienenen Arbeit, welche analoge Verhältnisse betrifft, zu einer Ablehnung der Annahme von Komplementoiden in dicsem Falle.

Man darf natürlich nicht die Wirkungen eines inaktivierten Serums lediglich auf Ambozeptoren oder Komplementoide zurückführen. Ich erwähne dies besonders darum, weil MANWARING in Arbeiten über Komplementoide aus kurvenmäßigen Darstellungen schließt, daß die Komplementoide zuweilen die Hämolyse vermindern, zuweilen sie unbeeinflußt lassen oder auch verstärken. Man wird nicht fehlgehen, wenn man annimmt, daß die von diesem Autor erhaltenen Kurven Resultanten einer Reihe von Vorgängen darstellen und daher für die Komplementoidfrage wenig Bedeutung haben.

4. Spaltung der Komplemente.

Die neueste Forschung hat gezeigt, daß das der Komplementwirkung zugrunde liegende Substrat komplizierter gebaut ist, als man ursprünglich annahm. FERRATA hat in MORGENROTHS Laboratium erkannt, daß das Komplement bei der Dialyse in zwei Komponenten zerfällt, und darin die Ursache für die Unwirksamkeit der Komplemente im salzfreien Medium erblickt. Bei der Dialyse des Serums fällt bekanntlich ein Teil des Globulins aus, und durch Trennung des Niederschlages von der Zwischenflüssigkeit werden die beiden Komponenten isoliert. BRAND hat die im Globulinniederschlag enthaltene Komponente „Mittelstück", die im Abguß befindliche „Endstück" genannt. Die von

Ferrata beschriebene Methode zur Gewinnung der beiden Komponenten des Komplements besteht in folgendem:

Meerschweinchenserum wird 24 Stunden lang gegen fließendes Wasser dialysiert, sodann wird die Flüssigkeit von dem ausgefallenen Niederschlag durch Zentrifugieren getrennt. Die Flüssigkeit wird eventuell noch einmal zentrifugiert und durch ein dichtes Filter filtriert, um sie von den letzten Spuren des Niederschlages zu befreien. Sie enthält das Endstück. Von einem Besalzen der Lösung wird in der Regel abgesehen werden können, da das dialysierte Serum für den hämolytischen Versuch doch in 10—20facher Verdünnung zur Anwendung kommt. Werden größere Mengen verwandt, so wird man das Dialysat durch geeigneten Zusatz einer starken Kochsalzlösung auf den isotonischen Salzgehalt bringen müssen*). Der abzentrifugierte Niederschlag wird noch mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und kann nach dem Vorgang von Ferrata in physiologischer Kochsalzlösung gelöst werden. Jedoch konnte Brand nachweisen, daß sich das derart in physiologischer Kochsalzlösung gelöste Mittelstück sehr rasch verändert, so daß es sich empfiehlt, den Niederschlag für die Aufbewahrung mit destilliertem Wasser aufzuschwemmen. Die derart erhaltenen Komponenten sind an und für sich unwirksam, vereint bewirken sie die typische Komplementwirkung.

Was das Verhalten von Mittelstück und Endstück thermischen Einflüssen gegenüber anlangt, so konnte Brand im Gegensatz zu Ferrata zeigen, daß beide Komponenten thermolabil sind. Diese Thermolabilität ist neuerdings von Tsurusaki aus dem Laboratorium Morgenroths bestätigt worden. Tsurusaki gibt an, daß die Trennung mittels Dialyse bei normalen Hämolysinen (Hundeserum und Ziegenserum) nicht gelingt. Es zeigte sich nämlich, daß die Sera nach 24stündiger Dialyse vollkommen unwirksam geworden waren. Die Ursachen dafür vermutet Tsurusaki darin, daß diese Sera das komplementzerstörende Ferment, welches Sachs und Teruuchi für die Zerstörung der Komplemente im salzfreien Medium verantwortlich gemacht haben, in diesen Seris in besonders stabiler oder konzentrierter Form vorhanden ist, so daß auch unter den Verhältnissen der Dialyse eine Komplementzerstörung stattfindet.

Brand hat die Beziehungen der beiden Komponenten zu den ambozeptorbeladenen Blutzellen näher analysiert, und die Ergebnisse dieser Untersuchung haben ihn zur Bezeichnung „Mittelstück" und „Endstück" geführt. Bei isolierter Wirkung einer der beiden Komponenten auf ambozeptorbeladene Blutzellen wird nämlich nur das Mittelstück gebunden; das Endstück übt erst dann seine Wirkung aus, wenn das Mittelstück zuvor gebunden worden ist.

In Fortsetzung dieser Befunde Brands konnte Hecker zeigen, daß die Bindung des Mittelstücks an die ambozeptorbeladene Blutzelle auch bei 0° erfolgt, während das Endstück erst bei höherer Temperatur reagiert. Diese Befunde mußten den Gedanken nahe legen, daß bei der

---

*) Zum nachträglichen Besalzen salzfreier Flüssigkeiten kann man sich allgemein folgender Formel bedienen. Ist m die Menge der salzfreien Flüssigkeit, p die Konzentration der zur Verwendung gelangenden Kochsalzlösung, so ergibt sich die Menge x von letzterer, welche zum Erzielen eines Gehaltes von 0,85 % Kochsalz erforderlich ist, aus der Gleichung:

$$\frac{m + x}{x} = \frac{p}{0{,}85}, \quad \text{also:} \quad x = \frac{0{,}85\ m}{p - 0{,}85}.$$

von Ehrlich und Morgenroth begründeten Kältetrennungsmethode die Spaltung des aktiven Hämolysins nicht zwischen Ambozeptor und Komplement, sondern zwischen Mittelstück und Endstück erfolgt. Bei der theoretischen und methodologischen Wichtigkeit dieser Frage habe ich in Gemeinschaft mit Frau Dr. Bolkowska untersucht, wie sich natives Meerschweinchenserum als Komplement bei 0° ambozeptorbeladenen Blutkörperchen gegenüber verhält. Es hat sich dabei ergeben*), daß Blutkörperchen, die nur mit geringen Ambozeptormengen beladen sind und in der Kälte im aktiven Meerschweinchenserum digeriert werden, das Komplement unbeeinflußt in der Flüssigkeit belassen. Waren dagegen die Blutkörperchen mit einem Ambozeptorüberschuß beladen, der übrigens nicht sehr groß zu sein braucht, so zeigte sich, daß das Komplement in zwei Teile geteilt worden war. Es waren nämlich weder die Abgüsse imstande, ambozeptorbeladenes Blut zu lösen, noch trat bei Aufschwemmung der gewaschenen Blutsedimente in physiologischer Kochsalzlösung Hämolyse ein. Dagegen erwies sich beim Digerieren der Abgüsse mit den bei 0° vorbehandelten ambozeptorbeladenen Blutzellen die hämolytische Wirkung quantitativ erhalten. Das Komplement kann also auf diese Weise in der Tat in zwei Komponenten gespalten werden, die offenbar dem Mittelstück und Endstück entsprechen. Man wird in Zukunft bei Komplementbindungsversuchen, die bei 0° vorgenommen werden, mit dieser Möglichkeit zu rechnen haben und wird aus einem Versuchsbefund, welcher zeigt, daß das Komplement nach dem Digerieren mit einem Gemisch von Antigen und Antikörper bei 0° seine Wirkung verliert, nicht ohne weiteres den Schluß ziehen dürfen, daß das gesamte Komplement gebunden ist, ebensowenig wie man aus dem gleichen Befund einen Einwand gegen die Ambozeptornatur der fraglichen Antikörper wird erblicken können.

Im gleichen Sinne sind Untersuchungen von Neufeld und Händel zu verwerten, welche darüber berichten, daß „bei Blutkörperchen, die mit Komplement und einem reichlichen Überschuß an hämolytischem Ambozeptor einige Stunden bei 0° gehalten werden, im Gegensatz zu den Befunden von Ehrlich und Morgenroth eine Bindung des Komplements an den Ambozeptor und sogar eine beginnende Hämolyse eintreten kann“. Aus dieser Angabe scheint sogar hervorzugehen, daß unter optimalen Bedingungen (großer Ambozeptorüberschuß, langdauernder Aufenthalt bei 0°) eine partielle Bindung des Endstücks erfolgen kann. In einer neuerdings erschienenen Arbeit bestätigt Händel, daß bei großen Ambozeptor- und Komplementmengen bereits bei 0° Hämolyse eintreten kann, aber in seinen Versuchen nicht immer erfolgt ist. Aber auch in letzteren Fällen wirkte der Abguß nicht komplettierend. Das entspricht den erwähnten von mir und Bolkowska erhobenen Befunden, die wir allerdings in einer demnächst erscheinenden Arbeit damit erklären, daß bei 0° nur das Mittelstück, nicht das Endstück gebunden wird. Offenbar muß man aber aus den Versuchen Händels folgern, daß bei sehr großem Ambozeptor- und Komplementgehalt auch das Endstück bei 0° mehr oder weniger gebunden wird. Für den verschiedenen Ausfall des Versuches bei 0° genügt es wohl, die quantitativen Differenzen verantwortlich zu machen. Ob auch eine verschiedene Avidität der verankerten Ambozeptoren zum Komplement, wie es Händel vermutet, eine Rolle spielt, sei dahingestellt.

*) Die Untersuchungen sollen demnächst publiziert werden. Die Ergebnisse habe ich bereits auf der 2. Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie mitgeteilt

Sehr wichtig ist auch die Alteration, welche das Mittelstück in Kochsalzlösung erfährt, und die zuerst von Brand bemerkt wurde. Sie äußert sich darin, daß das in Kochsalz aufgenommene Mittelstück sehr rasch die Fähigkeit verliert, im Verein mit dem Endstück zu wirken. Trotzdem ist das Mittelstück unter diesen Umständen nicht zerstört. Hecker konnte nämlich zeigen, daß es auch dann noch von den ambozeptorbeladenen Blutzellen verankert wird, was sich daraus ergab, daß die mit dem Kochsalzmittelstück vorbehandelten ambozeptorbeladenen Blutkörperchen durch das isolierte Endstück gelöst werden konnten. Es ist dabei nicht einmal notwendig, die Zwischenflüssigkeit vor dem Zusatz des Endstückes durch Zentrifugieren zu entfernen. Ein näherer Einblick in die eigenartigen Veränderungen des Kochsalzmittelstücks kann man nach dem Vorgehen von Hecker dadurch erlangen, daß man die Wirkung des Mittelstücks auf das native oder auf das durch die Vereinigung von Mittelstück und Endstück restituierte Komplement untersucht. Es zeigt sich dann, daß in beiden Fällen eine Hemmung der Hämolyse eintritt. Im letzteren Falle erweist sich merkwürdigerweise die Hemmung erheblich stärker, wenn das Kochsalzmittelstück mit beiden wirksamen Komponenten gleichzeitig digeriert wird, als wenn es zunächst nur mit dem Endstück digeriert ist und erst später der Zusatz des wirksamen Mittelstücks erfolgt.

Die Erklärung für dieses eigenartige Verhalten ist darin zu suchen, daß das Kochsalzmittelstück eine größere Verwandtschaft zum Endstück besitzt als das wirksame (in Wasser aufbewahrte) Mittelstück. Das Endstück wird demnach in jedem Fall zu einem mehr oder minder großen Teil von dem Kochsalzmittelstück gebunden. Wenn aber wirksames Mittelstück von vornherein digeriert wurde, so geht während des Reaktionsverlaufes noch ein Teil in die hemmende Modifikation über. Der Beweis dafür, daß in der Tat das Mittelstück bei der Aufbewahrung in Kochsalzlösung eine erhöhte Avidität zum Endstück erhält, ergibt sich daraus, daß, wie Hecker zeigen konnte, die Bindung des Kochsalzmittelstücks an die ambozeptorbeladene Blutzelle durch das Endstück verhindert ist. Es ist möglich, daß die Avidität des Kochsalzmittelstücks zur ambozeptorbeladenen Blutzelle von vornherein vermindert ist; jedenfalls genügt sie noch zur Bindung, aber man muß sicherlich schließen, daß die Vereinigung des Kochsalzmittelstücks mit dem Endstück eine Verminderung der Avidität zu der ambozeptorbeladenen Blutzelle zur Folge hat, welche eine Reaktionsfähigkeit und damit die Hämolyse nicht mehr ermöglicht.

In Anbetracht der neu gewonnenen Kenntnis der komplexen Konstitution der Komplemente muß sich die Frage aufdrängen, ob die beiden Komponenten im aktiven Serum zum wirksamen Komplement vereinigt sind oder frei nebeneinander existieren. Der Umstand, daß bei 0° aus dem nativen Serum das Mittelstück isoliert gebunden werden kann, würde zunächst für die letztere Möglichkeit sprechen Denn man müßte im anderen Falle annehmen, daß das komplexe Hämolysin in der Kälte in die Komponenten dissoziiert. Andererseits legt der von Brand und Hecker erwiesene Umstand, daß das isolierte Mittelstück in physiologischer Kochsalzlösung die erörterte Alteration erleidet, im Verein mit dem Endstück aber auch in Kochsalzlösung unverändert erhalten bleibt, die Vermutung nahe, daß beide Komponenten im Serum vereinigt sind, wie dies auch Ferrata annahm. Immerhin erscheint die Frage noch nicht spruchreif und weiterer Analyse bedürftig. Man könnte sich auch vor-

stellen, daß Mittelstück und Endstück im konzentrierten Serum vereinigt sind, bei der Verdünnung aber durch hydrolytische Dissociation getrennt werden, und daß diese Dissociation die notwendige Vorstufe der Komplementwirkung ist. In diesem Sinne könnten auch Beobachtungen von v. Liebermann und Fenyvessy verständlich erscheinen, denen zufolge beim Verdünnen die hämolytische Kraft komplettierender Sera zunimmt. Allerdings wird man der von v. Liebrmann und Fenyvessy daraus gezogenen Schlußfolgerung, daß die Komplemente wirklich beim Verdünnen wirksamer werden, nicht ohne weiteres zustimmen können. Es sind bei der verminderten Wirkung der starken Serumkonzentrationen noch eine Reihe anderer Faktoren zu berücksichtigen, so sicherlich physikalische Momente, antihämolytische Wirkungen usw. Besonders aber ist dann, wenn als komplettierendes Serum das den Blutkörperchen entsprechende benutzt wird, wie dies in einem Teil der v. Liebermann-Fenyvessyschen Versuche der Fall ist, zu berücksichtigen, daß die Bedingungen für eine Komplementbindung durch das Zusammenwirken des Immunserums mit den Eiweißstoffen des Serums gegeben sind, welche mit steigender Serummenge immer günstiger werden können. Übrigens berichtet schon Mioni darüber, daß auch bei einem Überschuß des komplettierenden Serums die Hämolyse geringer wird.

Ein oft zu bemerkender Mißstand bei der Trennung des Komplements in seine Komponenten mittels Dialyse ist der, daß die vollständige Trennung von Mittelstück und Endstück in vielen Fällen nicht gelingt. Besonders scheint die das Endstück enthaltende Flüssigkeit, zumal bei großen Ambozeptordosen, oft bereits an und für sich hämolytisch zu wirken, und Neufeld und Händel berichten sogar, überhaupt keine wesentliche Abnahme der Komplementwirkung nach dem Entfernen des Globulinniederschlages aufgefunden zu haben. Vielleicht ist das Alter des zur Dialyse zu verwendenden Serums, wie Brand meint, von einem gewissen Einfluß, und empfiehlt es sich, stets frisches Serum für die Dialyse zu verwenden. Trotzdem wäre eine sicher arbeitende Methode für die Analyse der beiden Komponenten erwünscht. Nach meinen Erfahrungen eignet sich recht gut ein von Altmann und mir ausgearbeitetes Verfahren, welches darin besteht, daß Meerschweinchenserum mit salzsäurehaltigem Wasser ausgefällt wird. Man mischt 0,5 ccm Meerschweinchenserum mit 4,1 ccm $^{1}/_{300}$—$^{1}/_{250}$ Normalsalzsäurelösung (in destilliertem Wasser), läßt das Gemisch eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen und zentrifugiert ab. Das Sediment (Mittelstück) wird in einem beliebig zu wählenden Volumen destillierten Wassers aufgeschwemmt. Der Abguß (Endstück) wird noch einmal filtriert und sodann durch Zusatz von 0,4 ccm 10%iger Kochsalzlösung, welche $^{1}/_{25}$—$^{1}/_{30}$ Normalnatronlauge enthält, neutralisiert und auf den isotonischen Salzgehalt gebracht.

5. Natur der Komplemente.

In letzter Zeit sind von verschiedenen Seiten gleichsinnige Versuche gemacht worden, die Natur der Komplemente zu ergründen und die Komplemente als Verbindungen von Lipoiden und Eiweißkörpern aufzufassen. Den Ausgangspunkt dieser Untersuchungen bildet die von Metchnikoff und Tarrassévitch aufgefundene hämolytische Wirkung der durch Digerieren mit physiologischer Kochsalzlösung aus Organemulsionen dargestellten Extrakte. Tarrassévitch hatte angegeben, daß nur die Organextrakte der makrophagenreichen Organe und des

Pankreas hämolytisch wirken. Ebenso berichtete Shibayama über hämolytische Eigenschaften der Extrakte aus Milz- und Lymphdrüsen; Klein fand eine besondere Konstanz in der hämolytischen Wirkung der Pankreasextrakte. Tarrassévitch hielt die Hämolysine der Organextrakte für identisch mit denjenigen des Blutserums und erblickte darin einen Beweis für die Anschauung Metchnikoffs, daß die hämolytisch wirksamen Komplemente, die Makrocytasen, aus den Makrophagen stammen. Er beschreibt sie als thermolabil, wenn sie auch durch Erhitzen auf 56 ° nur wenig geschädigt werden und erst durch 1—2stündiges Erwärmen auf 58,5—62 ° ihre hämolytische Wirksamkeit verlieren. Indes haben die Untersuchungen Korschuns und Morgenroths gezeigt, daß wir es bei den Hämolysinen der Organextrakte doch mit ganz anderen Stoffen, als die Komplemente es sind, zu tun haben. Was die Herstellung der Organextrakte anlangt, so möge die Darstellung von Korschun und Morgenroth als technischer Hinweis dienen. „Die dem Tiere entnommenen Organe werden mit durch Salzsäure gereinigten Seesand möglichst fein verrieben, dann mit dem 5—10fachen ihres Gewichtes physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zwei Stunden im Schüttelapparat geschüttelt. Hierauf werden die gröberen Teile durch mehrstündiges Zentrifugieren entfernt, bis eine mehr oder weniger gleichmäßig getrübte Flüssigkeit zurückbleibt.“ Man kann diese Extrakte im eingefrorenen Zustande gut konservieren, jedoch sieht man nach dem Auftauen Niederschläge eintreten, die, in Kochsalzwasser aufgeschwemmt, hämolytisch wirken. Die wichtigsten Momente, welche Korschun und Morgenroth für die in den Organextrakten enthaltenen Hämolysine nachweisen konnten und welche sie von den Hämolysinen des Bfutserums wesentlich differenzieren, sind folgende:

1. Konnte im Gegensatz zu Tarrassévitch eine Thermolabilität der Organhämolysine nicht nachgewiesen werden. Die Hämolysine erwiesen sich als koktostabil. Die Differenz der Ergebnisse findet dadurch eine Erklärung, daß die beim Erhitzen eintretenden Koagula die wirksame hämolytische Substanz enthalten. Es ist daher erforderlich, vor dem hämolytischen Versuch den erhitzten Organextrakt gut durchzuschütteln.

2. Die Hämolysine der Organextrakte können aus dem wässerigen Extrakt durch Alkohol extrahiert werden; sie sind alkohollöslich.

3. Die Hämolysine der Organextrakte werden auch bei 0 ° von den roten Blutkörperchen vollkommen verankert, ohne dabei in geeigneter Menge hämolytisch zu wirken. Nach dem Aufenthalt der in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten Sedimente bei 37 ° tritt Hämolyse ein; die Hämolysine der Organextrakte besitzen also keine komplexe Konstitution *).

4. Es zeigte sich, daß man durch Immunisieren mit Organextrakten keine Antikörper erhält, welche die hämolytische Wirkung der Organextrakte aufheben, dagegen üben normale Sera eine stark hemmende Wirkung auf die Hämolyse durch Organextrakte aus. Daß es sich hier nicht um normale Antikörper handelt, geht daraus hervor, daß die schützende Wirkung der normalen Sera auch bei Erhitzen auf 100 ° erhalten bleibt.

Berücksichtigt man schließlich, daß die Organextrakte auch auf das Blut derjenigen Tierarten und selbst derjenigen Individuen, von

*) Nach neueren Angaben von Bauer ist die hämolytische Wirkung der alkoholischen Organextrakte in salzfreiem Medium (7,8 %ige Rohrzuckerlösung) reduziert.

denen sie stammen, hämolytisch wirken, so ist es wohl ersichtlich, daß die in den Organextrakten enthaltenen Hämolysine nicht mit den Hämolysinen des Blutserums identifiziert werden können*). Die von KORSCHUN und MORGENROTH erhaltenen Resultate finden übrigens in gleichsinnigen Untersuchungen von SAVTCHENKO und BERDNIKOFF, DÖMENY, DONATH und LANDSTEINER, sowie LÜDKE Bestätigung**). LEVADITI ist in einer späteren Arbeit allerdings zu der Ansicht gelangt, daß die durch längeres Auslaugen gewonnenen Organextrakte zwar die von KORSCHUN und MORGENROTH beschriebenen Eigenschaften aufwiesen, daß man aber bei kurzdauerndem Mazerieren makrophagenreicher Organe Stoffe erhalten soll, welche den Komplementen entsprechen. LEVADITI hält die thermostabilen hämolytischen Stoffe für das Produkt autolytischer Vorgänge, die thermolabilen sollen präformiert sein.

In dieselbe Gruppe hämolytischer Agentien, wie die von KORSCHUN und MORGENROTH analysierten Extrakthämolysine, gehören offenbar auch die Hämolysine, welche von zahlreichen Autoren (ich erwähne die Arbeiten von MICHELI und DONATI, sowie KULLMANN) in den Extrakten bösartiger Geschwülste aufgefunden wurden, ebenso die alkohollöslichen und thermostabilen Hämolysine des Blutserums, welche von WÖLFEL und LEVADITI beschrieben worden sind, ferner auch die von TALLQUIST in den Bothriocephalusgliedern nachgewiesenen hämolytischen und hämagglutinierenden Stoffe, welche er mit der Pathogenese der Bothriocephalusanämie in ursächlichen Zusammenhang bringt (vergl. auch FAUST und TALLQUIST).

Trotzdem gehen die neueren Arbeiten, welche einen Aufschluß über die Natur der Komplemente bringen wollen, gerade von den thermostabilen Hämolysinen der Organextrakte aus. VON LIEBERMANN und NOGUCHI haben etwa gleichzeitig und unabhängig von einander Versuche mitgeteilt, die dafür sprechen sollen, daß eigenartige Verbindungen von Seifen und eiweißartigen Körpern die Komplemente darstellen.

NOGUCHI ging dabei in der Weise vor, daß er die wirksame Substanz der Organextrakte näher analysierte. Das Verfahren, welches er benutzte, ist folgendes:

„Blut, Leber, Niere und Milz vom Hund, Rind und Kaninchen wurden mit mehreren Volumen 95%igen Alkohols bei 45—50° eine Woche lang extrahiert. Vor der Extraktion wurden die Organe zerkleinert und mit physiologischer Kochsalzlösung in eine dicke Emulsion verwandelt. Der in Alkohol lösliche Teil wurde von dem Koalugum getrennt und bei 40° abgedampft. Der Rückstand wurde nach Verdunsten des Alkokols mit warmem Alkohol von 70° extrahiert und die Lösung wieder abgedampft. Die getrocknete Masse wurde dann mit Äther ausgezogen, der alle Fettsäuren, neutralen Fette, Cholestearin und seine Ester, sowie phosphorhaltige Fette extrahierte. Der im Äther nicht lösliche Teil war in der Regel klebrig, leicht gelblich und unansehnlich. Er löste sich leicht in warmem Alkohol, langsam in kaltem Alkohol und Wasser. In kaltem Alkohol zeigte er leichte Opaleszenz, die schnell beim Kochen verschwand und beim Abkühlen wiederkehrte. Er löste sich auch in Chloroform mit

---

*) TALLQUIST diskutiert die Möglichkeit, daß bei den perniziösen Anämien durch pathologische Stoffwechselveränderungen eine pathologische Absonderung hämolytischer Lipoidstoffe stattfindet und das ursächliche Moment darstellt.

**) In einer neueren Arbeit berichtet FUKUHARA über die hämolytischen Wirkungen der Organautolysate. Die Eigenschaften decken sich im wesentlichen mit den von KORSCHUN und MORGENROTH für die Hämolysine der Organextrakte beschriebenen. Nur wird im Gegensatz zu letzteren Autoren Löslichkeit in physiologischer Kochsalzlösung angegeben.

schwacher Opaleszenz. Die Reaktion einer Lösung dieser Fraktion in Wasser oder Salzlösung war lackmusneutral. Fällung mit Bleiacetat und nachfolgende Ätherextraktion entfernten den größten Teil dieser Fraktion. Der Extrakt gab nach Vertreibung des Äthers und Behandlung mit Schwefelwasserstoff wechselnde Mengen von Fettsäuren, besonders von Ölsäure. Jede starke Säure bringt in dieser Fraktion eine milchige Trübung hervor, die zweifellos auf dem Freiwerden von Fettsäuren beruht. Osmiumsäure schwärzt die Lösung allmählich, während Phosphorwolframsäure einen dicken weißlichen Niederschlag und Brom eine gelbliche Wolke hervorrufen. Die Millonsprobe war negativ; Kalzium- und Bariumsalze rufen stärkere oder schwächere Niederschläge hervor. Chemisch stellte diese Fraktion ein Gemisch verschiedener Seifen dar, bei biologischer Prüfung zeigte sie eine mächtige hämolytische Wirkung nichtspezifischer Natur. Die Erdalkalien machten sie inaktiv. Die Wirkung hörte bei 0° nicht auf und widerstand dem Kochen, wurde aber leicht durch Hinzufügen einer adäquaten Menge indifferenten Serums aufgehoben."

Aus diesen Eigenschaften schließt Noguchi wohl mit Recht, daß die hämolytischen Stoffe der Organextrakte Seifen sind. Daß die Seifen in der Tat hämolytisch wirken, ist meines Wissens zuerst von mir in Gemeinschaft mit Kyes (Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 2—4) besonders hervorgehoben worden, und wir haben damals bereits die Vermutung ausgesprochen, daß die Extrakthämolysine in die Reihe der Fettsäuren und der Seifen gehören. Auch Levaditi diskutiert die Möglichkeit, daß es sich bei den thermostabilen Extrakthämolysinen um derartige Stoffe handelt, und ebenso sind Landsteiner und seine Mitarbeiter zu der gleichen Auffassung gelangt*). Noguchi hat die hämolytische Wirksamkeit verschiedener Seifen miteinander verglichen und festgestellt, daß die hämolytische Wirkung der Seifen um so ausgesprochener ist, je löslicher die Seifen sind. Die Oleate sind fast zehnmal stärker wirkend als die entsprechenden Stearinseifen. Durch Zusatz von Serum oder Eiweißstoffen wird, wie Noguchi sowie von Liebermann gezeigt haben, die hämloytische Wirkung der Seifen aufgehoben, ebenso wie die entsprechende Wirkung der Extrakthämolysine**). Diese mit Serum versetzten Seifen resp. Extrakthämolysine sollen nun nach Noguchi komplementäre Wirkungen ausüben. Den Beweis dafür erblickt Noguchi darin, daß Gemische von Seifen und inaktiviertem Meerschweinchenserum (auf 51° erhitzt!) normale Blutkörperchen nicht lösten, dagegen die Hämolyse von ambozeptorbeladenen Blutkörperchen verursachten. Allerdings macht Noguchi auf einen Unterschied in der Wirkungsweise der genuinen und der künstlichen Komplemente aufmerksam. Die Seifenserumgemische wirkten nämlich viel langsamer hämolytisch als das native Serum. Weitere Beweise für die Komplementnatur der Gemische von Seife und Serum erblickte Noguchi in folgenden Eigenschaften:

1. Spontanes Verschwinden der komplementären Eigenschaften,
2. Inaktivierung bei 56°,
3. Ausbleiben der hämolytischen Wirkung bei 0°,
4. Hemmende Wirkung verschiedener Säuren, Alkalien und Salze,
5. Inaktivierung durch Zellelemente,

*) Neuerdings haben Landsteiner und Raubitschek auch alkohollösliche hämolytische Substanzen aus Trypanosomen und Bakterien, sowie Kulturflüssigkeiten dargestellt.

**) Eieralbumin erscheint nach Angaben von K. Meyer, sowie Friedemann und F. Sachs nicht immer die Seifenhämolyse zu hemmen.

6. Hemmender Einfluß von Schutzstoffen, aus Organen und Zellen gewonnen,
7. Zerstörung durch photodynamische Wirkung.

Hingewiesen sei auch auf die von NOGUCHI untersuchten bakteriziden Eigenschaften der Seifen und auf seine Beobachtung, daß Mischungen von Seifen und inaktivierten Immunseris eine vollkommenere Zerstörung der Bakterien hervorbrachten als Seifen allein. Vgl. auch die Untersuchungen von LANDSTEINER und EHRLICH über „bakterizide Wirkung von Lipoiden und ihre Beziehung zur Komplementwirkung".

v. LIEBERMANN ist, von etwas anderen Gesichtspunkten ausgehend, zu den gleichen Schlußfolgerungen wie NOGUCHI gelangt. Den Ausgangspunkt seiner Untersuchungen bildeten Beobachtungen, denen zufolge es ihm gelegentlich gelungen ist, Immunsera durch Filtrieren durch schwedisches Filtrierpapier derart zu inaktivieren, daß eine Reaktivierung durch Herunterspülen des auf dem Filter gar nicht sichtbaren Rückstandes mit dem inaktivierten Serum gelang. Beim Filtrieren von Immunseris, die auf 56° erhitzt waren, blieben beim Filtrieren merkliche Rückstände, in denen neben höheren Fettsäuren Kalk gefunden wurde. Wurden die Rückstände mit verdünnter Salzsäure erwärmt, und die Flüssigkeit mit Äther ausgeschüttelt, so hinterließ der Äther einen in Alkohol und verdünnter Sodalösung löslichen Rückstand. Die Salzsäurelösung ergab mit Ammoniak und oxalsauren Ammoniak starke Trübung. Diese Beobachtung veranlaßte v. LIEBERMANN, seine Aufmerksamkeit den Fettsäuren und Seifen zuzuwenden. Er stellte fest, daß den Eiweißkörpern und schon dem Serumalbumin eine die hämolytische Wirkung der Seifen hemmende Eigenschaft zukommt, und erblickt darin die Ursache dafür, daß die Seifen trotz ihrer nicht unerheblichen Konzentration im normalen Blutserum (nach KORERT 0,12 %) die Blutkörperchen nicht zerstören. Ähnlich wie Eiweißkörper wirken nach v. LIEBERMANN auch Kalksalze inaktivierend auf Seifen; kalkentziehende Mittel restituieren wieder die hämolytische Wirksamkeit. Darin erblickt v. LIEBERMANN eine Analogie zu dem Verhalten der Serumkomplemente, die ja auch durch Calciumchlorid inaktiviert werden können. Eine weitere Analogie in dem Verhalten der Komplemente und der Seifen erblickt v. LIEBERMANN darin, daß beide durch Alkalien inaktiviert werden können. Ebenso soll Säure die Seifen sowie die Komplemente inaktivieren. FRIEDEMANN und FRITZ SACHS konnten die hemmende Wirkung von Alkali auf die Seifenhämolyse bestätigen, wogegen sie bei Säurewirkung eher eine Verstärkung konstatierten. v. LIEBERMANN hat ferner aus Blutserum durch Alkoholextraktion die Seifen dargestellt und auch deren hämolytische Wirksamkeit nachgewiesen. Die Schlußfolgerung v. LIEBERMANNS ist die, daß die Seifen im Blutserum durch das gleichzeitig vorhandene Eiweiß in inaktiver Form vorhanden sind, und daß die Ambozeptoren der Immunsera Substanzen sind, welche die Eigenschaft haben, diese Seifen frei und wirkungsfähig zu machen. Den Nachweis dafür hat v. LIEBERMANN allerdings nicht erbracht, sondern er hat nach bekannten chemischen Substanzen gesucht, die ebenso wirken wie die Ambozeptoren, denen er Säurenatur vindizieren zu müssen glaubt. Für einen solchen Körper, der ebenso wie die Ambozeptoren wirkt, hält v. LIEBERMANN die Ölsäure. Er gibt an, daß beim Zusetzen einer solchen Menge von Ölsäure, welche an und für sich noch keine Hämolyse bewirkt, zu einem inaktiven Gemisch von Seife und Serumalbuminlösung wieder Hämolyse eintritt*).

*) Die Ölsäure allein soll die Blutkörperchen agglutinieren.

Dieses Gemisch von Ölsäure, Seifen und Serumalbumin wird nach von Liebermann durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 55—60° inaktiviert. Bei Zusatz von Seifenlösung mit oder ohne Serumalbumin zu einem derart inaktivierten Gemenge tritt wiederum Hämolyse ein. Auf Grund dieser Erfahrungen folgert von Liebermann, daß sich Gemische von Seifen, Ölsäure und Serumalbumin überraschend ähnlich verhalten, und daß die Ölsäure die Rolle eines Ambozeptors, die Seife diejenige eines Komplements spielt. Er gibt noch an, dazu gelangt zu sein, Schweineserum durch Zusatz von Ölsäure für Schweineblutkörperchen hämolytisch gemacht zu haben. Allerdings wird nicht verschwiegen, daß eine Reaktivierung des durch Erhitzen inaktivierten Gemisches von Ölsäure und Schweineserum mit frischem Serum nicht gelungen ist.

Es sei schließlich noch folgender Versuch v. Liebermanns erwähnt: Es wurde eine Emulsion durch Schütteln von 0,5 ccm Ölsäure, 1 ccm Schweineserum und 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Mischt man 0,2 ccm dieses Gemisches mit 2 ccm 5 $^0/_0$ igen Schweineblutes, so tritt nur sehr langsam Hämolyse ein; fügt man aber dem gleichen Gemisch noch 2 ccm Schweineserum hinzu, so tritt fast momentan vollständige Hämolyse ein. Auch in diesem Versuch erblickt von Liebermann eine Stütze für die Ambozeptornatur der Ölsäure, muß allerdings gleichzeitig angeben, daß die Hämolyse nicht eintritt, wenn man Emulsion und Serum mischt und dann erst die Blutkörperchen hinzufügt.

Weiterhin haben von Liebermann und von Fenyvessy eine Analogie zwischen natürlichen Komplementen und Seifenalbumingemischen darin erblickt, daß sie nachweisen konnten, daß auch letztere beim Verdünnen an hämolytischer Wirksamkeit zunehmen. Als künstlicher Ambozeptor diente den Autoren zu diesen Versuchen ein auf 60° erhitztes Gemisch von Seifenalbumin und Ölsäurelösung.

So sind also von Liebermann einerseits, Noguchi andererseits zu der gleichen Anschauung gelangt, daß nämlich die natürlichen Komplemente des Blutserums Verbindungen von Seifen und Eiweißkörpern sind, oder wie es von Liebermann und Fenyvessy neuerdings ausgedrückt haben, „daß die Komplemente den Seifeneiweißverbindungen (oder Gemengen) ähnlich gebaute Körper sind". Man darf aber bei Übersehen des von den Autoren beigebrachten Tatsachenmaterials nicht außer acht lassen, daß es sich hierbei vorläufig nur um eine Hypothese handelt, die sich auf eine Reihe von Analogien stützt, welche vielleicht rein formaler Natur sind. Eine Reihe von Arbeiten, die durch die Befunde von Liebermanns und Noguchis hervorgerufen wurden, sind allerdings zu Ergebnissen gelangt, welche der Seifennatur der Komplemente widersprechen. So hat zunächst Hecker gezeigt, daß ambozeptorbeladene Blutkörperchen nach Entfernung der Serumbestandteile durch Zentrifugieren sich der hämolytischen Wirkung der Seifen gegenüber resistenter verhalten als normale Blutkörperchen, ein Befund, der sehr berechtigte Zweifel an der Identität von Komplement und Seife ergeben muß, und der durch von Dungern und Coca einerseits, durch von Liebermann und Fenyvessy selbst andererseits, vollinhaltlich bestätigt wurde. Die von letzteren Autoren gegebene Erklärung, daß nämlich die durch das Immunserum bedingte Agglutination durch die verminderte Oberfläche eine höhere Resistenz gegenüber hämolytischen Agentien verursacht, dürfte nicht ganz zutreffend sein, denn erfahrungsgemäß werden ambozeptorbeladene Blutkörperchen, wenigstens unter den von Hecker benutzten Mengenverhältnissen durch komplettierende Sera weit rascher gelöst als

solche, denen erst gleichzeitig mit dem Komplement der Ambozeptor zugesetzt wird.

Ich erwähne ferner die von SACHS und ALTMANN beschriebene Tatsache, daß Seifenlösungen (oleinsaures Natron) antikomplementär wirken können, was auch gegen die Seifennatur der Komplemente sprechen dürfte. Eine Nachprüfung der von NOGUCHI erhobenen Befunde, daß inaktive Gemische von Seife und Serum unter Mitwirkung von Ambozeptoren hämolytisch wirken, durch HECKER, führte zu einem negativen Ergebnis. Es zeigte sich, daß, sofern eine Aktivierung durch das Seife-Serumgemisch eintritt, sie auf einen Komplementgehalt des Serums bezogen werden mußte. Zu ganz ähnlichen Ergebnissen gelangten VON DUNGERN und COCA. Auch diese Autoren konnten die Angaben NOGUCHIS nicht bestätigen und fanden nur bei Verwendung von Meerschweinchenserum, das auf 60° erhitzt war, eine so geringgradige Verstärkung der Hämolyse durch Seifenzusatz, daß sie eine einfache Summationserscheinung für wahrscheinlich halten. Jedenfalls ist nach ihnen eine Identität von Seife und Komplement ausgeschlossen, zumal sie auch ebenso wie SACHS und ALTMANN eine die Komplementhämolyse hemmende Wirkung der Seifen bestätigen konnten. Ebenso wenig gelang es BAUER, durch Mischungen von hämolytischen Organextrakten und Blutserum Komplementwirkungen im Sinne NOGUCHIS nachzuweisen. VON DUNGERN und COCA machen mit Recht darauf aufmerksam, daß die Tatsache allein, daß zwei Substanzen zusammen hämolytisch wirken, wenn sie einzeln inaktiv sind, noch nicht genügt, um sie als in denselben Beziehungen wie Ambozeptor und Komplement stehend, aufzufassen. Es können in der Tat bei derartigem Zusammenwirken zweier Komponenten, zumal wenn es sich um solche handelt, die in größeren Mengen an und für sich hämolytisch wirken, Summationswirkungen oder auch chemische Reaktionen vorliegen, welche mit den Ambozeptor-Komplementwirkungen nichts zu tun haben. Eine Warnung in dieser Hinsicht erscheint durchaus am Platze, da man heute sehr oft der Neigung begegnet, rein formale Analogien als hinreichend zu betrachten, um Vorgänge ganz verschiedener Art in gleicher Weise zu deuten. So dürften „Versuche über Hämolyse“, die neuerdings von ARRHENIUS mitgeteilt wurden, trotz der daraus gezogenen Schlüsse wenig mit den Ambozeptor-Komplementwirkungen zu tun haben.

Man muß allerdings v. LIEBERMANN und v. FENYVESSY darin recht geben, daß sie für Nachprüfungen verlangen, nicht reine Seifenlösungen, sondern Gemische von Seifenlösungen und Eiweißkörpern entsprechend der von ihnen gegebenen Definition als künstliche Komplemente zu verwenden. Die Autoren suchten auch neuerdings einem durch v. DUNGERN und COCA aufgestellten Postulat gerecht zu werden und ähnliche Bindungsverhältnisse für die künstlichen Ambozeptor- und Komplementgemische zu beweisen, wie sie für die natürlichen Hämolysine nach EHRLICH und MORGENROTH bestehen. Sie beschreiben einen Versuch, demzufolge ihnen die Trennung von Ambozeptor und Komplement aus dem künstlichen Gemisch gelungen sei. Als künstliches Immunserum diente dabei ein Gemisch von Ölsäure, Ölseifen und Albumin, das innerhalb einer Stunde komplett löste. Wurde nach halbstündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur zentrifugiert, so war keine Hämolyse eingetreten. Die Sedimente lösten sich in einem an und für sich unwirksamen Gemisch von Seife und Albumin, die Abgüsse lösten in Kombination mit einer an und für sich unwirksamen Dosis von Ölsäure. Auch bei diesem Versuch ist aber nicht ersichtich, ob es sich nicht um

Summationswirkungen handelt, da die Angabe fehlt, ob die verwandten Reagentien nicht etwa in doppelter Menge bereits an und für sich lösten. Daß sich die mit dem künstlichen Immunserum vorbehandelten Sedimente in einem Gemisch von Albumin und Seife lösen, kann überdies dadurch verursacht sein, daß eine gewisse Quantität Ölsäure und Seifen, die vielleicht erst nach sehr langer Zeit hämolytisch wirkt, von den Blutkörperchen gebunden ist und nunmehr durch Hinzusatz von Serumalbumin die beschleunigte Hämolyse augelöst wird. v. Liebermann hat ja beschrieben, daß eine Kombination von Ölsäure und Serum, welche, vor dem Blutzusatz gemischt, keine Hämolyse bedingt, momentan Hämolyse auslöst, wenn die Blutkörperchen zuerst mit der Ölsäure digeriert werden und erst später den Serumzusatz erhalten, und v. Dungern und Coca haben gezeigt, daß man die Ölsäure bei diesem Versuch auch durch Seife ersetzen kann, und das frische Serum durch auf 60—70° inaktiviertes. Daraus geht deutlich hervor, daß die durch v. Liebermann gezogenen Schlußfolgerungen, daß Ölsäure als Ambozeptor, das Serum als Komplement fungiert, nicht richtig sein können.

Interessante Aufklärungen über dieses eigenartige Phänomen haben die neueren Untersuchungen von Fritz Sachs erbracht. Er zeigte nämlich, daß man dabei mit der Verdünnung des Serums ziemlich weit heruntergehen kann, daß ferner das Phänomen nur dann ausgesprochen gelingt, wenn man solche Seifendosen benutzt, die, wenn auch erst in längerer Zeit, an und für sich hämolytisch wirken. Von besonderem Interesse war, daß man zur Auslösung des Phänomens nicht einmal Serum braucht, sondern daß ein Zusatz von Alkalien zu den mit Seife vorbehandelten Blutkörperchen genügt. Was dabei den Ersatz der Seife durch andere Körper anlangt, so zeigte es sich, daß man die Seife durch Lecithin ersetzen kann, aber nur durch solche Lecithinpräparate, welche an und für sich hämolytisch wirken, und welche diese Fähigkeit vielleicht Beimengungen (Seifen) verdanken. Der Vorstellung einer durch das Serum bedingten Fermentwirkung entspricht nicht die Koktostabilität des Serums in bezug auf die Erzeugung des Phänomens. Trotz Säurezusatzes bis zur amphoteren Reaktion zeigte das Serum seine Wirksamkeit in unveränderter Stärke. Durch Extraktion mit Äther wurde die Wirksamkeit gesteigert, dabei aber die alkalische Reaktion des Serums nicht unerheblich vermehrt. In einer weiteren Arbeit haben Friedemann und Fritz Sachs noch weitere Versuche über die Seifenhämolyse angestellt, auf die hier verwiesen sei. Bemerkenswert ist die rasche Bindung der lösenden Seifendosis an die Blutzellen, und die Feststellung der Tatsache, daß die Blutzellen aus einem unwirksamen Gemisch von Seife und Serum erstere nicht binden. Eine kritische Analyse der v. Liebermannschen Befunde führte die Autoren zu dem Ergebnis, daß bei den wesentlichen Versuchen Summationswirkungen nicht auszuschließen sind, und daß die von Noguchi erhaltenen Resultate durch noch vorhandene Anteile natürlicher Komplemente vorgetäuscht sein können.

Die von Sachs und Altmann beschriebene antikomplementäre Wirkung der Seifen suchen von Liebermann und von Fenyvessy neuerdings durch den Alkaligehalt der Seifenlösungen zu erklären, wie dies übrigens auch schon die erstgenannten Autoren versucht haben. Sie beschreiben einen Versuch mit großen Mengen komplettierenden Serums, in dem allerdings eine äußerst minimale Verstärkung der Hämolyse durch Seife wahrgenommen wurde. Man wird auch hierbei Kontrollen, welche eine Summation ausschließen, fordern müssen. Zur Erklärung führen

die beiden Autoren an, daß bei Anwendung großer Serummengen die Zunahme der Alkalinität durch den Seifenzusatz keine Rolle spielt. Ferner diskutieren sie die Möglichkeit, daß die Seifen im natürlichen Serum zum Teil an eine bisher unbekannte Substanz gebunden sind, und daß nur dieser Teil der Seife als Komplement in Betracht kommt. Von dieser unbekannten Substanz könnte in manchen Seris noch ein Überschuß vorhanden sein, und dieser Teil könnte bei Seifenzusatz zu einer Steigerung der Komplementwirkung führen; dagegen würde der an Serumeiweiß gebundene Teil der zugesetzten Seifen als Komplement unwirksam sein.

Nach alledem wäre es jedenfalls heute verfrüht, Seifen oder andere lipoidartige Körper, resp. ihre Eiweißverbindungen als Träger der Komplementwirkungen anzusprechen. Der Beweis dafür ist vorläufig nicht erbracht. Auch von Korányi weist auf einige Ähnlichkeiten zwischen natürlichen Komplementen und künstlichen Seife-Albumingemischen hin, bemerkt aber, einen wesentlichen Unterschied darin erblickt zu haben, daß die Seife eine spezifische Bindung durch das Zusammenwirken von Antigen und Antikörper nicht erfährt. Neuerdings haben Neufeld und Händel gezeigt, daß die Komplementhämolyse sich schon morphologisch von der Seifenhämolyse unterscheiden läßt, und sie sehen bereits darin einen Grund dafür gegeben, daß erstere keine Seifenwirkung sein könne. Wenn aber auch einige andere Umstände (so die erhöhte Resistenz der ambozeptorbeladenen Blutzellen gegenüber der Seifenwirkung, die antikomplementäre Wirkung der Seifen) geradezu eher gegen als für die Lipoidtheorie sprechen, so braucht ein weiteres Vordringen auf dem beschrittenen Wege doch noch nicht aussichtslos zu erscheinen. Ist ja unsere Kenntnis von den Lipoiden und besonders von ihren physiologischen, toxischen (hämolytischen) Funktionen noch ziemlich in den Anfängen, und es handelt sich allem Anschein nach um recht komplizierte Verhältnisse, deren nähere Analyse vielleicht später Tatsachen, welche heute gegen die Lipoidnatur der Komplemente ins Feld geführt werden, nur als scheinbare Widersprüche erscheinen läßt.

Dautwitz und Landsteiner halten es auch für einigermaßen wahrscheinlich, daß die Komplemente den Lipoiden nahe stehen, vielleicht Lipoid-Eiweißverbindungen sind. Sie gelangen zu diesem Schluß mit Rücksicht darauf, daß fettartige Stoffe (Protagon, Cholestearin) eine die Komplementwirkung hemmende Wirkung ausüben (Landsteiner und Stankovic), ferner mit Rücksicht darauf, daß fettlösende Mittel (Äther) die Komplemente so leicht zerstören, und endlich erblicken sie eine Analogie in der komplementartigen Wirkung von Lecithin und anderen fettartigen Stoffen bei der Aktivierung der Schlangengifthämolysine, wie dies ja bereits Kyes getan hat.

Andererseits muß bemerkt werden, daß die Thermolabilität von Eiweiß-Lipoidgemischen auch dann, wenn die Interferenz von natürlichen Komplementen ausgeschlossen ist, nicht notwendig im Sinne einer Komplementnatur der Lipoid-Eiweißverbindungen aufgefaßt werden muß. Da nämlich die Lipoide mit den Eiweißstoffen leicht reagieren, und diese Reaktion von gewissen Bedingungen abhängig ist, so ist es leicht möglich, daß beim Erhitzen der Gemische solche Veränderungen eintreten, welche eine Bindung der Lipoide und dadurch eine Aufhebung ihrer hämolytischen Funktion zur Folge haben. In der Tat haben bereits Kyes und Sachs gezeigt, daß ein Gemisch von Hämoglobin und Lecithin Kobragift aktiviert, aber dann unwirksam wird, wenn das

Gemisch oder das Hämoglobin allein auf 62° erhitzt ist. In diesem Falle verläuft die Reaktion, wie Sachs hervorhebt, offenbar in zwei Stadien, indem zunächst durch das Erhitzen das Hämoglobin verändert wird und erst das alterierte Hämoglobin Lecithin bindet.

Daß in anderen Fällen auch die gegenteiligen Verhältnisse bestehen können, darauf sei hier nur kurz hingewiesen. Es ist ja bekannt, daß die lipoidartigen Stoffe des Blutserums, welche die Aktivierung des Kobragiftes bedingen, in vielen Modifikationen erst bei einem Erhitzen des Blutserums über 62° „disponibel" werden, und ebenso wird die Fähigkeit des Blutserums bei Syphilis im Verein mit Lipoiden durch die Wassermannsche Komplementbindung zu reagieren, wie jüngst Sachs gezeigt hat, durch Erhitzen auf 62° aufgehoben*). Es bedarf daher noch weiterer Aufklärung, wieso Eiweißstoffe durch Erhitzen einerseits so verändert werden können, daß sie Lipoiden nunmehr ihre biologische (hämolytische) Wirkung entziehen, andererseits derart, daß sie gerade durch den thermischen Eingriff die Reaktionsfähigkeit mit den Lipoiden einbüßen.

Daß auch die hämolytische Wirkung von Ölsäure und ölsaurem Kalium in Gemischen mit Pferdeserum durch Erhitzen auf 60°—65° aufgehoben werden kann, haben Landsteiner und Ehrlich gezeigt. Aus dem gleichzeitig von ihnen erhobenen Befund, daß die Inaktivierung erst bei 65° resp. 60°, bei 60° resp. 55° aber noch nicht eintritt, ergibt sich gleichzeitig, daß es sich dabei nicht etwa um Analoga der Komplemente handelt. Bauer beschreibt ebenfalls eine Inaktivierung von hämolytisch wirksamen Gemischen von Organextrakten und Blutserum durch Erhitzen auf 56°—80°.

Friedemann und Fritz Sachs haben auch ein erhebliche Abschwächung der Gemische von Seife und Serum beim Erhitzen auf 70° beobachtet, wobei sie bemerkten, daß mittlere Dosen des erhitzten Gemisches stärker hämolytisch wirkten als höhere. Eine entsprechende Inaktivierung der Seife durch Mischen mit vorher erhitztem Serum konnten diese Autoren nicht erzielen, und sie schließen, daß das Erhitzen auf 70° eine Verfestigung der Bindung zwischen Seife und Serum herbeiführt. Man wird vielleicht daran denken müssen, daß bei dieser Inaktivierung die durch das Erhitzen der Sera entstehende Alkaleszenzsteigerung beteiligt ist, da man ja durch v. Liebermann, sowie Friedemann und Sachs weiß, daß Alkalien die Seifenhämolyse hemmen. Jedenfalls ist die Tatsache der Inaktivierung der Seife-Serumgemische für die Frage der Komplementnatur der Seifen, wie auch Friedemann und Sachs hervorheben, belanglos, kann aber zu einer Vortäuschung von Komplementen Anlaß geben.

Im Anschluß an die Besprechung der vermuteten Beziehungen zwischen Komplementen und Seifen sei hier auch auf die Arbeiten von Neuberg und seinen Mitarbeitern hingewiesen, welche einen ursächlichen Zusammenhang zwischen hämolytischen und lipolytischen Fähigkeiten supponieren. Nachdem Neuberg und Rosenberg gezeigt hatten, daß verschiedene Agglutinine (Crotin, Ricin) und Hämolysine (Schlangengifte und Bienengift) Fettspaltungsvermögen besitzen, haben Neuberg und Reicher diese Versuche, auch auf die Antisera ausgedehnt. Soweit die hämolytischen Sera in Betracht kommen, liegt ein Versuch der zuletzt ge-

---

*) Daß übrigens die bei der Wassermannschen Beaktion wirksamen Lipoide mit den hämolytischen (Seifen) sehr wahrscheinlich identisch sind, darauf weisen offenbar die von Sachs und Altmann, sowie von Bauer erhobenen Befunde hin.

nannten Autoren vor, aus dem hervorgeht, daß ein Gemisch von einem hämolytischen Immunserum mit normalem Meerschweinchenserum (Komplement) erheblich stärker Olivenöl und Lecithin spaltet, als Meerschweinchenserum allein. Eine Kontrolle, welche das lipolytische Vermögen des Immunserums an und für sich betrifft, ist allerdings ebenso wenig ersichtlich wie eine Bestimmung der Spaltung durch ein Gemisch des entsprechenden Normalserums mit dem komplettierenden. Weitgehende Schlüsse dürften daher vorläufig nicht gezogen werden können. Neuberg und seine Mitarbeiter betonen auch selbst, daß es natürlich vorderhand eine offene Frage bleiben muß, ob Lipolyse und Hämolyse zufällige Begleiterscheinungen sind, oder ob ein ursächlicher Zusammenhang zwischen beiden besteht. Wenn auch Neuberg eine Trennung von lipolytischen und hämolytischen, resp. agglutinierenden Fähigkeiten (bei Verwendung von Ricin und Pankreassaft) nicht gelungen ist, so bleibt die Frage doch unbeantwortet. Man wird Neuberg darin recht geben müssen, daß man den Lipasen in bezug auf hämolytische Wirkungen in vitro und in vivo Aufmerksamkeit zu schenken hat, seitdem man die direkte hämolytische Wirkung einer Reihe von Lipoidsubstanzen und ihre indirekte Beteiligung bei der Hämolyse kennen gelernt hat.

Es wäre aber doch vorläufig nicht begründet, die hämolytischen Serumwirkungen als lipolytische anzusprechen. Selbst bei denjenigen komplexen hämolytischen Wirkungen, bei denen Lipoide beteiligt sind, und welche den Ausgangspunkt für die hier erörterten Richtungen bilden — ich meine die lecithidbildenden Blutgifte —, wäre ja der lipolytische Prozeß kein direkter, sondern würde nur indirekt zu hämolytisch wirkenden Stoffen führen. Den koktostabilen fertigen Reaktionsprodukten, dem Cobralecithid etc., wird man schwerlich eine enzymatische lipolytische Wirkung zuschreiben können*).

Das gleiche gilt für die von Noguchi beschriebene lipolytische Form der Hämolyse. Es handelt sich hier um eine Hämolyse durch das Zusammenwirken von Fetten und Pankreaslipase. Die Lipase wirkt aber nicht an und für sich hämolytisch, sondern indirekt, indem durch ihre Einwirkung auf Lipoide enthaltende Säfte, wie Blutserum, Fettsäuren frei werden, die sowohl in freier, als auch in Seifenform als stark wirkende hämolytische Agentien bekannt sind. Um ganz ähnliche Verhältnisse handelt es sich offenbar bei dem von U. Friedemann beschriebenen Hämolysin der Bauchspeicheldrüse. Auch hier scheint eine kombinierte Wirkung von Pankreaslipase und Serumfetten oder Lecithin vorzuliegen, sei es daß es sich um eine Lecithidbildung im Sinne von Kyes oder um eine Fettspaltung im Sinne von Noguchi handelt**).

---

*) Landsteiner und Ehrlich weisen in diesem Zusammenhange auf die von Landsteiner und Jagič entdeckte Eigenschaft der kolloidalen Kieselsäure, im Verein mit Lecithin oder frischem Blutserum hämolytisch zu wirken hin, wobei eine Fermentation wohl auszuschließen sei. Landsteiner und Jagič haben diesen Vorgang der Hämolyse mit der Ambozeptorwirkung analogisiert. Die Analogie ist allerdings, wie ich bereits an anderer Stelle erwähnt habe, auch in formaler Hinsicht keine vollständige. Ebenso weisen die neueren Untersuchungen v. Dungerns und Cocas Unterschiede zwischen Kieselsäure- und Amboceptorwirkung auf, wenngleich es diese Autoren für nicht unmöglich halten, daß die wirksamen labilen Stoffe des Blutserums, welche die „Aktivierung" der Kieselsäure besorgen, mit den Komplementen identisch sind.

**) Verwiesen sei auf die älteren Beobachtungen von Delezenne, denen zufolge Pankreassaft und Darmsaft vereint hämolytisch wirken, während die einzelnen Komponenten inaktiv sind.

Zu analogen Ergebnissen gelangte auch Wohlgemuth, der zugleich die gelungene Darstellung eines Lecithids aus Pankreassaft und Lecithin beschreibt. In neueren Untersuchungen konnte Wohlgemuth zwar das Hämolysin und die Lipase des Pankreassaftes nicht von einander trennen, gelangte aber zur Gewinnung eines tryptisch inaktiven Pankreassaftes, der in Übereinstimmung mit den Angaben Delezennes an und für sich hämolytisch unwirksam war, aber trotzdem die lipolytische Fähigkeit besaß. Neuberg und Reicher verglichen hämolytische und lipolytische Wirkungen von Magen- und Pankreassäften und fanden beide proportional. Es ist sehr wohl möglich, ja es erscheint sogar wahrscheinlich, daß insbesondere bei der hämolytischen Wirkung des Pankreassaftes hämolytische und lipolytische Wirkung ursächlich im Zusammenhang stehen, aber doch wohl in dem Sinne, daß durch die Lipase primär ein hämolytisches Reaktionsprodukt entsteht, das erst sekundär die Hämolyse bewirkt. Ob aber durch Lipasen die Blutkörperchen in der Weise angegriffen werden können, daß eine direkte Zerstörung der Lipoidschicht und dadurch Hämolyse entsteht, muß vorläufig dahingestellt bleiben. Und besonders scheint bis heute für die uns hier beschäftigenden hämolytischen Serumwirkungen ein lipolytischer Vorgang als Grundlage des hämolytischen Prozesses dem Verständnis noch wesentliche Schwierigkeiten zu bereiten.

6. Über Schwankungen des Komplementgehaltes.

Über Schwankungen des Komplementgehaltes bei den verschiedenartigsten Beeinflussungen des Organismus oder unter pathologischen Verhältnissen liegen eine große Reihe von Arbeiten vor. Leider ist ein nicht unerheblicher Teil derselben, besonders auch älterer Arbeiten, für die direkte Frage des Komplementgehaltes nicht zu verwerten, da die Autoren oft nur die hämolytische Fähigkeit des Serums an und für sich prüften und nicht strenge entschieden, ob es sich dabei um Vermehrung oder Verminderung der Ambozeptoren oder der Komplemente, oder endlich beider Komponenten handelte*). Es kommt natürlich beim strikten Nachweis von Schwankungen des Komplementgehaltes darauf an, die Komplemente isoliert zu bestimmen, indem man, wie dies im Kapitel über „Vorkommen und Nachweis der Komplemente“ ausführlich erörtert wurde, den Ambozeptor gesondert, zweckmäßig in überschüssiger Menge einführt und womöglich, wenn es angängig ist, die Blutkörperchen vorher mit den Ambozeptoren „senbilisiert“.

Eine Abnahme des Komplementgehaltes bei Schädigungen des Organismus wurde zuerst von Ehrlich und Morgenroth beobachtet. Ehrlich und Morgenroth stellten fest, daß unter dem Einfluß der Phosphorvergiftung der Komplementgehalt schwindet. Bestätigende Versuche wurden von Lüdke mitgeteilt. Darnach tritt die Verminderung des Komplementgehaltes rascher und intensiver ein, wenn Kaninchen Phosphor in Form 2 %iger Phosphoröllösung (1 ccm) intravenös gegegeben wird. Diese Dosis tötete innerhalb 10—24 Stunden; der Komplementgehalt war bereits nach 4—5 Stunden sehr erheblich gesunken. Subkutan mußten 3 ccm der 2 %igen Lösung gegeben werden, um nach

*) Ein großer Teil der einschlägigen Untersuchungen ist daher bereits im ersten Abschnitt (Gewinnung und Vorkommen der Hämolysine) angeführt. Die gleichfalls hier interessierenden Arbeiten über das Verhalten des Blutserums bei der Urämie sind im Kapitel „Ambozeptoren“, Teil 5, bereits besprochen worden.

etwa acht Stunden eine erhebliche Reduktion des Komplementgehaltes zu bewirken.

Nach v. Bergmann und Savini wäre, wie schon erwähnt, der Komplementschwund bei Phosphorvergiftung darauf zurückzuführen, daß in der degenerierten Phosphorleber Stoffe auftreten, die im eigenen Organismus zur Antikörperproduktion führen und durch komplexe Wirkung die Komplemente binden.

Von weiteren Angaben über Komplementverminderung oder Komplementschwund seien erwähnt die Arbeiten von Métalnikoff, Simnitzky und Lüdke (chronische Eiterung und Abszeßbildung), von Bentivenga und Carini, Lüdke (Nahrungsentziehung), Abbot und Bergey (Alkoholvergiftung). Nach Sweet erfolgt bei dem durch Pankreasexstirpation verursachten Diabetes eine Verminderung der hämolytischen Fähigkeit des Serums, die auf Komplementmangel beruhen soll. Dagegen bewirkt nach dem gleichen Autor die durch Phlorhidzin erzeugte Glykosurie einen Anstieg des Komplementgehaltes, was Lüdke auch durch Pilokarpininjektion erreicht haben will. Lüdke fand bei graviden Tieren den Komplementgehalt normal, beobachtete aber, daß kindliches Serum in den ersten Tagen des extrauterinen Lebens eine relativ geringe Menge an Komplementvorrat besitzt*).

Rywosch fand im embryonalen Hühnerblut neben Ambozeptormangel auch einen vollständigen Komplementmangel, wogegen im fötalen Rinder- und Schweineserum in Übereinstimmung mit Sachs wesentlich Ambozeptormangel und Komplementvorrat konstatiert wurden.

Was den Komplementgehalt der Sera bei erhöhter Wärmezufuhr anlangt, so gelangte Lüdke nicht zu gleichsinnigen Resultaten. Bei manchen Versuchstieren (die Tiere wurden bei 40—45° gehalten) war eine Steigerung, bei manchen eine Abnahme, bei anderen ein Gleichbleiben des Komplementgehaltes zu verzeichnen.

Nagelschmidt untersuchte die Einwirkung der Kälte auf das hämolytische Vermögen der Sera. Er verfuhr zu diesem Zwecke in der Weise, daß er die Tiere verschieden lange Zeit, meist 20 Minuten bis eine halbe Stunde, bis an den Hals in Wasser von 5—7° eintauchte. Die Tiere wurden dann abgetrocknet, und erst nach einigen Stunden wurde die hämolytische Wirksamkeit des Serums festgestellt, wobei sich eine erhebliche Einbuße ergab. Die Frage, ob es sich dabei um Ambozeptor- oder Komplementverarmung handelt, konnte Nagelschmidt nicht sicher entscheiden. Sollten sich diese Befunde bestätigen, so würden sie ein nicht unerhebliches Interesse beanspruchen, zumal von Nagelschmidt auch angegeben wird, daß selbst geringfügige Kälteeinwirkung (Eintauchen der Beine in kaltes Wasser) eine Verminderung der hämolytischen Wirkung des Blutserums bedingt**).

Trommsdorff hat bei geschwächten Tieren (Abkühlung, Ermüdung, Hunger, Blutentziehung, Alkohol, Opium) keine konstanten Differenzen im Komplementgehalt nachweisen können. Er fand bei stark geschwächten Tieren auch in der Agonie normalen Komplementgehalt.

---

*) Daß viele fötale Sera durch einen Mangel normaler Ambozeptoren charakterisiert sind, ist schon an anderer Stelle erwähnt worden.

**) Nach Trommsdorff erfährt die Ambozeptorenbildung, nach Lissauer der hämolytische Titer des Serums von mit Hammelblut immunisierten Kaninchen durch starke Kälteeinwirkung (Bäder von 10° usw.) eine Abnahme, durch Erhöhung der Körperwärme (Bäder von 43—49°) nach Lissauer eine Zunahme.

Was die Wirkung von Aderlässen anlangt, so kommt Lüdke wiederum zu keinem eindeutigen Ergebnis. Versuche des letzteren Autors, den Komplementgehalt durch verschiedene Intoxikationen zu beeinflussen (Erzeugung von Ikterus durch Toluylendiamin und Inhalation von Arsenwasserstoff) hatten keinen Erfolg. Lüdke hat dann noch den Einfluß von einigen Blutgiften auf den Komplementgehalt untersucht und durch wiederholte intravenöse Injektion von taurocholsaurem Natrium eine geringgradige Abnahme erzielt, ebenso durch kleine Dosen von pikrinsaurem Kalium. Subkutane Injektionen sehr großer Mengen von chlorsaurem Kalium waren ohne Einfluß. Toluylendiamin bewirkte gelegentlich eine leichte Herabsetzung. Große Dosen von Kochschen Alttuberkulin verursachten Schwankungen im Sinne einer Abnahme. Steigerungen des Komplementgehaltes, die, wie schon erwähnt, bei Phlorizin- oder Pilokarpininjektion beobachtet wurden, wurden bereits von Nolf und Müller nach Injektion indifferenter Substanzen, wie Blutplasma, Bouillon, Aleuronat, Pepton, Hefe, Nuklein, physiologische Kochsalzlösung gesehen. Jedoch handelte es sich dabei nur um eine vorübergehende Steigerung der Komplementmenge, die überdies nicht sehr hochgradig zu sein scheint. Sweet fand auch eine Zunahme von Komplement nach intravenöser Injektion von Staphylokokken, nach subkutaner Injektion von Terpentinöl und intraperitonealer Injektion von Aleuronataufschwemmung. Busse hält nach eigenen Versuchen eine Beeinflussung der hämolytischen Komplemente durch Injektion von Hetol und Hefenukleinsäure nicht für erwiesen.

Eine dauernde Erhöhung des Komplementgehaltes, die ja mit Bezug auf die bakteriziden Ambozeptoren von praktischem Wert wäre, ist bisher nicht gelungen. Dagegen kommen im Laufe der Immunisierung mit artfremden Blutzellen doch gesetzmäßige Schwankungen des Komplementgehaltes vor. Wenn auch frühere Untersuchungen von Düngerns und Bullochs zu dem Ergebnis führten, daß Komplementschwankungen bei Injektion artfremden Blutes nicht wahrzunehmen sind, so zeigte andererseits doch die Untersuchung von Sachs, daß bei genauer Berücksichtigung der zeitlichen Intervalle gesetzmäßige Schwankungen des Komplementgehaltes nicht unerheblicher Art zu beobachten sind. Man kann darnach drei Stadien unterscheiden:

1. Ein Sinken des Komplementgehaltes. — Dieses Stadium tritt ein, wenn sich genügend Ambozeptoren gebildet haben, um das artfremde Blut in Kombination mit dem normal vorhandenen Komplement zu entfernen.

2. Eine Komplementvermehrung. Diese folgt dem vorigen Stadium unmittelbar und ist wohl im Sinne einer übermäßigen Regeneration der für die Eliminierung des Blutes verbrauchten Komplemente aufzufassen.

3. Die Rückkehr zur Norm folgt wiederum sehr schnell dem Stadium der Komplementsteigerung.

Auf das sofortige Verschwinden der Komplemente nach intravenöser Injektion solcher Blutarten, für welche das Serum des Versuchstieres Hämolysine enthält, hatten übrigens schon die Untersuchungen von Schütze und Scheller die Aufmerksamkeit gelenkt, wobei gleichzeitig gezeigt wurde, daß solche Komplementverluste rasch wieder ersetzt werden. Auch Battelli hat analoge Versuche über die Abnahme der Hämolysine bei Injektion artfremder Blutkörperchen beschrieben, und Lefmann hat diese Befunde zum Gegenstand eingehender Analyse ge-

macht und festgestellt, daß dabei in der Tat nicht nur die Ambozeptoren, sondern wesentlich die Komplemente verbraucht werden. TROMMSDORFF hat festgestellt, daß die zuerst von SCHÜTZE und SCHELLER beobachtete Regeneration der Komplemente nach ihrem Verbrauch in vivo bei resistenzschwachen Tieren nicht oder nur in minimalem Umfang eintritt, und erblickt darin eine Schädigung der die Komplemente produzierenden Zellterritorien. Auf andere Maßnahmen, welche eine vorübergehende Verminderung des Komplementgehaltes bedingen, wird in dem Kapitel „antihämolytische Wirkungen" näher einzugehen sein. Es ist ja natürlich, daß alle Maßnahmen, resp. alle Stoffe, welche im Reagenzglas antikomplementär wirken, auch in vivo die analoge Wirkung entfalten. Jedenfalls scheint der Organismus in der Regel eine künstliche Herabsetzung des Komplementgehaltes rasch auszugleichen, so daß ein ziemlich konstantes Gleichgewicht resultiert. So lange man daher nicht über die Ursprungsstätten der Komplemente mehr im klaren ist, als es bis heute der Fall ist, dürfte es schwer sein, den Komplementgehalt dauernd im positiven oder negativen Sinne zu beeinflussen. Die unter normalen Bedingungen vorkommenden Schwankungen sind äußerst variabel. Bei manchen Tierarten findet man gewisse Komplementfunktionen immerhin in fast quantitativ übereinstimmender Weise vorhanden. Andere Tierarten weisen einen überaus wechselnden Bestand an Komplementen auf. Verwiesen sei in dieser Hinsicht auf die Untersuchungen von MORGENROTH und SACHS, welche eine außerordentliche Variabilität des Komplementgehaltes im Pferdeserum in bezug auf Individuum und Zeit ergaben, wobei allerdings auch die große Labilität der Pferdekomplemente in Betracht gezogen werden muß*). In bezug auf Variationen im hämolytischen Vermögen von Transsudaten und Exsudaten sei auf die Arbeiten von H. STRAUSS, LÜDKE und MARSHALL verwiesen. Besonders aus letzterer Arbeit, die sich mit dem hämolytischen Vermögen des menschlichen Blutserums und menschlicher Transsudate und Exsudate beschäftigt, ergibt sich, daß letztere über beträchtliche Komplementfunktionen verfügen. Dabei wurden Differenzen des Komplementgehalts bei Verwendung verschiedener Blutsera und Exsudate festgestellt, und zwar erwiesen sich die Schwankungen in der Komplettierbarkeit gewisser Ambozeptoren unabhängig von denjenigen bei der Komplettierung anderer Ambozeptoren. Analoge individuelle und zeitliche Variationen des Komplementgehalts sind von MORGENROTH und SACHS beim Pferdeserum beschrieben worden. Auch hier differierten die verschiedenen komplettierenden Funktionen unabhängig voneinander.

Was Schwankungen des Komplementgehaltes bei Menschen unter pathologischen Verhältnissen anlangt, so haben die bisherigen Untersuchungen zu keinem wesentlichen praktischen Ergebnisse geführt. KENTZLER und LÜDKE fanden bei der Lungentuberkulose keine Differenzen im Komplementgehalt. Wenn Variationen aufgefunden wurden, so konnten weder ihre Konstanz noch ihr alleiniges Vorkommen bei gewissen Krankheiten festgestellt werden. Über das Verhalten hämolytischer Serumstoffe beim gesunden und kranken Kind handelt eine ausführliche Monographie MOROS. Bezüglich des Komplementgehaltes der Neugeborenen ergab sich, daß in den ersten Tagen der Komplement-

*) Die Labilität der Komplemente macht es überhaupt erforderlich, daß man bei allen vergleichenden quantitativen Komplementbestimmungen auf eine möglichste Übereinstimmung der bei der Gewinnung und Prüfung der Sera erforderlichen Maßnahmen bedacht ist.

gehalt geringer als beim erwachsenen Menschen ist und in der ersten Lebenswoche entweder gleichmäßig zu- oder unbeträchtlich abnimmt. Bei neugeborenen Meerschweinchen wurden dieselben Verhältnisse beobachtet. Bei Kaninchen trat der Vollwert des Komplementgehaltes später ein als beim Meerschweinchen. Bei nichtinfektiösen Krankheiten fand Moro die Komplemente annähernd der Norm entsprechend, während die hämolytische Wirkung der Sera bei Infektionskrankheiten, besonders ausgesprochen bei Typhus, Pneumonie und Tuberkulose, erhöht gefunden wurde. Zu verwertbaren praktisch-diagnostischen Schlüssen ist auch Moro nicht gelangt; er schreibt jedoch der Bestimmung des Komplementgehaltes einen prognostischen Wert zu.

Interessant ist noch die Beobachtung Moros, daß die subkutane Infusion von physiologischer Kochsalzlösung in den Mengen von 20 bis 30 ccm in gewissen Fällen (Säuglinge) eine Steigerung der hämolytischen Fähigkeit des Serums zur Folge hatte.

Auch Gay und Ayer haben jüngst Untersuchungen mitgeteilt, die sich mit Schwankungen des Komplementgehaltes im menschlichen Blutserum beschäftigen. Sie verwandten dazu Rinderblut, das mit spezifischen Ambozeptoren vom Kaninchen beladen war. Zeitliche und individuelle Schwankungen wurden beobachtet. Beim Serum Geisteskranker, das besonders verwandt wurde, scheinen sich aber keine besonderen Merkmale ergeben zu haben. Es wird berichtet, daß der Komplementgehalt bei Frauen durchschnittlich etwas geringer war als bei Männern.

Wenn auch vorläufig diagnostisch verwertbare Komplementschwankungen kaum in Betracht kommen, so ist es doch durchaus möglich, daß eine im Sinne Ehrlichs auf breitester Basis angelegte Untersuchung der verschiedenartigsten Komplemente unter normalen und pathologischen Bedingungen gesetzmäßige Abweichungen von der Norm bei Krankheiteu oder unter dem Einfluß verschiedenartiger Ernährung usw. erkennen lassen und auch zu praktisch-diagnostischen Schlüssen führen würde. Jedoch müßte eine solche Bearbeitung auf sehr breiter Basis erfolgen, und die verschiedensten Kombinationen müßten herangezogen werden, um die Möglichkeiten einigermaßen zu erschöpfen.

7. Beschleunigung der Komplementwirkung.

Was die Möglichkeit einer Beschleunigung der hämolytischen Wirkung durch besondere Serumstoffe anlangt, so sei hier zunächst auf die Arbeiten von Manwaring verwiesen, nach denen manche normale Sera durch mehrstündiges Erhitzen auf 56° die Fähigkeit erlangen sollen, die Hämolyse durch artgleiche Immunsera zu verstärken. Über den Mechanismus dieser Wirkung dürften die kurvenmäßigen Darstellungen des Autors keinen weiteren Schluß zulassen. Noguchi vermutet, daß es sich dabei um das Freiwerden von Lipoiden aus unwirksamen Komplexen handelt. Er hat gleichfalls „auxilytische“ Effekte beim Erwärmen der Sera beobachtet, aber nicht dann, wenn die Lipoide des Serums zuvor durch Alkohol oder Ätherextraktion entfernt waren. Erinnert sei auch an die an früherer Stelle bereits besprochene Verstärkung der Hämolyse von ambozeptorbeladenem Rinderblut und Pferdeserum als Komplement durch die Interferenz des inaktivierten Rinderserums. Von Bordet und Gay beschrieben, wurde dieses Phänomen von Sachs und Bauer einer eingehenden Analyse unterzogen, die, wie hier nochmals rekapituliert sei, zu dem Schluß führte, daß die verstärkende Wirkung des Rinderserums

in diesem Falle durch eigenartige Verhältnisse bedingt ist und im wesentlichen darin ihre Ursache hat, daß das Rinderserum einen die Komplementwirkung vereitelnden Bestandteil des Pferdeserums absorbiert. Erwähnt sei auch, daß nach Noguchi Seifen, nach Cernovodeanu und Henri Magnesiumsalze, die Komplementwirkung verstärken sollen, und daß nach neuesten Angaben v. Dungerns und Cocas die Aufnahme der Lipase des Kobragiftes durch die Blutkörperchen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber den Serumhämolysinen bedingen soll.

Von besonderem Interesse sind aber die hämolysebeschleunigenden Wirkungen gewisser Immunsera, welche wir durch Friedberger und Moreschi kennen gelernt haben. Diese Autoren haben festgestellt, daß beim Einführen hämolytischer Immunsera in einen fremdartigen Organismus in manchen Fällen Immunsubstanzen entstehen, welche die Hämolyse durch das betreffende Immunserum erheblich beschleunigen. Wie im folgenden Kapitel noch zu erörtern sein wird, entstehen bei diesem Vorgehen sehr oft gerade die Hämolyse hemmende Substanzen, und man kann daher vorläufig nicht von vornherein sagen, von welchen Faktoren es abhängt, ob die entstehenden Immunkörper die Hämolyse hemmen oder beschleunigen. Die von Friedberger und Moreschi benutzte Kombination besteht in der Hämolyse von Kaninchenblutkörperchen durch ein spezifisches, von der Ziege gewonnenes Immunserum, und Meerschweinchenserum als Komplement. Das beschleunigende Antiserum wird demnach vom Kaninchen durch Immunisieren mit dem von der Ziege stammenden hämolytischen Immunserum gewonnen. Die Beschleunigung der hämolytischen Wirkung ist derartig stark, daß die Lösung der ambozeptorbeladenen Blutkörperchen sich bei Zusatz geringer Mengen (0,001 ccm) des Antiserums in wenigen Minuten vollzieht, während sie sich bei alleiniger Verwendung von Komplement eine Stunde und länger hinzieht. Die beschleunigende Wirkung tritt markanter in Erscheinung, wenn die Blutkörperchen mit Ambozeptoren vorher beladen sind, als wenn Blut und Ambozeptor miteinander gemischt werden. Die beschleunigende Wirkung ist insofern spezifisch, als sie nur dann eintritt, wenn bei Verwendung eines durch Vorbehandlung mit Ziegeneiweiß gewonnenen Antiserums der hämolytische Ambozeptor von der Ziege stammt. Die Beschleunigung wird noch eklatanter, wenn die ambozeptorbeladenen Blutkörperchen vor dem Komplementzusatz mit dem beschleunigenden Immunserum vorbehandelt und von den übrigen Serumbestandteilen durch Zentrifugieren getrennt werden. Trotz dieser nachgewiesenen Bindung der beschleunigenden Substanzen an die ambozeptorbeladenen Blutkörperchen, gelang es Friedberger und Moreschi nur unvollkommen, das beschleunigende Immunserum durch diesen Prozeß seiner Wirkung zu berauben. Die beschleunigenden Substanzen vertragen eine einstündige Erhitzung auf 68°, bei 75° werden sie zerstört.

Weitere Beiträge zur Kenntnis dieser hämolysebeschleunigenden Wirkung brachten die Untersuchungen von Friedberger und Bezzola. Diese Autoren stellten zunächst fest, daß man mit Hilfe der Eiweißantisera die Hämolyse nicht nur beschleunigen, sondern auch verstärken könne, insofern als solche Ambozeptormengen, welche im Verein mit Meerschweinchenserum allein nicht mehr hämolytisch wirken, unter dem Einfluß der genannten Immunsera noch zur hämolytischen Wirkung gelangen. Dagegen war ein Einfluß auf das Komplement im Sinne einer Herabsetzung der zur Hämolyse noch ausreichenden Menge nicht erblickbar. Es zeigte sich ferner, daß die Absorption der verstärkenden

Substanzen durch ambozeptorbeladene Blutkörperchen von der Ambozeptormenge abhängig ist; bei Verwendung größerer Ambozeptordosen werden die beschleunigenden Stoffe besser absorbiert.

Zu erwähnen ist schließlich noch, daß an Stelle einer verstärkenden Wirkung eine hemmende Wirkung eintreten kann, wenn das den Ambozeptor enthaltende Immunserum vor Zusatz des beschleunigenden Antiserums nach der Bindung an die ambozeptorbeladenen Blutkörperchen nicht entfernt wird. Es handelt sich dann wohl, wie Friedberger und Bezzola annehmen, um eine Komplementbindung durch das Zusammenwirken von Eiweißantigen und Antiserum. Wird aber das überschüssige Ambozeptorserum vor Zusatz des beschleunigenden Immunserums abzentrifugiert, so findet gleichfalls eine Komplementbindung durch das Zusammenwirken der an den Blutkörperchen haftenden Eiweißantigene mit dem beschleunigenden Immunserum statt; es handelt sich aber hier um eine Zulenkung des Komplements zu den Blutkörperchen, welche eben die Hämolyse verstärkt. Zu der wesentlich gleichen Auffassung ist auch Moreschi gelangt, der sie dahin formuliert, daß das den Ambozeptor enthaltende Immunserum einmal als Antiserum, andererseits als Antigen anzusehen ist. Durch seine Eigenschaft als Antigen ist es bei Zufügung des korrespondierenden Antieiweißserums erneut imstande, das Komplement zu fixieren und den durch seine Ambozeptorfunktion fixierten korpuskulären Elementen zuzuführen. Diesen Prozeß, in dem das den Ambozeptor repräsentierende Immunserum gleichzeitig als Antigen fungiert, bezeichnet Moreschi als „Kettenbindung“.

8. Ursprung der Komplemente.

Was den Ursprung der Komplemente anlangt, so ist man heute, nachdem es festgestellt ist, daß die Komplemente komplexe Stoffe sind, vor neue Fragen gestellt. Es muß nämlich zunächst zweifelhaft erscheinen, ob die Komplemente als solche in das Blutserum gelangen, oder ob nicht jede der beiden Komponenten, welche als Mittelstück und Endstück differenziert sind, verschiedene Ursprungsstätten haben und erst im Blutserum zu den wirksamen Komplexen sich vereinigen. Man wird wohl annehmen müssen, daß die Komplemente in irgend einer Weise von Zellen abstammen, sei es, daß sie von der lebenden Zelle sezerniert werden, sei es, daß sie beim Zellzerfall entstehen. In nähere Beziehungen hat man seit langer Zeit die Komplemente zu den Leukocyten gebracht. Hier standen sich zwei Meinungen gegenüber: die von Buchner vertretene Anschauung, daß die Leukocyten Komplement sezernieren, und die von Metchnikoff vertretene Hypothese, daß die Komplemente erst beim Absterben der Leukocyten resp. bei der Blutgerinnung frei werden. Die von Metchnikoff vertretene Anschauung, daß die Komplemente im zirkulierenden Plasma überhaupt nicht frei sind, hat eine große Reihe von Arbeiten über diesen Punkt verursacht. Methodisch kommt dabei natürlich an erster Stelle in Betracht, ungerinnbares Blutplasma zu gewinnen und die komplettierende Wirkung des Plasmas mit demjenigen des Blutserums zu vergleichen. Auf die verschiedenen Verfahren, welche zur Gewinnung von Blutplasma angegeben und für die vorliegende Frage benutzt worden sind, braucht an dieser Stelle nicht näher eingegangen zu werden, da die einschlägigen Wege in diesem Handbuch bereits durch E. P. Pick (I. Bd., S. 416) eingehend beschrieben worden sind. Die überwiegende Mehrheit der Arbeiten hat nun ergeben, daß das Plasma

an komplettierender Wirkung dem Serum nicht nachsteht. Ich verweise hier, um mich auf die Arbeiten über Hämolyse zu beschränken, auf die Untersuchungen HEWLETT, PFEIFFER, DOEMENY, ASCOLI, BELLEI, FALLOISE, SWEET. v. DUNGERN konnte ebenfalls die hämolytischen Funktionen in sehr eklatanter Weise im Haifischplasma nachweisen, das sich besonders für derartige Untersuchungen eignet, da das Haifischblut flüssig bleibt und erst nach Zusatz von Gewebssäften gerinnt. Abweichende Ergebnisse beschreiben HERMAN und MIONI, jedoch kommt auch SCHNEIDER in einer eingehenden Arbeit über diese Frage zu dem Schluß, daß das Plasma an hämolytischer Fähigkeit dem Serum nicht nachsteht.

In gleichem Sinne wie die Untersuchungen des Blutplasmas sind diejenigen zu verwerten, welche sich mit dem Komplementgehalt des Humor aqueus der vorderen Augenkammer beschäftigen. SWEET und ebenso RÖMER haben festgestellt, daß das normale Kammerwasser hämolytische Komplemente nicht enthält. Wurde dasselbe aber bei Kaninchen entfernt, so enthielt die sich in die vordere Kammer nunmehr ergießende Flüssigkeit temporär ziemlich beträchtliche Mengen von hämolytischem Komplement — entgegen den früheren Angaben LEVADITIS. Da andererseits die neugebildete Füssigkeit Leukocyten nicht enthält, so schließen die Autoren wohl mit Recht, daß die Komplemente infolge des durch die Punktion der vorderen Augenkammer entstandenen negativen Druckes durch die Gefäßwand filtriert sind und demnach frei im zirkulierenden Blut existieren müssen. Zu analogen Resultaten gelangten auch WESSELY und FALLOISE; vollkommen bestätigende Schlüsse ergaben die Arbeiten von SCHNEIDER, durch welche ebenso das Auftreten von bakteriziden und opsonisierenden Funktionen im regenerierten Kammerwasser nachwiesen wurde.

Nach den Untersuchungen SCHNEIDERS ist es ferner für die hämolytische Wirkung des Blutserums gleichgültig, bei welcher Temperatur die Blutgerinnung vorgenommen wird. Ebenso spricht gegen die Annahme eines allmähligen Übertritts von Komplement aus den Zellen der Umstand, daß die hämolytische Wirkung des Serums nicht wesentlich abweicht, wenn das Serum durch Defibrinieren rasch gewonnen wird, oder wenn es der langsamen Gerinnung überlassen bleibt*). Das Bestreben SCHNEIDERS ging besonders dahin, ein fibrinfermentfreies Plasma darzustellen, um ein der intravasal zirkulierenden Blutflüssigkeit analoges Plamsa zu erhalten. Es ist ihm gelungen, die hierfür erforderlichen Momente (rasche Trennung des Plasmas von den Zellen und Vermeidung der Berührung mit den Geweben) zu erreichen. Die näheren Details sind im Original nachzulesen. Das Blut muß in kräftigem Strahl direkt in das bereitgehaltene Zentrifugenröhrchen einfließen, das die gerinnungshemmende Salzlösung (Natriumfluorid) enthält. Durch kürzeres Zentrifugieren werden die roten und weißen Blutkörperchen ausgeschleudert. Das nunmehr nur durch Blutplättchen getrübte Plasma wird abgehebert und bis zu seiner Klärung in einem neuen Röhrchen weiter zentrifugiert**). Es empfiehlt sich nun, das von der Hauptmasse der Blut-

---

*) GAY und AYER berichten allerdings in neuerdings erschienenen Arbeiten über eine geringe Steigerung der komplettierenden Kraft bei 24—48stündigem Verweilen des Serums mit dem Blutkuchen bei 0°. Ebenso fand GAY den Komplementgehalt von Leichenserum relativ hoch. Beide Phänomen, die allerdings nur äußerst schwach angedeutet zu sein scheinen, wollen die Autoren mit dem Leukocytenzerfall in Zusammenhang bringen.

**) Man kann auf diese Weise auch von kleineren Laboratoriumstieren verwendbare Mengen von Blutplättchen darstellen.

plättchen befreite Plasma noch mehrere Stunden zu zentrifugieren. Die derart gewonnenen Plasmen weisen nicht den geringsten Fermentgehalt auf, und trotzdem wirkten sie ebenso hämolytisch wie das entsprechende Blutserum.

Den wichtigsten Beweis dafür, daß die Komplemente frei im Plasma vorhanden sind, erblickt Schneider darin, daß die von ihm dargestellten Fluornatrium-, Natriumzitrat- und Paraffinplasmen volle hämolytische Wirksamkeit besaßen, aber frei von Anthrakozidin waren. Da sich nämlich ergeben hat, daß das sogenannte Anthrakozidin aus den Leukocyten und Blutplättchen bei ihrem Zerfall entsteht (Gruber und Futaki), so ergibt sich aus dem Nachweis, daß das Plasma anthrakozidinfrei ist, die erhaltenen Blutplättchen aber die milzbrandfeindlichen Stoffe liefern, der Beweis dafür, daß bei der Plasmagewinnung, die zelligen Elemente vollkommen unversehrt geblieben sind, und Schneider erblickt darin einen sicheren Beweis für die Präexistenz der Komplemente im strömenden Blute. Er stellt direkt die Forderung auf, daß ein Plasma, welches mit der zirkulierenden Blutflüssigkeit verglichen werden soll, frei von Anthrakozidin sein muß.

Als ein weiteres methodisches Verfahren zum Nachweis der Existenz freier Komplemente im zirkulierenden Blut kommt die Erforschung der Frage in Betracht, was aus Blutkörperchen wird, welche in den Organismus eingeführt werden. Natürlich kann man eine intravitale Hämolyse nur dann voraussetzen, wenn der geeignete Ambozeptor bereits im Blut der Versuchstiere vorhanden ist oder zusammen mit den Blutzellen eingeführt wird. Rehns verfuhr in der Weise, daß er Kaninchenblutkörperchen, die mit spezifischen Ambozeptoren beladen waren, normalen Kaninchen intravenös injizierte. Aus der nunmehr erfolgenden intravasalen Hämolyse schloß er auf die Anwesenheit freier Komplemente im strömenden Blut. Savtchenko injizierte Meerschweinchen das Serum von Kaninchen, die mit Meerschweinchenblut vorbehandelt waren, und beobachtete dabei allerdings nur dann intravitale Hämolyse und Hämoglobinurie, wenn das Immunserum aktiv injiziert wurde, während er bei Injektion inaktiven Serums nur Phagozytose beobachtete*).

Die von Savtchenko erhobenen Befunde sollen eine Ergänzung bilden zu den schon früher von Metchnikoff mitgeteilten Untersuchungen über die Resorption von Gänseblutkörperchen in der Meerschweinchenbauchhöhle, durch welche Metchnikoff glaubte, das Vorhandensein von freien Komplementen ausschließen zu können. Zu widersprechenden Resultaten ist allerdings Wolff bei Untersuchung über das Verbleiben von Taubenerythrocyten bei intraperitonealer Injektion gekommen. Gruber hat den von der Metchnikoffschen Schule oft gemachten Einwand, daß bei der intravenösen Injektion eine Schädigung der Leukocyten stattfindet, und daß erst durch die erfolgende Phagolyse Komplemente frei würden, dadurch zu umgehen versucht, daß er Meerschweinchen spezifisches, von Kaninchen gewonnenes hämolytisches Immunserum peritoneal injizierte. Er ging dabei von dem Gedanken

*) Das Ausbleiben der intravasalen Hämolyse bei derartigen Versuchen kann durch mehrfache Faktoren bedingt sein; einmal können im Plasma des Versuchstieres geeignete Komplemente zur Aktivierung fehlen, dann aber kann bei der eben beschriebenen Versuchsanordnung ein Ausbleiben der Hämolyse trotz Vorhandenseins von geeigneten Komplementen auch dadurch zustande kommen, daß die Bedingungen für eine Komplementbindung durch ein Zusammenwirken von Eiweißantigen und Antikörper gegeben sind.

aus, daß die Ambozeptoren allmählich resorbiert würden und in das Blutplasma gelangen müßten, wo sie, wenn das Blutplasma Komplement enthielte, eine intravasale Hämolyse bedingen müßten. In der Tat konnte er einige Zeit nach der peritonealen Injektion intravasale Auflösung der Blutkörperchen mit Hämoglobinurie beobachten. Gegenüber Einwänden von Levaditi, der in seinen analogen Versuchen kurze Zeit nach der Injektion im Plasma keine Hämolyse eintreten sah, haben die weiteren Nachprüfungen von Gruber und Bellei das Phänomen vollauf bestätigt. Man wird wohl mit Gruber annehmen müssen, daß in den Versuchen Levaditis zu der Zeit, zu welcher die Blutflüssigkeit auf Hämolyse geprüft wurde, der Ambozeptor eben an die Blutkörperchen noch nicht herangelangt war. Nach der Auffassung Levaditis gehen die Erythrocyten vorwiegend in den Phagocyten der Milz zugrunde. Natürlich wird auch dann, wenn eine Beteiligung der Phagocyten an der Zerstörung des ambozeptorbeladenen Blutes nachgewiesen ist, die extrazelluläre Hämolyse nicht ausgeschlossen werden können. In ganz ähnlicher Weise wie die erwähnten Untersuchungen Grubers scheint ein Versuch von Sachs für die Existenz freier Komplemente im Blutplasma beweisend zu sein. Sachs injizierte Kaninchen intravenös Rinderblutkörperchen, also eine Blutart, für welche das normale Kaninchenserum in der Regel keine geeigneten Ambozeptoren enthält. Nach einer Inkubationszeit von 3—4 Tagen werden aber bei dieser Versuchsanordnung auf immunisatorischem Wege Ambozeptoren ausgelöst, und das nach dieser Zeit erfolgende erste Auftreten der Ambozeptoren im Blute ist mit einer intensiven Hämoglobinämie und Hämoglobinurie vergesellschaftet, so daß man daraus nur schließen kann, daß die Komplemente frei im Plasma existieren und jederzeit zur Wirkung gelangen können, wenn ein geeigneter Ambozeptor in die Blutflüssigkeit gelangt. Auch bei dieser Versuchsanordnung kann eine Phagolyse für das Auftreten der Komplemente im Blutplasma wohl nicht verantwortlich gemacht werden, da ja zwischen der Blutinjektion und der Komplementwirkung ein Intervall von mindestens drei Tagen gelegen ist. Levaditi hatte allerdings auch gegen diese Versuche eingewandt, daß die Zerstörung der Blutzellen im Innern der Phagocyten erfolge.

Im engen Zusammenhange mit dem oben beschriebenen Verfahren, welches den Nachweis einer vitalen Hämolyse bezweckt, stehen diejenigen Untersuchungen, welche sich mit den Konsequenzen der Blutzerstörung, d. h. mit der Herabsetzung des Komplementgehaltes durch die stattgefundene Hämolyse beschäftigen. In dieser Hinsicht müssen zunächst die bereits erwähnten Untersuchungen von Schütze und Scheller genannt werden, welche nachgewiesen haben, daß nach intravenöser Injektion solcher Blutarten, für welche das Serum der Versuchstiere Hämolysine enthält, eine erhebliche Komplementverminderung oder ein Komplementschwund stattfindet (vergl. die gleichsinnigen Beobachtungen von Battelli, Lefmann und Trommsdorff). Sachs hat in gleicher Weise bei der oben beschriebenen Versuchsanordnung eine Herabsetzung der Komplemetmenge bei Injektion solchen Blutes, für das die Versuchstiere normalerweise keine Ambozeptoren enthielten, beobachtet, welche der nach Erscheinen der Ambozeptoren eintretenden intravasalen Hämolyse unmittelbar folgte. Besonders zu bemerken ist dabei noch, daß nach den Beobachtungen von Sachs diese Komplementverarmung und auch die kurz danach eintretende reparatorische Komplementsteigerung spezifisch ist, insofern, als sie nur diejenigen Komplementfunktionen betrifft,

welche für die Auflösung des zur Verwendung gelangten ambozeptorbeladenen Blutes in Frage kommen. Bei einem Freiwerden der Komplemente durch mechanische Schädigung der Leukocyten müßte man aber ein gleichsinniges Fallen und Steigen, wenigstens der hämolytischen Komplemente erwarten. Nach alledem darf man wohl heute annehmen, daß die Komplemente frei im Plasma existieren, also nicht als ein erst extravasal entstehendes Produkt von Leukocytenveränderungen anzusehen sind.

Aber selbst die besonders von der METCHNIKOFFschen Schule vertretene Auffassung, daß die Leukocyten überhaupt eine wesentliche oder die einzige Quelle der Komplemente bilden, wird von vielen Autoren bestritten, und es sind eine Reihe von gewichtigen Befunden erhoben worden, welche einen Zusammenhang zwischen Leukocyten und Komplementen auszuschließen scheinen. Ich erwähne hier zunächst solche Arbeiten, welche auf den Mangel einer Relation zwischen Leukocytenzahl und Komplementgehalt des Serums hinweisen. So hat SIMNITZKY beobachtet, daß intravenöse Injektionen von Rinderblut bei Kaninchen eine starke Abnahme der Leukocytenzahl, speziell der Makrophagen zur Folge haben, aber keine Komplementschwankung bedingen. SIMNITZKY schließt auch daraus, daß die Komplemente frei im Plasma existieren. LEVADITI hat wiederum demgegenüber angeführt, daß die Blutinjektion eine Schädigung der Phagocyten bedingt, und daß durch die erfolgende Phagolyse Komplemente in Freiheit gesetzt werden, wodurch das Serum trotz geringerer Leukocytenzahl nicht ärmer an Komplementen gefunden würde. Wenn man andererseits etwa vermuten wollte, daß die Leukopenie, wenn sie durch Phagolyse verursacht ist, eine Steigerung des Komplementgehaltes bedingen müßte, so bemerkt demgegenüber LÖWITT (vergl. SCHNEIDER) daß die Leukopenie nicht durch Leukolyse, sondern durch eine Verdrängung der Leukocyten in die inneren Organe bedingt sein kann. In Analogie zu den Befunden SIMNITZKYS stehen die Befunde von FALLOISE und DUBOIS, welche bei Hyperleukocytose eine Zunahme der hämolytischen Wirkung des Serums nicht eintreten sahen. Wie ferner Versuche von LAMBOTTE und STIENNON zeigen, sind die Leukocyten offenbar überhaupt nicht so sehr fragile Elemente, daß man für das Vorhandensein der Komplemente im Blutplasma, welches auch diese Autoren nachweisen konnten, eine Phagolyse verantwortlich machen kann.

In dem Kapitel „Natur der Komplemente" ist schon erwähnt und ausführlich besprochen worden, das METCHNIKOFF und TARASSÉVITCH einen wesentlichen Beweis für den Ursprung der hämolytischen Komplemente aus den Makrophagen darin erblickten, daß sie in den Extrakten makrophagenreicher Organe hämolytische Wirkungen nachweisen konnten. Dieser Beweis kann indes nicht als stichhaltig betrachtet werden, da sich ja durch die vielfach bestätigten Untersuchungen KORSCHUNS und MORGENROTHS gezeigt hat, daß es sich bei den Hämolysinen der Organextrakte um Stoffe handelt, welche sich in den wesentlichen Merkmalen von den echten Komplementen unterscheiden. Die bisherigen Versuche, aus den Leukocyten hämolytische Komplemente zu gewinnen, haben zu negativen Ergebnissen geführt. Sowohl LANDSTEINER als auch LAMBOTTE und STIENNON konnten durch Leukocytenextrakte Ambozeptoren nicht komplettieren, obwohl die Aktivierung mit Blutserum und der Exsudatflüssigkeit desselben Tieres gelang. Direkt gegen die Abstammung der Komplemente aus den Leukocyten sprechen die von DONATH und LANDSTEINER gemachten Angaben, daß die Leukocyten und Exsudatflüssig-

keiten antihämolytische Stoffe enthalten. Ebenso binden nach den Versuchen von Hoke die Leukocyten wie auch andere Organzellen, Komplemente, und frisches Kaninchenserum wird nach demselben Autor durch den Kontakt mit Leukocyten des gleichen Tieres komplementärmer. Ebenso scheinen Versuche von Gruber dagegen zu sprechen, daß die Leukocyten hämolytische Komplemente sezernieren. Gruber stellte nämlich fest, daß beim Zusammenbringen von ambzoeptorbeladenen Blutkörperchen mit Leukocyten im Reagenzglas keine Hämolyse der extrazellulär gelegenen Blutkörperchen stattfindet. Ebenso vermißte bei analoger Versuchsanordnung Neufeld die Hämolyse. Auch er konnte die Hemmung der Hämolyse durch Leukocyten bestätigen, indem er die Behinderung der Hämolyse von ambozeptorbeladenem Blut durch wirksames Komplement bei Gegenwart von Leukocyten nachwies. Neufeld bringt ferner Beweise dafür bei, daß die lebenden Leukocyten überhaupt kein hämolytisches Komplement enthalten. Neufeld schließt nämlich aus seinen Beobachtungen, daß die Auflösung der ambozeptorbeladenen Blutkörperchen im Innern von Phagocyten ein ganz anderer Vorgang ist, als die extrazelluläre Hämolyse durch Komplement. Die intrazelluläre Verdauung geht außerordentlich langsam vor sich, während die Komplementwirkung unter entsprechenden Verhältnissen innerhalb weniger Minuten eingetreten ist. Daß im Innern der Phagocyten aber ebenso eine rapide Hämolyse stattfinden kann, weist Neufeld dadurch nach, daß er den Phagocyten nach Aufnahme der ambozeptorbeladenen Blutkörperchen etwas Saponinlösung zusetzt. Dabei tritt sofortige Hämolyse ein. Auch weist Neufeld darauf hin, daß in der Regel innerhalb der Phagocyten überhaupt keine eigentliche Schattenbildung zustande kommt, sondern eine Verklumpung und Degeneration mit hämoglobingefärbten Schollen, wie auch Hektoen und Gruber den Vorgang der intrazellulären Zerstörung der Erythrocyten beschreiben. Neefeld kommt auf Grund seiner Beobachtungen an Blutkörperchen zu dem Schluß, „daß die Leukocyten Komplement weder sezernieren noch bei der Gerinnung an das Serum abgeben, und daß sie überhaupt kein wirsames Komplement enthalten". Jedenfalls ist eine bestimmte Antwort auf die Frage nach dem Ursprung der Komplemente heute nicht mit Sicherheit zu geben. Besonders die Vielheit der Komplemente legt es wohl nahe, die verschiedensten Zellterritorien für die Bildung der verschiedenen Komplemente verantwortlich zu machen; jedoch kann ein früher von Ascoli und Riva, Wassermann, Donath und Landsteiner, Levaditi versuchtes Verfahren, durch Erzeugung von Antikomlementen Rückschlüsse auf die Komplementnatur der einverleibten Antigene zu ziehen, heute nicht mehr als irgendwie beweiskräftig angesehen werden. Denn wir wissen ja heute, daß die antikomplementären Eigenschaften der Antisera nicht durch Antikörper der Komplemente bedingt sind, sondern daß es sich dabei um die Interferenz ambozeptorartiger Immunstoffe handelt, welche erst durch das Zusammenwirken mit den entsprechenden Eiweißantigenen ihre antikomplementäre Wirkung entfalten. Es sind daher die von den genannten Autoren aus der Erzeugung antikomplementär wirkender Sera durch Vorbehandlung mit Leukocyten oder anderen Zellmaterialien gezogenen Schlüsse auf den Ursprung der Komplemente aus Leukocyten oder anderen Organzellen hinfällig geworden*).

*) Verwiesen sei auf den von Ottolenghi und Bergel geführten Nachweis von Komplementen im Fibrin. Während letzterer diesen Befund auf ein Freiwerden von Komplement aus Leukocyten bezieht, erblickt Ottolenghi darin eher einen Hinweis auf ein Hervorgehen der Komplemente aus den Blutplättchen.

9. Vielheit der Komplemente.

Die Frage, ob die verschiedenartigen Komplementwirkungen, welche ein und dasselbe Serum ausüben kann, durch ein einheitliches Substrat oder durch eine Vielheit von reagierenden Bestandteilen ausgeübt werden, ist viel diskutiert. Der Auffassung Ehrlichs und Morgenroths von der Pluralität der Komplemente wurde besonders von Bordet, der im Anschluß an Buchner die Vorstellung von der Einheitlichkeit des Komplements hegte, in zahlreichen, geistreich ersonnenen Experimenten widersprochen, ohne daß letztere bei strenger Prüfung eine zwingende Beweiskraft beibehalten konnten. Direkte Beweise für die Einheitlichkeit zu erbringen, erscheint ja auch bei diesem Problem, das sich mit Stoffen beschäftigt, die wir nur funktionell zu erkennen vermögen, und deren Isolierung und chemische Analyse noch heute wenig aussichtsvoll erscheint, kaum möglich. Es handelt sich daher auch bei allen denjenigen Versuchen, welche beigebracht wurden, um die Einheitlichkeit der Komplemente zu erweisen, nicht um Tatsachen, welche ausschließlich durch die Annahme eines einheitlichen Komplementes erklärbar wären, sondern nur um solche, welche mit der Einheitlichkeit des Komplementes nicht im Widerspruche stehen. Das gilt insbesondere von dem bekannten Versuch Bordets, welcher die Einheitlichkeit der Komplemente endgültig erweisen sollte. Bordet hat nachgewiesen, daß ambozeptorbeladene Blutkörperchen oder andere „sensibilisierte“ Zellelemente einem aktiven Serum bei 37° sämtliche Komplementfunktionen entziehen können, und nicht nur diejenige, welche in diesem Falle zur Wirkung gelangt. Dieses Ergebnis ist allseitig bestätigt worden, steht aber, wie Ehrlich auseinandergesetzt hat, mit der Vielheit der Komplemente durchaus nicht im Widerspruch. Denn von einer Deutung in Sinne der Einheitlichkeit des Komplementes könnte ja nur dann die Rede sein, wenn der Komplex „Zelle-Ambozeptor“ nur eine einzige reaktionsfähige Gruppe besäße. Tatsächlich ist aber von Ehrlich und Morgenroth stets der Standpunkt vertreten und durch eine Reihe von Beweisen gestützt worden, daß der komplementophile Apparat der Immunsera ein sehr komplizierter ist (vergl. das Kapitel über Ambozeptoren), und durch die Mannigfaltigkeit der komplementophilen Gruppen erklärt es sich ohne weiteres, daß durch die ambozeptorbeladenen Blutzellen eine Vielheit der verschiedensten Komplemente gebunden werden kann. So wird es ja auch verständlich, daß die Ambozeptoren eines und desselben Immunserums nach ihrer Verankerung an die Blutzellen die Sera verschiedener Tierarten ihres ganzen Komplementgehaltes berauben können. Man müßte bei der unitarischen Anschauung darnach wiederum folgern, daß die verschiedensten Tierarten ein einheitliches Komplement besitzen, während ja selbst Bordet von jeher die Komplemente verschiedener Spezies voneinander differenziert und sie für spezifisch hält.

Die Tatsache der Absorption der verschiedensten Komplementfunktionen durch ambozeptorbeladene Zellelemente wäre heute sogar auch mit der Annahme einer einheitlichen komplementophilen Gruppe im Immunserum vereinbar. Man könnte sich ja vorstellen, daß der einheitlich gedachten komplementophilen Gruppe ein einheitliches „Mittelstück“ gegenübersteht und daß dieses Mittelstück sich mit einer Reihe von Endstücken, denen die verschiedenartigsten Komplementwirkungen zukommen, vereinigen kann. Jedenfalls wird man bei weiteren Untersuchungen über die Vielheit der Komplemente der durch Ferrata neu

gewonnenen Erkenntnis von der komplexen Konstitution der Komplemente Rechnung tragen müssen. Auch ließe sich die Annahme machen, daß die Differenz der einzelnen Komplemente nicht in der haptophoren Gruppe, sondern in den zymotoxischen Gruppen, welche die Komplementwirkung bedingen, gelegen ist. Man könnte dann weiter folgern, daß mit einer einheitlichen haptophoren Gruppe eine Vielheit zymotoxischer Gruppen in demselben Molekül vereint sind, und würde dann sogar zu einem einheitlichen Komplementmolekül gelangen. Der zweiten Möglichkeit haben Ehrlich und Sachs bereits Rechnung getragen und darauf hingewiesen, daß sie dann ausgeschlossen werden kann, wenn es gelingt, verschiedene Komplementfunktionen räumlich voneinander zu trennen resp. gewisse Partialkomplemente, ohne sie zu schädigen, durch Bindung oder Absorption zu eliminieren. Eine derartige Differenzierung von Komplementen, welche die Annahme eines einheitlichen Moleküls ausschließt, ist nun auf verschiedene Art und Weise gelungen:

1. Ich erwähne an erster Stelle die von Ehrlich und Morgenroth inaugurierte Methode der Komplementfiltration. Ehrlich und Morgenroth filtrierten normales Ziegenserum durch Pukallsche Filter und stellten fest, daß die erste Portion des Filtrats Meerschweinchenblut genau in der gleichen Weise löste wie das genuine Serum, während die hämolytischen Funktionen gegenüber Kaninchenblut nahezu vollkommen fehlten. Man kann bei einem solchen Versuchsresultat natürlich auch an die Interferenz differenter Ambozeptoren denken. Daß jedoch der Ambozeptor für Kaninchenblut auch im Filtrat vorhanden war und nur das Komplement fehlte, ergab sich daraus, daß die hämolytische Fähigkeit des Filtrats gegenüber Kaninchenblut durch Zusatz von geeignetem Komplement wiederhergestellt werden konnte, während ein Zufügen von Ambozeptor wirkungslos blieb. Die Methode der Komplementdifferenzierung durch Filtration ist in weiteren Arbeiten von Neisser und Döring, sowie von Lüdke angewandt worden.

2. Eine zweite Methode der Differenzierung besteht in dem Auffinden antikomplementär wirkender Sera oder Flüssigkeiten, welche nur gegenüber bestimmten Komplementwirkungen eine antihämolytische Wirkung entfalten. Die Möglichkeit, eine geeignete Flüssigkeit zu diesem Zwecke zu erhalten, ist natürlich vom Zufall abhängig. Marshall und Morgenroth fanden eine solche in einer menschlichen Ascitesflüssigkeit und konnten auf diesem Wege in sehr eleganter Weise zwei verschiedene hämolytische Komplemente im Meerschweinchenserum differenzieren. Das eine der beiden Komplemente löste Rinderblut unter dem Einfluß eines von Kaninchen gewonnenen Immunserums, während das andere den Ambozeptor einer mit Hammelblut vorbehandelten Ziege aktivierte. Obwohl Meerschweinchenserum für beide Kombinationen in gleicher Weise hämolytisch wirkte (0,008 ccm komplett), wurde durch einen Zusatz der Ascitesflüssigkeit die zur kompletten Hämolyse des ambozeptorbeladenen Rinderblutes erforderliche Komplementmenge auf mehr als 0,1 ccm erhöht, während das ambozeptorbeladene Hammelblut in gleicher Weise bereits durch 0,008 ccm Meerschweinchenserum vollständig gelöst wurde.

3. Es gelingt endlich auch durch eine Nachahmung des zuerst von Bordet angestellten Bindungsversuches unter geeigneten Verhältnissen einzelne Komplemente isoliert zu verankern. Allerdings scheint es zu diesem Zweck in der Regel zweckmäßiger zu sein, normale Ambozeptoren und nicht die Ambozeptoren der Immunsera zu verwenden, da der

komplementophile Apparat der normalen Ambozeptoren augenscheinlich nicht so kompliziert gebaut ist und daher nicht über eine solche Vielheit von reagierenden Gruppen verfügt wie die Ambozeptorenschar der Immunsera. Man muß außerdem darnach trachten, durch eine möglichste Abkürzung der Reaktionszeit nur diejenigen Komplemente zur Wirkung kommen zu lassen, welche die größte Avidität zu den komplementophilen Gruppen besitzen. Bei Beachtung dieser Vorsichtsmaßregel gelingt es aber, wie Ehrlich und Sachs gezeigt haben, auch durch Absorption mit ambozeptorbeladenen Blutzellen zu einer Differenzierung der Komplemente zu gelangen. So wurde durch kurzdauerndes Digerieren (2—3 Minuten) von Kaninchenblut mit Ziegenserum eine erhebliche Bindung einzelner Komplementfunktionen an die Blutkörperchen erzielt, während die komplettierende Wirkung für andere Kombinationen unverändert blieb*). Unter den letzteren unverändert gebliebenen Qualitäten befand sich auch das eigentliche aktivierende Prinzip für Kaninchenblut und Ziegenambozeptoren. Dieser Versuchsbefund zeigt, daß es vorkommen kann, daß unter geeigneten Verhältnissen das „dominante" Komplement nicht gebunden wird, während bereits andere nichtdominante Komplemente der Absorption unterliegen. Ehrlich unterscheidet ja für jede Kombination ein bestimmtes die zymotoxische Wirkung bedingendes dominantes Komplement von den übrigen nichtdominanten Partialkomplementen, welche bei der Bordetschen Versuchsanordnung gleichfalls von den ambozeptorbeladenen Blutzellen gebunden werden. In anderen Fällen scheint nun die Absorption der nichtdominanten Komplemente von der vorherigen Bindung des dominanten Komplements abzuhängen; wenigsten konnten Ehrlich und Marshall zeigen, daß man durch Eliminierung des dominanten Komplements die Bindung der nichtdominanten Komplemente gleichfalls verhindern kann. Sie bedienten sich dazu der von Marshall und Morgenroth aufgefundenen menschlichen Ascitesflüssigkeit, welche, wie schon erwähnt, die Fähigkeit besaß, ein Partialkomplement des Meerschweinchenserums isoliert zu neutralisieren. Während nun das ambozeptorbeladene Rinderblut aus dem genuinen Meerschweinchenserum sowohl das zu seiner Lösung erforderliche als auch das bei der Hämolyse des ambozeptorbeladenen Hammelblutes zur Wirkung gelangende Komplement verbrauchte, zeigte es sich, daß aus einem Gemisch von Meerschweinchenserum und Ascitesflüssigkeit, welches nur noch ambozeptorbeladenes Hammelblut aufzulösen vermochte, durch Digerieren mit ambozeptorbeladenem Rinderblut auch das für erstere Kombination erforderliche Komplement nicht gebunden wurde. Ehrlich ist ja durch diese Erfahrung über die Abhängigkeit der Bindung gewisser Komplemente von der vorherigen Bindung anderer Komplemente dazu gelangt, an den Ambozeptoren eine Vielheit von komplementophilen Gruppen anzunehmen und dem Ambozeptor die Polyzeptorkonstitution, auf welche schon bei Besprechung der Ambozeptoren eingegangen worden ist, zu vindizieren.

Man kann sich auch, wie dies Ehrlich und Sachs getan haben, zu den Absorptionsversuchen der Stromata bedienen und hat dann den Vorteil, eine Rotfärbung des vorbehandelten Serums durch die schon eingetretene Hämolyse zu vermeiden. Auch durch Absorption des Ziegen-

---

*) Ebenso gelangten Cler und Defalle durch eine Bindung von Meerschweinchenserum an Spermatozoen unter dem Einfluß normaler Ambozeptoren zu einer Differenzierung von Komplementen.

serums durch Meerschweinchenblutstromata gelang es Ehrlich und Sachs, die verschiedenen Komplemente im Ziegenserum zu differenzieren. Analoge Resultate erhielten sie, wenn sie mit roten Blutkörperchen und normalen Hämolysinen Reihenversuche anstellten und die lackfarbenen Flüssigkeiten dann als Komplemente für andere Kombinationen benutzten.

4. Man kann endlich auch gewisse Partialkomplemente durch Bindung an ambozeptorbeladene Blutzellen in vivo eliminieren. Auch mit dieser Versuchsanordnung haben Ehrlich und Sachs Erfolg gehabt, indem sie an die zuerst von Schütze und Scheller festgestellte Tatsache anknüpften, daß das Serum nach intravenöser Injektion solcher Blutarten, für welche es Hämolysine enthält, diese lösende Fähigkeit einbüßt. Bei der Prüfung solcher nach intravenöser Blutinjektion entnommener Sera gegenüber verschiedenen Kombinationen ergab sich, daß auch hier andere Komplementfunktionen erhalten bleiben. In analoger Weise stellte Sachs die Unabhängigkeit verschiedener Komplementfunktionen eines und desselben Serums fest, indem er Kaninchen Rinderblut injizierte, für welche das Kaninchenserum keine Hämolysine enthält. Es zeigte sich dann, wie schon erwähnt, daß nach Ablauf der Inkubationszeit, welche bis zum Erscheinen der immunisatorisch erzeugten Ambozeptoren im Serum verstreicht, gesetzmäßige Komplementschwankungen eintreten (erst Verminderung, dann erhebliche Steigerung), welche in spezifischer Weise nur das zur Hämolyse des ambozeptorbeladenen Rinderblutes und nicht das zur Auflösung des mit einem andersartigen Ambozeptor präparierten Hammelblutes erforderliche Komplement betrafen.

Ist durch diese verschiedenen Methoden eine Differenzierung verschiedener Komplementmoleküle in einem und demselben Serum erwiesen, so können eine Reihe von anderen Verfahren verschiedene Komplementfunktionen im Serum differenzieren, wenn diese auch der Möglichkeit Spielraum lassen, daß mit einer einheitlichen haptophoren Gruppe eine Vielheit zymotoxischer Gruppen in demselben Molekül vereint sind. Prinzipiell wäre ja ein solches Verhalten von einer wirklichen Vielheit der Komplemente auch nicht verschieden, da es ja tatsächlich zeigt, daß die Komplementfunktionen in demselben Serum unabhängig voneinander sind. Bordet hat daher stets auch diesen Befunden der Vielheit der Komplemente seine Aufmerksamkeit zugewandt und Bedenken gegenüber den daraus gezogenen Schlußfolgerungen geäußert. Bordet wendet nämlich besonders ein, daß durch schädigende Beeinflussung des Serums irgend welcher Art das einheitliche Komplement abgeschwächt werden kann, so daß es gewissen, wenig empfindlichen Zellelementen gegenüber überhaupt nicht mehr zur Wirkung gelangt, während es für andere stark sensibilisierte Zellen noch zur hämolytischen Funktion ausreicht. Dieser Einwand ist berechtigt und muß gegenüber solchen Arbeiten erhoben werden, welche sich mit einer qualitativen Prüfung auf Komplementwirkung begnügten und nicht den Komplementgehalt quantitativ bestimmten. In den Arbeiten Ehrlichs und seiner Schule ist aber stets auf eine quantitative Bestimmung der einzelnen Komplementwirkungen besonderer Wert gelegt worden, und bei Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse muß man, wenn der Bordetsche Einwand Berechtigung haben soll, fordern, daß verschiedenartige ambozeptorbeladene Zellen dem genuinen und dem durch verschiedene Eingriffe alterierten Serum gegenüber sich gleichartig verhalten, das heißt, daß die einzelnen Zellelemente der komplettierenden Wirkung des Serums gegenüber stets

dieselbe Skala der Empfindlichkeit aufweisen. Das ist aber durchaus nicht der Fall. Eine Durchsicht der in der Literatur niedergelegten diesbezüglichen Versuche zeigt zur Genüge, daß der relative Grad der einzelnen Komplementwirkungen nach schädigenden Einflüssen ganz regellos variiert, und daß sogar oftmals eine direkte Umkehrung der zuvor beobachteten Skala eintreten kann. Wenn man also den quantitativen Verhältnissen Rechnung trägt, so muß man auch denjenigen Versuchen, welche durch den Nachweis individueller Schwankungen oder Veränderungen des Serums durch künstliche Eingriffe eine Vielheit der Komplemente demonstrieren, volle Berechtigung zuerkennen.

Unter den Methoden, welche in dieser Weise zu einer Differenzierung hämolytischer Komplemente herangezogen worden sind, seien folgende genannt:

5. Der Nachweis individueller Schwankungen im Komplementgehalt der Sera und der Unabhängigkeit dieser Schwankungen in bezug auf einzelne Komplementfunktionen. Befunde dieser Art sind von Morgenroth und Sachs besonders bei der Untersuchung des Pferdeserums erhoben worden, und Marshall hat analoge Schwankungen im menschlichen Serum und den menschlichen Exsudaten festgestellt*).

6. Ein ferneres Verfahren besteht in der Benutzung thermischer Einflüsse. Ehrlich und Morgenroth benutzten diese Methode zuerst, um im Ziegenserum ein Partialkomplement nachzuweisen, das beim Erwärmen auf 56° erhalten blieb, während andere Komplemente zerstört wurden. Ebenso gelang es Wendelstadt im Ziegenserum verschiedene Komplemente durch vorsichtiges Erhitzen zu differenzieren. Gleiche Befunde wurden von Ehrlich und Sachs, sowie von Lüdke mitgeteilt.

7. Ein weiterer Weg zum Nachweis der Vielheit der Komplemente besteht in der Alteration des Serums durch chemische Einflüsse. Ehrlich und Sachs konnten durch Alkaliwirkung Komplemente im Ziegenserum differenzieren, und Wendelstadt gelang es im Serum einer Ziege, die mit Schweineblut, Ochsenblut und Hammelblut vorbehandelt war, durch Salzsäure die für die einzeln entstandenen Ambozeptoren passenden Komplemente voneinander zu trennen.

8. Endlich ist noch ein vierter Weg von Ehrlich und Sachs eingeschlagen worden. Die Autoren bedienten sich zur Differenzierung einzelner Komplemente im Ziegenserum der Verdauung durch Papain. Man muß natürlich bei dieser, wie auch bei den vorher geschilderten Methoden durch geeignete Limitierung von Zeitdauer und Temperatur die optimalen Bedingungen für eine isolierte Zerstörung einzelner Komplemente festzustellen suchen. Bei der Papainverdauung gingen Ehrlich und Sachs in der Weise vor, daß sie 20 ccm Ziegenserum mit 3 ccm einer 10%igen Papainlösung 30—45 Minuten lang im Brutschrank digerierten. Wurde die Verdauung längere Zeit — 1½—2 Stunden — fortgesetzt, so erwies sich das Ziegenserum seiner sämtlichen Komplementfunktionen beraubt.

Die Anschauung von der Einheitlichkeit des Alexins ist prinzipiell auch von Metchnikoff aufgegeben worden, indem er zwischen hämo-

*) Natürlich sind Befunde, wie sie z. B. kürzlich von Gay und Ayer mitgeteilt wurden, und welche eine Übereinstimmung in dem relativen Verhältnis von hämolytischen und bakteriziden Komplementen demonstrieren, durchaus nicht geeignet, für die Einheitlicheit des Komplementes zu sprechen. Sie zeigen nur, daß gewisse Komplemente den gleichen Einflüssen unterworfen sind, vielleicht gemeinsame Ursprungsstätten haben.

lytischen und bakteriziden Komplementen unterscheidet, von denen er die ersteren entsprechend seiner Anschauung von ihrer Entstehung aus den Makrophagen als Makrocytasen, die letzteren als Mikrocytasen bezeichnet. Es sei in dieser Hinsicht auf die Arbeiten LEVADITIS verwiesen. Unabhängig von METCHNIKOFF haben aber auch eine Reihe von anderen Autoren direkte Beweise für die Verschiedenheit der hämolytischen und bakteriziden Komplemente erbracht. Ich verweise auf ältere Beobachtungen dieser Art von WASSERMANN und WECHSBERG und erinnere an Versuche von RÉMY, welcher durch thermische Eingriffe oder durch Bindung an ambozeptorbeladene Elemente bakterizide und hämolytische Komplemente differenzieren konnte. Auch MORESCHI schließt aus Komplementbindungsversuchen, daß die Verschiedenheit von hämolytischem und bakteriolytischem Komplement wahrscheinlich ist. Es müssen hier ferner auch die neueren Untersuchungen von NEUFELD und HÄNDEL angeführt werden. NEUFELD und HÄNDEL zeigten, daß durch Cholerabazillen, welche mit spezifischem Serum digeriert waren, bei 0° eine starke Bindung des hämolytischen, aber nicht des bakteriziden Komplements erfolgte. Der Einwand, daß zur Hämolyse mehr Serum nötig sei, als zur Umwandlung der Vibrionen in Granula, konnte dadurch ausgeschaltet werden, daß sich das verwandte Serum stärker für sensibilisierte Blutkörperchen als für sensibilisierte Vibrionen komplettierend erwies. Bei 37° zeigte es sich dagegen, daß sensibilisierte Choleravibrionen nicht nur das hämolytische, sondern auch das bakterizide Komplement entsprechend den von BORDET erhobenen Befunden absorbierten. NEUFELD und HÄNDEL schließen daher, daß die weitere Anwendung des BORDETschen Bindungsversuches ihnen gerade Beweise für die Vielheit der Komplemente in die Hand gegeben hat.

Aber auch die einzelnen hämolytischeu Komplemente können durch die oben beschriebenen Methoden hinreichend von einander differenziert werden. Es erübrigt sich noch, Befunde von MUIR und BROWNING zu erwähnen, aus denen MUIR gleichfalls auf das Vorhandensein mehrerer Komplemente im Serum schließt. MUIR und BROWNING konnten nämlich zeigen, daß bei Verwendung eines und desselben Serums als Komplementquelle die Aufnahme des Komplements durch ambozeptorbeladene Blutzellen in dem einen Falle im Verhältnis zu der verwandten Ambozeptormenge erfolgt, während bei Benutzung anderer Kombinationen die Komplementbindung durch Steigerung der Ambozeptordosis nicht vermehrt wird. Nach alledem wird man heute mit der Vielheit der Komplemente stets rechnen und sie als einen wichtigen Faktor bei der Beurteilung von Versuchsbefunden betrachten müssen. Es ist ja auch, wie das EHRLICH wiederholt betont hat, a priori wahrscheinlich, daß die mannigfachen Wirkungen, welche das Serum als Komplementträger ausüben kann, nicht auf ein einheitliches Substrat, sondern auf eine Vielheit von reagierenden Stoffen zurückzuführen sind.

F. Antihämolytische Wirkungen.

Sehr groß ist die Reihe von Einflüssen und Stoffen, welche die Wirkung der hämolytischen Substanzen des Blutserums beeinflussen können. Wir sind bereits verschiedenen Momenten begegnet, welche die Wirkung der Hämolysine beschleunigen und verstärken, und es sei in dieser Hinsicht auf die besondere Besprechung im Kapitel über Komplemente hingewiesen. Von großer Wichtigkeit ist es aber natürlich,

über alle diejenigen Momente orientiert zu sein, welche eine Hemmung der Hämolyse herbeizuführen geeignet sind, einmal deshalb, weil durch antihämolytische Wirkung Ambozeptoren oder Komplemente dem Nachweise entgehen können*), dann aber ganz besonders auch aus dem Grunde, weil eine bestimmte Form der antihämolytischen Wirkung, die sogenannte Komplementbindung, in den Dienst praktischer Fragen eingereiht ist und dabei bereits eine bedeutsame Rolle spielt.

Es ist nicht ganz leicht, die disher erkannten antihämolytischen Wirkungen in bestimmte Gruppen einzuteilen, besonders auch deshalb, weil bei zahlreichen Angaben der Literatur nicht klar ersichtlich ist, ob es sich um eine Hemmung der Ambozeptor- oder der Komplementwirkung handelt. Eine strikte Entscheidung darüber ist auch, wie wir noch im Laufe der Besprechung sehen werden, nicht immer leicht zu erbringen, und es ist natürlich bereits an und für sich als ein wertvoller Gewinn unserer Erkenntnis aufzufassen, wenn wir neue Ursachen kennen lernen, die überhaupt eine Hemmung der Hämolyse verursachen und herbeiführen können.

Was die Differenzierung von antikomplementären und Antiambozeptorwirkungen anlangt, so kann auch heute noch die ursprünglich von Ehrlich und Morgenroth angegebene Methode als maßgebend gelten. Handelt es sich nämlich um eine Beeinflussung des Ambozeptors, so müssen sich offenbar die ungelösten Blutkörperchen nach der Einwirkung von Hämolysin und Hemmungskörper ebenso verhalten wie intakte. Wenn man von der Anschauung ausgeht, die in der Ambozeptortheorie zum Ausdruck gebracht ist, so kann es sich bei einer hemmenden Einwirkung auf den Ambozeptor entweder um eine Schädigung der cytophilen oder um eine Schädigung der komplementophilen Gruppe handeln, sei es, daß diese Schädigung eine Zerstörung der betreffenden Gruppe bedeutet, oder sie in ihrer Reaktionsfähigkeit unter die Grenze des Wahrnehmbaren herabsetzt. In jedem Fall aber werden sich die ungelöst gebliebenen Blutsedimente in komplettierendem Serum nicht lösen können. Wenn die cytophile Ambozeptorgruppe nicht reagiert, so ist es ja ganz klar, daß der Ambozeptor eben nicht gebunden wird und sich das erhaltene Blutsediment überhaupt nicht von normalen Blutzellen unterscheidet. Bezieht sich aber die Schädigung auf den komplementophilen Apparat, so wird der Ambozeptor zwar gebunden werden können; da die komplementophile Gruppe aber nicht reagiert, so werden auch die erhaltenen Blutsedimente trotz der Ambozeptorbindung im komplettierenden Serum sich nicht auflösen, da das Komplement eben nicht gebunden werden kann**). Verhältnisse dieser Art können Platz greifen, wenn es sich um sogenannte cytophile Ambozeptoide handelt, Ambozeptormodifikationen, die bisher allerdings nur von Moreschi aus den isolierten Ambozeptoren des Menschenserums durch Erhitzen auf 55° erzeugt worden sind***). Der-

*) Der Nachweis „larvierter“ Ambozeptoren ist bereits bei der Besprechung der Ambozeptoren erörtert.

**) Dagegen ist es denkbar, daß im letzteren Falle das Blutsediment sich auch in einem wirksamen Gemisch von Ambozeptor und Komplement nicht löst, wenn nämlich sämtliche Rezeptoren durch den seiner komplementophilen Funktion beraubten Ambozeptor okkupiert sind.

***) In diesem Falle der cytophilen Proambzeptoide muß sich die Entscheidung dadurch erbringen lassen, daß man die mit dem hemmenden Serum vorbehandelten Blutkörperchensedimente der Wirkung des Hämolysins aussetzt; die Hämolyse muß dann ausbleiben. Anwendbar ist aber auch das zum Nachweis von Rezeptorenschädigungen von Müller genannte Prinzip, die Blutmenge zu vermehren, was dann zu einem hämolytischen Effekt führen müßte.

selbe Fall tritt aber ein, wenn die komplementophilen Gruppen durch entsprechende Antikörper besetzt und dadurch dem Komplement nicht zugängig sind, oder wenn es sich um Komplementoidverstopfung handelt. Die Versuchsanordnung, welche zur Charakterisierung von hemmenden Wirkungen als Antiambozeptorwirkungen führt, besteht also darin, daß man absteigende Mengen des hemmenden Stoffes mit dem komplexen Hämolysin oder nur mit dem Ambozeptor mischt, Blutkörperchen hinzufügt, die Gemische eine bestimmte Zeit (eine Stunde bei Zimmertemperatur oder bei 37°) stehen läßt, sodann abzentrifugiert und den erforderlichenfalls noch gewaschenen Blutsedimenten komplettierendes Serum hinzufügt. Handelt es sich um Antiambozeptorwirkung, so wird das Blut ungelöst bleiben, handelt es sich dagegen um antikomplementäre Stoffe, so wird der Ambozeptor gebunden worden sein, und die hämolytische Wirkung der Komplemente wird ohne weiteres in Aktion treten können.

Man muß allerdings bei der Beurteilung derartiger Versuchsresultate noch einer neu gewonnenen Erkenntnis Rechnung tragen. Es hat sich ja gezeigt, das antikomplementäre Wirkungen auch daduch zustande kommen, daß sich gelöste Eiweißstoffe mit ihren Antikörpern verbinden und nunmehr wie ambozeptorbeladene Zellelemente als komplementbindendes Agens wirken. Da nun bei dem Zusammentreten von Eiweißantigenen und ihren Antikörpern die Gelegenheit zur Präzipitatbildung gegeben ist, so kann man beim Zentrifugieren der Blutsedimente unter geeigneten Verhältnissen auch Eiweißpräzipitate im Sediment erhalten, und es könnte dann der Fall eintreten, daß sich die Blutsedimente im komplettierenden Serum trotz der Verankerung der Ambozeptoren nicht lösen. Offenbar werden in diesem Falle ambozeptorbeladene Blutzellen und Eiweißpräzipitat um das Komplement konkurrieren müssen. Im allgemeinen wird man annehmen dürfen, daß eine Verteilung des Komplements nach den Gesetzen der Massenwirkung eintritt; auf die näheren Verhältnisse wird an späterer Stelle einzugehen sein.

Ein weiterer Weg, der oftmals, und zuerst wohl von P. Th. Müller benutzt worden ist, um über die Frage, ob es sich um antikomplementäre oder Antiambozeptorwirkungen handelt, zu entscheiden, besteht darin, daß man dem inaktiven Gemisch einerseits Ambozeptor, andererseits Komplement hinzufügt und festzustellen sucht, durch welche der beiden Komponenten die hämolytische Wirksamkeit wieder hergestellt wird. Jedoch muß man dabei berücksichtigen, daß wie schon ausführlich erörtert worden ist, die zur Hämolyse erforderlichen Ambozeptor- und Komplementmengen in gewissen Grenzen umgekehrt proportional sind, indem bei einer Steigerung der Ambozeptormenge sehr oft der Komplementbedarf vermindert wird und umgekehrt.

Methodisch wichtig ist ferner die Frage, in welcher Weise man die Bestimmung antihämolytischer Wirkungen vornehmen soll. Wenn man mit dem Gesamthämolysin arbeitet, so ergeben sich zwei Wege: entweder man mischt absteigende Mengen des hämolytischen Serums mit der gleichen Menge des auf antihämolytische Wirkung zu prüfenden Stoffes und vergleicht das Versuchsresultat mit demjenigen, welches bei einfachem Mischen von Blut mit absteigenden Mengen des hämolytischen Serums erhalten wird. Dabei muß man aber gewissermaßen blind vorgehen, denn man weiß nicht, ob sich gerade die gewählte Menge des antihämolytischen Agens wirksam erweist, weiß auch nicht im Voraus, ob dasselbe etwa an und für sich in gewissen Mengen hämolytische Wirkung ausübt, was gleichfalls vorkommen kann. Es empfiehlt sich

daher in der Regel, einen Vorversuch in der Weise zu machen, daß man die hämolytische Wirksamkeit des Serums zunächst bestimmt, einen nicht zu großen Überschuß der komplett lösenden Dosis (etwa $1^1/_2$- bis 2faches Multiplum) als Testeinheit definiert und diese dann mit absteigenden Mengen der auf antihämolytische Funktion zu prüfenden Substanz digeriert. Ist man über das Wesen der letzteren nicht näher orientiert, so wird es sich empfehlen, in einem Parallelversuch das hämolytische Serum fortzulassen oder durch physiologische Kochsalzlösung zu ersetzen, um dadurch etwaige hämolytische Wirkungen der untersuchten Substanz zu erkennen. Von weiterer Wichtigkeit ist die Frage, wie man sich bei der künstlichen Herstellung des Hämolysins durch Mischen von Ambozeptor und Komplement, wie das ja die Regel ist, verhalten soll. Wie bekannt, ist die zur kompletten Hämolyse erforderliche Komplementmenge um so geringer, je größere Ambozeptormengen man benutzt, und man könnte daher geneigt sein anzunehmen, daß eine antikomplementäre Wirkung dem Nachweise entgehen könne, wenn man eine minimale Ambozeptormenge verwendet und dadurch auf ziemlich viel Komplement zur kompletten Hämolyse angewiesen ist. Nun haben aber Morgenroth und Sachs nachweisen können, daß wenigstens für die antikomplementäre Wirkung des Blutserums die hemmende Wirkung viel eklatanter in Erscheinung tritt, wenn man mit kleiner Ambozeptor- und dementsprechend größerer Komplementmenge arbeitet, als wenn man durch einen Ambozeptorüberschuß in der Lage ist, mit kleinen Komplementdosen für die hämolytische Wirkung auszukommen. Es kann aus diesem Grunde und nach den bisherigen Erfahrungen empfohlen werden, bei der Prüfung auf antihämolytische Wirkung gegenüber künstlich hergestellten Mischungen von Ambozeptor und Komplement in der Weise vorzugehen, daß man zunächst unter Verwendung eines Komplementüberschusses die zur Hämolyse notwendige minimale Ambozeptormenge bestimmt, das $1^1/_2$- bis 2fache Multiplum als Testdosis wählt, sodann für diese Testdosis die zur Hämolyse gerade erforderliche Menge des komplettierenden Serums bestimmt und wiederum das $1^1/_2$- bis 2fache Multiplum dieser Dosis für den weiteren Versuch benutzt. Gegenüber der Mischung dieser beiden Testdosen von Ambozeptor und Komplement wird dann das antihämolytische Serum oder der antihämolytisch wirkende Stoff bestimmt.

Bevor wir auf die nähere Besprechung der einzelnen antihämolytisch wirkenden Agentien eingehen, sei noch daran erinnert, daß physikalische Einflüsse die hämolytische Wirkung der Sera herabsetzen und aufheben können. So wird durch Temperaturerniedrigung die Hämolyse aufgehoben, und wir haben ja ausführlich erörtert, daß die Ursache hierfür darin zu erblicken ist, daß in der Kälte entweder die Reaktion zwischen ambozeptorbeladener Zelle und Komplement ausbleibt oder zwar die eine Komplementkomponente — das Mittelstück — gebunden wird, das Endstück in Lösung bleibt. Man bezeichnet derartige Hemmungswirkungen, welche sich lediglich auf die Beeinflussung der Reaktionsfähigkeit beziehen, zweckmäßig als „antireaktive“.

Ferner ist auch in starker Agglutination oftmals ein mechanisches Moment, welches zur Hemmung der Hämolyse führt, erblickt worden. (Vgl. darüber die neuere Arbeit Händels.)

1. Chemikalien und Reagentien von antihämolytischer Wirkung.

Das fortgesetzte Studium der antihämolytischen Wirkungen, welches besonders durch die Verwendung der Komplementbindung zu praktischen Zwecken immer mehr im Vordergrunde des Interesses steht, hat uns bereits mit einer großen Reihe von Stoffen bekannt gemacht, welche die hämolytische Wirkung der Sera hemmen, und welche sie aufheben. Es empfiehlt sich ganz besonders, bei Prüfung auf antihämolytische Wirkung auch den zeitlichen Vorgang der Hämolyse zu beobachten, da sich sehr oft, wenn auch nach mehreren Stunden die Hämolyse komplett eingetreten ist, eine mehr oder minder große Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit wahrnehmen läßt, und das genügt natürlich schon, um darzutun, daß das betreffende Agens nicht indifferent ist, sondern eine hemmende Wirkung ausübt. Ein großer Teil der Substanzen, welche antihämolytisch wirken, ist schon bei der Besprechung der Komplemente erörtert worden. Es sei zunächst erinnert, daß das Milieu insofern von ausschlaggebendem Einfluß auf die Hämolyse ist, als ein Salzmangel die Hämolyse durch Immunambozeptoren und Komplement verhindert. Wenngleich es nach den bisherigen Erfahrungen zweifellos ist, daß unter diesen Verhältnissen eine Beeinflussung des Ambozeptors nicht erfolgt und sich die hemmende Wirkung lediglich auf das Komplement bezieht, so ist der Mechanismus dieser Wirkung doch noch nicht vollständig geklärt. Ferrata hat als Ursache für die Unwirksamkeit der komplexen Hämolysine im salzfreien Medium angenommen, daß das Komplement in salzfreier Lösung in die beiden bekannten Komponenten zerfällt. Es fragt sich aber noch weiter, ob die eine Komponente, das Mittelstück, dabei vielleicht gebunden wird und nur die Reaktion zwischen Mittelstück und Endstück ausbleibt. Daß jedenfalls das Zerfallen in die beiden Komponenten die primäre Ursache darstellt, kann man wohl als wahrscheinlich betrachten.

Gleichfalls erwähnt ist der hemmende Einfluß, den die meisten Salze in hypertonischen Lösungen, gewisse Salze bereits in isotonischen Lösungen ausüben. Auch der hemmende Einfluß der Salze bezieht sich unzweifelhaft auf die Komplementwirkung. Dabei muß es aber auch noch zweifelhaft erscheinen, auf welche Weise diese Wirkung durch die Salze verhindert wird. Man nimmt im allgemeinen wohl, und nicht mit Unrecht an, daß es sich um eine antireaktive Funktion der Salze handelt, d. h. um eine Wirkung, die darin besteht, daß die Bindung des Komplements an ambozeptorbeladene Blutzellen verhindert wird. Den Beweis dafür erblickt man darin, daß die Hämolyse wieder eintritt, wenn es gelingt, die störende Wirkung der Salze entweder durch Verdünnen der Lösungen oder durch chemische Reaktion (z. B. Eliminieren von Natriumzitrat durch Kalziumsalze) aufzuheben, jedoch ist auch eine andere Auffassung, wie sie z. B. von Hektoen und Rüdiger und Manwaring ausgesprochen wurde, schwer auszuschließen. Man kann nämlich auch annehmen, daß die Salze resp. ihre Ionen mit dem Komplement Doppelverbindungen eingehen, die inaktiv, aber reversibel sind, und so würde es sich erklären, daß nach dem Entfernen der Salze der ursprüngliche aktive Zustand wieder hergestellt wird. Gelingt es nicht, die Wirkung der Komplemente nach Entfernen des störenden Faktors wieder zu restituieren, so muß man unzweifellos annehmen, daß es sich um eine Zerstörung, oder um eine irreversible Modifikation resp. Verbindung handelt. Interessant sind die Hemmungen auf die Komplementwirkung, welche

durch gallensaure Salze nach Levaditi und Yamanouchi, sowie Neufeld und Händel, und durch oleinsaures Natron nach Sachs und Altmann ausgeübt werden. Diese Stoffe wirken nämlich antikomplimentär in solchen Dosen, in denen sie an und für sich hämolytisch wirken. Die von Sachs und Altmann, sowie Neufeld und Händel diskutierte Möglichkeit hat viel Wahrscheinlichkeit für sich, daß es sich hier um eine kombinierte Wirkung handelt, welche erst aus dem Zusammenwirken dieser Stoffe mit gewissen Serumbestandteilen resultiert*). Daß dabei gleichzeitig die hämolytische Wirkung der Seifen und gallensauren Salze nicht in Erscheinung tritt, ist verständlich, da das Serum die Wirkung dieser hämolytischen Agentien bekanntlich aufhebt.

Nicht ganz leicht zu beurteilen ist der hemmende Einfluß von Säuren und Alkalien auf die Hämolyse. Zwar ist festgestellt, daß größere Konzentrationen von Säure und Alkali die Komplemente dauernd inaktivieren, da das mit Säure und Alkali versetzte komplettierende Serum auch nach dem Neutralisieren unwirksam bleibt. Dagegen ist die Wirkung geringer Alkalikonzentrationen noch diskutabel, indem kleine Alkalimengen, wie zuerst v. Liebermann gefunden hat, einen hemmenden Einfluß auf die hämolytischen Sera ausüben, der aber beim Neutralisieren wieder schwindet. Hecker hat diese Wirkung auf eine reversible Modifikation der Komplemente bezogen, es läßt sich aber schwer ausschließen, ob die Wirkung eine antireaktive ist, und ferner müssen neuere, noch nicht publizierte Erfahrungen von Rondoni doch auch die Möglichkeit offen lassen, daß es sich hier um eine antireaktive Wirkung handelt, welche sich auf die Verankerung des Ambozeptors an die Zelle bezieht. Bei der Salzsäure liegen die Verhältnisse offenbar etwas anders. Hier hat Hecker gezeigt, daß eine Restitution der hämolytischen Wirkung durch Neutralisieren auch bei mäßigem Säuregrade nicht gelingt. Der Umstand, daß man nach v. Liebermann durch Säure den Ambozeptor den Blutzellen wieder entziehen kann, dürfte für die hier interessierende Frage keine Bedeutung haben, da die dazu erforderlichen Säurekonzentrationen augenscheinlich größer sind, als sie bei hämolytischen Versuchen angewandt werden können. Bei geringeren Säurekonzentrationen tritt ja aber gerade, wie sich das aus Untersuchungen von v. Liebermann, sowie Sachs und Altmann ergibt, eine Beschleunigung der hämolytischen Wirkung ein.

Als antikomplementär hat Tsurusaki die hemmende Wirkung des Harnstoffes und die stärkere des Schwefelharnstoffes erkannt, ebenso fand Tsurusaki Urethan, Guanidinkarbonat von antikomplementärer Wirkung. Man muß auch hier zweifelhaft sein, ob es sich um eine antireaktive Funktion oder um eine Veränderung resp. Bindung des Komplements handelt. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten kann man in manchen Fällen vielleicht dadurch entscheiden, daß man zwei parallele Versuche anstellt, in dem einen den hemmenden Stoff mit dem Komplement erst eine Zeitlang vor dem Zusatz von Blut und Ambozeptor digeriert, in dem andern alle Komponenten sofort mischt. Bei lediglich antireaktiver Wirkung muß die Hemmung in beiden Reihen quantitativ übereinstimmen, handelt es sich dagegen um eine Reaktion mit dem Komplement, so ist die Möglichkeit gegeben, daß die hemmende Wirkung bei späterem Zu-

---

*) Vielleicht ist dieser Mechanismus in Analogie zu setzen mit dem bei den syphilitischen Infektionen außerordentlich gesteigerten Vermögen des Serums, mit Seifen und anderen Lipoiden antikomplimentär wirkende Komplexe zu bilden.

satz von Blut und Ambozeptor mehr oder weniger verstärkt in Erscheinung tritt, wenngleich auch dann die Reaktion so schnell verlaufen kann, daß ein merkbarer Unterschied nicht eintritt. Auf derartige Bindungen oder Absorptionen werden die antikomplementären Wirkungen bezogen, welche eine Reihe von kolloidalen Stoffen ausüben. Nach den Untersuchungen von LINGELSHEIMS fällt der Schleim des Carraghenmooses Ambozeptoren und Komplemente aus. Antihämolytisch wirken ferner Glykogen, Inulin, Pepton, Albumosen (WENDELSTADT, LÖWENSTEIN, WASSERMANN und CITRON), Gelatine (WASSERMANN und CITRON), Tuberkulin, Urin, Extrakte aus Wolle, Lappen, Leder usw. (UHLENHUTH). UHLENHUTH hat darauf aufmerksam gemacht, daß die antihämolytische Funktion einer großen Reihe dieser Stoffe viel markanter bei Verwendung von Normalambozeptoren, als bei Verwendung von Immunambozeptoren in Erscheinung tritt. Die antikomplementäre und komplementabsorbierende Wirkung von verschiedenen Eiweißstoffen wurde besonders von LANDSTEINER und seinen Mitarbeitern untersucht und auf den kolloidalen Zustand bezogen. Dabei wurde noch eine große Reihe von anorganischen und anderen Kolloiden mit hereingezogen. LANDSTEINER und v. EISLER beschrieben antihämolytische Wirkung von Kasein, Sitosterin, Kieselguhr, Quarzsand, Kreide und Kohle, und LANDSTEINER und STANKOVIČ fanden auch Kaolin, koaguliertes Serumeiweiß, Eiweißniederschläge, welche durch Kieselsäure oder Abrin erzeugt war, von antikomplementärer Wirkung*). SELIGMANN beschreibt gleichfalls Komplementabsorption durch indifferente chemische Niederschläge (kolloidale Eisenhydroxydlösung, Soda + Kalziumchlorid, Mastix + Kochsalz, Schellack + Kochsalz, Schellack + Gelatine, Gelatine + Formalin, Mastix + Emulsion von Indophenol).

Ferner sind eine große Reihe von Lipoiden außer den schon erwähnten Seifen als antikomplementär oder komplementbindend beschrieben worden. WASSERMANN und CITRON beschreiben eine antikomplemnntäre Wirkung von Lecithin. Schon früher hatten LANDSTEINER und v. EISLER über antihämolytische Wirkungen des Lecithins berichtet, wobei sich verschiedene Lecithinpräparate als ungleich hemmend erwiesen. Sie bezogen die hemmende Wirkung des Lecithins in dem damaligen Zusammenhange wohl auf eine Hemmung der Ambozeptoren. Später haben LANDSTEINER und STANKOVIČ antikomplementäre Wirkungen von Cholestearin, Protagon, Tristearin beschrieben. Cholestearinazetat und -Benzoat zeigten sich unwirksam. Über antikomplementäre Wirkung von Neutralfetten berichten WASSERMANN und CITRON, und neuerdings beschreibt auch FROUIN Olivenöl, Triolein usw. als antihämolytisch.

Endlich haben WEIDANZ und BORCHMANN über eine Reihe von Stoffen berichtet, welche antikomplementär wirken können, wie z. B. Borsäure, Benzosäure, Formalin, Fluornatrium, Natriumsulfit usw. und die Extrakte aus einer Reihe von Gewürzen. Auch hier zeigte es sich, wie schon UHLENHUTH angegeben hatte, daß die antikomplementäre Wirkung vielfach bei Anwendung immunisatorisch erzeugter Ambozeptoren nicht wahrzunehmen ist, während sie bei Benutzung normaler Ambozeptoren in Erscheinung tritt.

---

*) LANDSTEINER und STANKOVIČ haben berichtet, daß auch Agglutinine durch Eiweißstoffe absorbiert werden, und LANDSTEINER und REICH haben im weiteren Verfolg dieser Feststellungen beobachtet, daß sich Kasein hierfür besonders eignet und daß die Agglutinine der normalen Sera durch Kasein beträchtlich leichter aufgenommen werden als die homologen Agglutinine der Immunsera.

Zu erwähnen ist noch, daß die Komplemente auch durch Fermente zerstört werden können, und daß dadurch eine antikomplementäre Wirkung verursacht werden kann. So haben Ehrlich und Sachs komplementzerstörende Wirkungen des Papains beschrieben, Flexner und Noguchi, Noc, Morgenroth und Kaya, Sachs die komplementzerstörende Wirkung des Kobragiftes, die offenbar gleichfalls auf einen fermentativen Prozeß zu beziehen ist. Erwähnt sei schließlich auch die von Sachs und Teruuchi ausgesprochene Hypothese, nach der die Zerstörung der Komplemente im salzarmen Medium durch ein im komplettierenden Serum selbst enthaltenes Ferment bedingt sein soll.

2. Antihämolytische Wirkungen durch normale tierische Gewebe und Säfte.

Von besonderer Wichtigkeit ist der Umstand, daß bereits normale Gewebe und die tierischen Säfte auf das Blutserum antihämolytische Wirkungen ausüben können. Methodisch sind dabei dieselben Wege vorgezeichnet, die wir schon besprochen haben. Eine hemmende Wirkung auf den Ambozeptor wird sich durch den Bindungsversuch in der Regel ohne Schwierigkeit beweisen resp. ausschließen lassen; dagegen wird man bei antikomplementären Wirkungen immer noch die Möglichkeit der antireaktiven Funktion und der Komplementbindung zunächst unentschieden lassen müssen. Man wird auch hier an erster Stelle die zeitlichen Verhältnisse in der etwaigen Reaktion zwischen hemmendem Material und Komplement zu berücksichtigen haben. Wenn es möglich ist, den Hemmungskörper nach dem Kontakt mit dem Komplement durch Zentrifugieren zu entfernen, wird es natürlich ohne weiteres zu entscheiden sein, ob es sich um Komplementbindung handelt oder nicht. Da eine große Reihe der oben beschriebenen antihämolytisch wirkenden Stoffe normale Bestandteile der tierischen Organismen bilden, wird man immer zu bedenken haben, ob die beobachtete antihämolytische Wirkung auf einen Gehalt an derartigen Stoffen zurückgeführt werden kann.

Komplementbindend wirken, wie zuerst v. Dungern festgestellt hat, die meisten tierischen Zellen, die man in Emulsion oder in Extrakten verwenden kann, nach den Feststellungen Muirs auch die aus den roten Blutkörperchen hergestellten Stromata.

Ebenso wirkt Hefepulver nach den Angaben v. Dungerns, wie Ehrlichs und Sachs' komplementbindend, Staphylokokkenemulsionen nach den Befunden von Ehrlich und Sachs. Diese antikomplementäre Wirkung dürfte nach den von Wilde erhobenen Befunden wohl allen Bakterienemulsionen eigen sein. Die antihämolytische Eigenschaft von Tuberkelbazillen und anderen Bakterien haben Levene und Baldwin näher analysiert.

Auch Leukocytenemulsionen sind, wie schon erwähnt, imstande, Komplement zu binden. Die komplementbindende Funktion der Organzellen ist jedenfalls weit verbreitet*) und von Römer, auch in der Linse, der Retina und dem Pigmentepithel aufgefunden worden. Friedemann beschreibt antihämolytische Wirkungen des Pankreasextraktes. Er fand dabei, daß die antikomplementäre Wirkung des Pankreasextraktes bei der Absorption durch Blutzelleu gleichzeitig mit demjenigen Bestandteil

*) Vielleicht erklärt sich dadurch auch die von Meltzer beschriebene Inaktivierung von fremdartigem hämolytischen Serum in der Bauchhöhle von Tieren.

verschwindet, welcher im Verein mit Meerschweinchenserum hämolytisch wirkt. Er hält daher die hämolytische Komponente des Pankreas und die antihämolytisch wirkende für identisch. Ebenso fand beim Erwärmen auf verschiedene Temperaturen eine parallele Zerstörung beider Wirkungen statt*).

Eine weitere Frage ist es nun, wodurch die antikomplementäre Wirkung der Organzellen resp. ihrer Extrakte veranlaßt ist. Man kann die wirksame Komponente der Organzellen resp. der Organextrakte als Rezeptoren im Sinne EHRLICHS auffassen, die vielleicht sessile Rezeptoren dritter Ordnung, also sessile Ambozeptoren darstellen. In diesem Sinne würde sich die weitverbreitete komplementbindende Funktion der Organzellen gut erklären, und auch RÖMER hat die von ihm beobachteten antikomplementären Wirkungen der Linse, der Retina und des Pigmentepithels auf komplementophile Gruppen bezogen.

Besonders scheinen auch die von HESS und RÖMER beschriebenen elektiven antihämolytischen Funktionen des Pigmentepithels und der Retina sehr im Sinne von echten antikomplementären Wirkungen zu sprechen.

MUIR hat den Mechanismus der direkten Bindung von Komplement an Organzellen unter Benutzung von Blutkörperchen-Stromata näher untersucht. Dabei stellte er fest, daß die Bindung eine feste ist, daß die einmal mit Komplement beladenen Stromata auch dann nicht antikomplementär wirken, wenn das Komplement durch Erhitzen auf 55° zerstört ist, und daß die Bindung bei 0° ausbleibt.

In neuerer Zeit macht sich das Bestreben geltend, die antihämolytischen Wirkungen der Organzellen und ihrer Extrakte auf ihren Gehalt an Lipoiden zu beziehen, deren antihämolytische Funktionen ja schon erwähnt sind. Diese Forschungen nehmen ihren eigentlichen Ausgangspunkt von der Feststellung RANSOMS, daß die Saponinhämolyse durch Cholestearin aufgehoben wird. An diesen Befund schlossen sich eine ganze Reihe von Arbeiten über den Einfluß der Lipoide auf die Wirkung der verschiedensten hämolytischen Agentien an. An dieser Stelle können entsprechend dem vorliegenden Gegenstand nur diejenigen Angaben berücksichtigt werden, welche die hemmende Wirkung von Zellipoiden auf die durch das Zusammenwirken von Ambozeptor und Komplement bedingte Hämolyse betreffen**). Die ersten, welche den Einfluß von Zellipoiden auf die Serumhämolyse untersuchten, waren wohl LANDSTEINER und V. EISLER. Diese Autoren gingen von der Annahme aus, daß bei der Hämolyse durch Serum eine Einwirkung auf die lipoiden Zellteile stattfindet, und suchten sich darüber in ähnlicher Weise Klarheit zu verschaffen, wie es RANSOM bei der Analyse der Saponinhämolyse tat. LANDSTEINER und V. EISLER extrahierten serumfrei gewaschene Blutkörperchen mit Petroläther und erhielten nach dem Abdampfen des Petrolätherextraktes auf dem Wasserbade einen Rückstand von 0,004 g aus 10 ccm Blut. Den Rückstand digerierten sie $1^1/_2$ bis 2 Stunden mit hämolytischem Serum bei 37° und filtrierten danach das Serum von den ungelösten Partikelchen ab. Es ergab sich eine Herabsetzung der hämolytischen Wirkung durch die Petrolätherextrakte. Die Autoren beobachteten dabei eine ge-

---

*) Formal erinnert dieses Verhalten an die antikomplementäre Wirkung der Seifen und gallensauren Salze.

**) Bezüglich der biologischen Funktionen der Lipoide im Allgemeinen sei auf die Übersicht von JSCOVESCO verwiesen.

wisse Spezifität insofern, als die hämolytische Wirksamkeit der Sera am meisten für diejenigen Blutarten herabgesetzt war, aus denen die Petrolätherextrakte gewonnen waren. In weiteren Versuchen konnten Landsteiner und v. Eisler ihre früheren Angaben bestätigen und dabei eine allerdings nur beschränkte Spezifität des Bindungsvermögens der Ätherextrakte feststellen. Aus besonderen Versuchen glaubten sie schließen zu müssen, daß die antihämolytiche Wirkung durch eine Bindung der Ambozeptoren bedingt ist, und zur weiteren Erhärtung dieses Schlusses führen sie Versuche an, aus denen sich ergeben hat, daß Blutkörperchenstromata weniger Hämolysin binden, wenn zu ihrer Bereitung fettlösende Agentien benutzt wurden. Gegenüber der Annahme, daß die Bindung der Ambozeptoren lediglich durch die Lipoide bedingt ist, kommen ihnen allerdings selbst Bedenken dadurch, daß die bindende Fähigkeit der Extrakte im Vergleich mit derjenigen der intakten Zellen doch nur gering war. Sie diskutierten daher die Möglichkeit, daß die bindenden Stoffe Lipoid-Eiweißverbindungen sind*).

Antihämolytische Stoffe durch Extraktion von Blutzellen mit Äther haben ferner Bang und Forssmann beschrieben. Auf die Untersuchungen dieser Autoren ist schon im ersten Band dieses Handbuches (Antigene tierischen Ursprungs) eingegangen worden. Bang und Forssmann fanden bekanntlich, daß Ätherextrakte aus roten Blutkörperchen antihämolytisch wirken und gleichzeitig Hämolysine erzeugen können, eine Angabe, die ja allerdings nicht unwidersprochen geblieben ist**). Jedenfalls konnten sie die antihämolytische Wirkung von der antigenen dadurch trennen, daß die antihämolytische Substanz bei Extraktion des Ätherrückstandes mit Benzol oder Aceton in diese Lösungsmittel überging***). Während sie zuerst glaubten, daß es sich um eine Antiambozeptorwirkung handelte, haben Bang und Forssmann selbst durch spätere Versuche festgestellt, daß die hemmende Wirkung dieser Ätherextrakte antikomplementären Charakter hat. Dieses Ergebnis steht also in einem gewissen Gegensatz zu den Angaben von Landsteiner und von Eisler, nach denen die hemmende Wirkung der Ätherextrakte durch eine Bindung des Ambozeptors bedingt ist. Dautwitz und Landsteiner haben diesen Widerspruch durch weitere Untersuchungen aufzuklären versucht. Sie gelangen zu dem Schluß, daß der in Aceton lösliche Teil der Ätherextrakte allerdings antikomplementär wirkt, daß dagegen dem in Aceton unlöslichen Teil die Fähigkeit zukommt, Ambozeptoren zu binden, aber nur die Ambozeptoren der normalen Sera, nicht die Immunambozeptoren, mit denen Bang und Forssmann gearbeitet haben.

Im Anschluß hieran möchte ich noch kurz auf die Methodik der durch native oder veränderte Blutkörperchenstromata und ihre Extrakte veranlaßten Hemmungserscheinungen zurückkommen. Ein Hinweis darauf scheint mir wichiig, in Anbetracht der von Bang und Forssmann gezogenen weittragenden Schlußfolgerungen über die Verschiedenheit von ambozeptorbindenden und Ambozeptor erzeugenden Stoffen. Gegenüber

*) Verwiesen sei in dieser Hinsicht auch auf die Untersuchungen Lazars, welche die Hemmung der Agglutination von Taubenblutkernen durch lackfarbenes Taubenblut und Kaninchenserum betreffen.

**) In bezug auf die weitere Analyse der von Bang und Forssmnnn als lysinogen beschriebenen Substanz ist noch auf die nach Herausgabe des ersten Bandes dieses Handbuches erschienene Arbeit von Takaki zu verweisen.

***) In ähnlicher Weise hat auch Noguchi antilytisch wirkende Extrakte („Protektin") aus roten Blutzellen gewonnen.

dem einen Beweisgliede der Autoren, daß die Ätherextrakte immunisierend wirken, aber nicht mehr ambozeptorbindend, habe ich schon an anderer Stelle Einwände geäußert, die einmal darin begründet sind, daß die Avidität der gelösten Rezeptoren nicht so hoch zu sein braucht, daß eine irreversible Reaktion unter dem Ausdruck einer Hemmung der Hämolyse zustande kommt, dann aber auch darin bestehen, daß die immunisierende Funktion eine weit feinere Reaktion darstellt als die Fähigkeit der Ambozeptorbindung. Einwände ähnlicher Art sind kürzlich auch von L. von Liebermann geäußert worden, der sehr zutreffend bemerkt, daß ein negativer Ausfall bei der Ambozeptorbindung durch gelöste Rezeptoren nichts beweist, da kein Grund vorliegt zu der Annahme, daß der Ambozeptor sich lieber mit den von den Blutkörperchen abgespaltenen als mit den an ihm haftenden Rezeptoren verbinden sollte. Diskutabel erscheinen daher nur diejenigen Versuche von Bang und Forssmann, in welchen sie zeigen, daß Blutkörperchenstromata durch kurzes Kochen ihre ambozeptorbindende Fähigkeit einbüßen, die immunisierenden Funktionen aber noch bewahren.

Allerdings muß von vornherein daran erinnert werden, daß diese Angabe im Gegensatz steht zu den von Muir und Fergusson erhobenen Befunden, nach denen auch nach einstündigem Erhitzen auf 100° noch ein beträchtliches Bindungsvermögen der Stromata erhalten war. Auch diese Versuche von Bang und Forssmann können einer strengen Kritik nicht standhalten, wie ich schon früher erörterte und letzthin auch von Liebermann von anderen Gesichtspunkten aus gezeigt hat. von Lieberemann macht insbesondere darauf aufmerksam, daß die Verbindungen gewisser Stromata mit Ambozeptoren in physiologischer Kochsalzlösung offenbar so stark löslich sind, daß sie gar nicht abzentrifugiert werden können. Wenn das aber der Fall ist, so ist wiederum die Möglichkeit gegeben, daß trotz Vorhandenseins von ambozeptorbindenden Substanzen ein Überspringen oder eine Verteilung der Ambozeptoren stattfindet, so daß die Hemmung der Hämolyse ausbleibt, oder nur in einer verminderten Reaktionsgeschwindigkeit zum Ausdruck kommt. Man kann jedenfalls den Einwand nicht ausschließen, daß durch das Kochen der Stromata Alterationen Platz greifen, welche den Nachweis bindender Gruppen trotz ihres Vorhandenseins unmöglich machen. Forssmann scheint wohl auch selbst die Möglichkeit der geäußerten Einwände anerkannt zu haben, denn er hat nach neuen Beweismitteln für die Differenzierung von antigener und ambozeptorbindender Substanz in den roten Blutzellen gesucht. Die eigenartige Methode, die er zu diesem Zweck benutzte, war folgende: In Kollodiumkapseln wurden Bluskörperchenstromata in der Bauchhöhle von Tieren eingeschlossen. Es zeigte sich, daß unter dem Einfluß von Bakterien oder Fermenten Antigene diffundieren und auf diese Weise eine Hämolysinbildung ausgelöst werden kann. In einigen Fällen ging die Dialyse so weit, daß der Kapselrückstand nicht mehr immunisierend wirkte, aber noch imstande war, Ambozeptoren zu binden. Auch gegen diese Befunde hat bereits von Liebermann Einwände erhoben, in denen er verschiedene Möglichkeiten in Betracht zieht. Er diskutiert einmal die Möglichkeit, daß die Stromata zweierlei ambozeptorbindende Substanzen enthalten, von denen nur die eine als Antigen wirkt*). Ferner ist es

*) Man kann sich vorstellen, daß dem anderen bindenden Bestandteil die Fähigkeit des „Reizes“ fehlt, der ja in neuerer Zeit von einer Reihe von Autoren für die Antikörperbildung erforderlich erachtet wird.

nach von Liebermann möglich, daß das Antigen eine komplexe Verbindung ist, derart, daß beide Komponenten (z. B. Protein und Lipoid) haptophore Gruppen besitzen, aber nur eine von beiden den zur Ambozeptorbildung erforderlichen Reiz ausüben kann. Drittens kann nach von Liebermann das Forssmannsche Resultat auch durch die Möglichkeit erklärt werden, daß in dem Kapselinhalt überhaupt kein ursprünglich vorhandenes Antigen mehr enthalten war, sondern ein durch Zersetzung entstandener Körper von antihämolytischer Wirkung, oder endlich Bakterien, welche ja bekanntlich in hohem Grade eine hemmende Wirkung auf die Hämolyse ausüben. Bei der großen Reihe von antihämolytisch wirkenden Stoffen und Faktoren, die wir kennen, muß man in der Tat sehr daran denken, daß die antihämolytische Wirkung, welche Forssmann durch den infizierten und sicherlich stark veränderten Kapselinhalt eintreten sah, durch andere Faktoren als durch eine spezifische Ambozeptorbindung verursacht ist. Auch ist der Einwand schwer auszuschließen, daß bei denjenigen Tieren, deren Serum nach Injektion des Kapselinhaltes nicht hämolytisch wirkte, Ambozeptoren doch gebildet waren, ihr Nachweis aber durch das gleichzeitige Vorhandensein antikomplementär wirkender Stoffe (Komplementbindung durch das Zusammenwirken von Eiweißantigen und Antikörper) nicht ohne weiteres gelang*). Das von Bang und Forssmann beigebrachte Versuchsmaterial ist also bisher, wie auch von Liebermann betont, durchaus nicht hinreichend, um eine Verschiedenheit der antigenen und ambozeptorbindenden Eigenschaften der Zelle zu beweisen.

Was nun die antihämolytische Wirkung, welche von tierischen Säften und insbesondere vom Blutserum ausgeübt werden, anlangt, so sind wir mit einem übergroßen Tatsachenmaterial bekannt geworden, dessen Deutung und Klassifizierung aber auch heute noch zuweilen gewissen Schwierigkeiten begegnet. Will man normales Blutserum auf antihämolytische Fähigkeit prüfen, so verfährt man, um die hämolytische oder komplettierende Fähigkeit des Serums auszuschalten, in der Regel derart, daß man die Komplemente durch thermische Eingriffe inaktiviert. Dabei hat man eine antihämolytische Wirkung sowohl dann eintreten sehen, wenn man inaktiviertes Serum auf das gleiche aktive einwirken läßt, als auch, wenn man inaktives Serum gegenüber andersartigen hämolytisch wirkenden Seris in Aktion treten läßt.

Beobachtungen der ersteren Art rühren bereits von Camus und Gley her. Diese Autoren stellten fest, daß Aalserum und ebenso andere Sera im inaktivierten Zustande die Hämolyse durch das artgleiche frische Serum hemmen können. Daß aber auch normale Sera einen antilytischen Einfluß auf andersartige hämolytische Sera ausüben können, zeigte bald darauf in ausführlichen Versuchsreihen P. Th. Müller. Er konstatierte, daß diese antihämolytischen Fähigkeiten vielfach erst nach dem Erhitzen der Sera in Erscheinung treten. Daß sie trotzdem bereits im aktiven Serum vorhanden und nur durch die gleichzeitige Gegenwart lösender Stoffe verdeckt waren, konnte Müller dadurch zeigen, daß er die Lysine durch Bindung der Ambozeptoren in der Kälte unwirksam machte. Dann wiesen auch die aktiven Sera antihämolytische Wirkung auf. Müller wies nach, daß die antihämolytische Kraft der von ihm untersuchten Sera auf einer antikomplementären Fähigkeit beruht. Gleich-

*) Zu diskutieren wäre auch die Möglichkeit, daß sich neben hämolytischen Ambozeptoren auch solche gebildet haben, welche das Komplement an die Zellen verankern, ohne hämolytisch zu wirken (Bindung der Komplemente an nicht dominanter Stelle im Sinne Ehrlichs, Bordetsche Antikörper im Sinne Neufelds).

zeitig beobachtete Müller aber, daß Sera auch gegen die Hämolyse der artgleichen Blutkörperchen schützen können, und gleichfalls erst nach dem Inaktivieren. Er erkennt hier natürlich an, daß im aktiven Serum die antihämolytische Wirkung nicht durch gleichzeitig vorhandene Lysine verdeckt sein kann, und läßt die Ursache dafür, daß erst das erhitzte Serum antihämolytisch wirkt, offen. In einem derartigen Fall charakterisierte er die Art der hemmenden Funktion als Antiambozeptorwirkung. Man kann ja immerhin daran denken, daß in solchen Fällen, in denen die hemmende Wirkung erst dann in Erscheinung tritt, wenn das Serum erhitzt worden ist, wenn auch kein vollständiges Hämolysin, so doch ein zur Aktivierung des zur Hämolyse benutzten Ambozeptors geeignetes Komplement im aktiven Serum vorhanden ist und auf diese Weise im frischen Serum die antilytische Kraft verdeckt wird. Allerdings dürfte nach den Beobachtungen Noguchis diese Erklärung nicht durchgängig anwendbar sein; es erscheint aber wohl überhaupt nicht möglich, die antihämolytischen Wirkungen, welche von den verschiedenartigsten Seris gegenüber ganz verschiedenen hämolytischen Kombinationen ausgeübt werden, auf eine einheitliche Ursache zurückzuführen.

Man könnte ja versucht sein, alle hemmenden Wirkungen normaler Sera, wenn eine direkte Einwirkung auf den Ambozeptor durch den Bindungsversuch ausgeschlossen ist, als antireaktiv aufzufassen, wie dies jüngs Bordet und Gay zu tun sich bestreben. Es soll durchaus nicht bestritten werden, daß Blutsera, ebenso wie chemisch isolierte Stoffe (z. B. Salze) eine antihämolytische Wirkung dadurch entfalten können, daß sie die Bindung des Komplements an die ambozeptorbeladenen Blutzellen verhindern, ohne Antikomplemente im eigentlichen Sinne zu sein; aber die Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten ist, wie schon erwähnt, eine recht schwierige. Bordet und Gay beschreiben derartige Hemmungswirkungen als rein antireaktiv und nicht antikomplementär aus dem Grunde, weil sie zeigen konnten, daß derartige antagonistische Funktionen nicht sowohl von der Serummenge, als vielmehr von der Serumkonzentration abhängig sind. Es gelang ihnen durch Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung, die gehemmte Hämolyse wieder hervortreten zu lassen, aber man kann natürlich auch dabei daran denken, daß die Verbindungen von Komplement und Antikomplement reversibel sind und proportional dem Verdünnungsgrade dissoziieren. An und für sich ist der von Bordet und Gay geführte Nachweis interessant, daß man auch im normalen Kaninchenserum Ambozeptoren für Rinderblut nachweisen kann, dadurch, daß man Rinderblut mit Kaninchenserum digeriert, sodann abzentrifugiert und die Sedimente mit Meerschweinchenserum versetzt. Es tritt dann Hämolyse ein, während bei der Mischung von Kaninchenserum, Meerschweinchenserum und Rinderblut eine hämolytische Wirkung nicht wahrzunehmen ist. Es kann sich dabei natürlich ebenso um eine antireaktive Funktion des Kaninchenserums als solche, als auch um das Vorhandensein von Antikomplementen im Kaninchenserum neben Ambozeptoren handeln. Die von Bordet und Gay benutzte Methode zum Nachweis dieser Ambozeptoren ist übrigens nicht neu. Sie stellt dasselbe Prinzip dar, daß bereits Morgenroth zur Aufdeckung larvierter Ambozeptoren im Serum von Kaninchen, die mit Ziegenserum vorbehandelt waren, angewandt hat (vgl. auch Marshall und Morgenroth). Es handelt sich eben ganz allgemein darum, in solchen Fällen, in denen das Serum an und für sich in irgend einer Weise antikomplementär wirkt und derart die Bindung der Komplemente

an die ambozeptorbeladenen Blutzellen verhindert, den störenden Faktor dadurch zu eliminieren, daß man die Ambozeptoren zuerst verankert und die übrigen Serumbestandteile vor dem Komplementzusatz entfernt.

Die Tatsache, daß auch das inaktivierte Serum gegenüber der hämolytischen Wirkung des gleichartigen frischen Serums hemmend wirken kann, ist besonders beim menschlichen Serum eingehend untersucht worden, seitdem E. Neisser und Döring diese Funktion des inaktivierten Serums gerade bei einigen Fällen von Urämie beobachtet hatten. Die reichhaltige Literatur, welche diese interessante Feststellung im Gefolge hatte, ist schon an anderer Stelle erörtert worden. Und sehr verschieden sind die Deutungen, welche diesem Phänomen, das sich ja übrigens für Urämie durchaus nicht spezifisch erwies, gegeben wurden. Übereinstimmend wird angenommen, daß es sich um eine Wirkung auf das Komplement und nicht auf den Ambozeptor handelt. Was die Art dieser Wirkung anlangt, so glaubten Neisser und Friedemann, daß es sich um komplementophile Ambozeptoide handelte, während v. Bergmann und Keuthe die Anschauung vertreten, daß das Hemmungsphänomen durch Antikomplemente verursacht wird, die zwar schon im aktiven Serum vorhanden, aber durch das Komplement des Serums bereits abgesättigt seien. Durch Erhitzen des Serums soll dann das Komplement des Serums zerstört und dadurch das Antikomplement wieder wirkungsfähig werden. In einer neueren Arbeit vertreten v. Bergmann und Savini den Standpunkt, daß die antikomplementäre Wirkung dabei erst durch das Zusammenwirken von gewissen Antigenen und Antikörpern zustande kommt. Sie stützen sich dabei insbesondere auf Versuche an phosphorvergifteten Kaninchen, in denen sie zeigen, daß die hemmende Wirkung des inaktivierten Serums dieser Tiere durch Zugabe von Extrakten aus den Lebern der gleichen Tiere verstärkt wird. Hoffmann beobachtete das Auftreten des Neisser-Döringschen Phänomens auch bei mit Eiweiß immunisierten Tieren. Vielleicht gehört zu den gleichartigen Befunden auch die Feststellung von Meltzer und Salant, daß das Serum der nephrektomierten Kaninchen einen antihämolytischen Körper enthalte, der allerdings von den Autoren als thermolabil bei 58° beschrieben wird.

Noguchi hat die antihämolytische Wirkung normaler Sera bei einer Reihe von Kombinationen untersucht und gibt an, daß in den meisten Fällen die antihämolytische Wirkung beim Erhitzen der Sera auf 56° und höher zu beobachten ist. Durch weiteres Erhitzen über 70° soll die antihämolytische Wirkung wieder abnehmen. Noguchi beschreibt die hemmende Wirkung als antikomplementär, berichtet aber gleichzeitig, daß die antihämolytische Wirkung durch Digerieren mit den Blutzellen reduziert wird und die derartig vorbehandelten Blutkörperchen resistenter gegenüber der Wirkung des hämolytischen Systems waren. Man kann dabei an Verstopfung der Rezeptoren durch cytophile Ambozeptoide denken. Daneben kommen vielleicht auch antikomplementär wirkende Stoffe, eventuell von Ambozeptorcharakter, in Betracht. Noguchi stellte auch fest, daß man mit Äther aus dem Blutserum, ebenso wie aus Zellen, antilytisch wirkende Stoffe extrahieren kann. Dieser Extrakt, den er „Protektin“ nennt, erwies sich in bezug auf die hemmende Wirkung ebenso wie das native Blutserum antikomplementär und resistenzsteigernd für die Blutkörperchen. Er blieb aber beim Erhitzen auf 90° und höhere Temperaturen unbeeinflußt. Noguchi hält dabei die Substanzen dieser Extrakte mit den antihämolytisch wirkenden

Stoffen des Blutserums für identisch. Dieser Schluß dürfte allerdings nicht ohne weiteres berechtigt sein. Die Tatsache, daß man aus dem Blutserum Lipoide von antihämolytischer Kraft extrahieren kann, beweist noch nicht, daß auch das native Blutserum seine antilytischen Eigenschaften lediglich seinem Gehalt an Lipoiden verdankt. Es kommen ja außer den Lipoiden noch eine Reihe von anderen bekannten Stoffen im Blutserum vor, welche antikomplementär wirken können. Es erscheint aber durchaus nicht angängig, die Wirkung des nativen Serums auf einen Bestandteil zurückzuführen, welcher in isoliertem Zustande eine formale Analogie zu dem Gesamtserum aufweist. Es wäre ebenso irrig, wenn man aus der Tatsache, daß die Blutsera Seifen und andere hämolytisch wirkende Lipoide enthalten, den Schluß ziehen wollte, daß die Hämolysine des Blutserums mit diesen Lipoiden identisch sind. Selbst diejenigen Autoren (von Liebermann, Noguchi), welche den Seifengehalt des Blutserums mit seiner hämolytischen Wirksamkeit in Verbindung bringen, identifizieren nicht Seife und Hämolysin, sondern nehmen nur an, daß die Seifen in Verbindung mit anderen Stoffen erst die eine Komponente des Hämolysins, das Komplement, darstellen. Und trotzdem kann man ja ohne weiteres, wie wir dies besonders aus den Beobachtungen von Liebermanns wissen, eine große Reihe von Analogien zwischen dem Verhalten des Blutserums und der, zumal mit Eiweißlösungen vermischten, Seifen in bezug auf ihre hämolytische Wirkung feststellen.

Man wird eben bei der Analyse der antihämolytischen Wirkungen der Blutsera nicht verallgemeinern dürfen, sondern sich stets der zahlreichen Möglichkeiten, welche vorkommen können, bewußt bleiben müssen. So ist die interferierende Wirkung von Komplementoiden, wie sie zuerst von Ehrlich und Sachs beobachtet wurde, auch heute noch aufrecht zu erhalten, und selbst für derartige Fälle, in denen es sich um eine Hemmungswirkung bei gleichzeitigem Mischen der Blutzellen mit hämolytischem System und inaktiviertem Serum handelt, liegen die Verhältnisse durchaus nicht immer so, wie es Bordet und Gay annehmen, daß nämlich das inaktve Serum einfach durch antireaktive Funktionen die Komplementbindung verhindert. Wir wissen ja durch die Untersuchungen von Muir und Browning, daß z. B. bei Benutzung eines Immunambozeptors und Meerschweinchenserum als Komplement die zur Hämolyse erforderlichen Komplementmengen zwar sehr variieren, je nachdem in der Zwischenflüssigkeit sich noch verschiedene inaktivierte Sera befinden. Die größte Hemmungswirkung haben Muir und Browning aber durch inaktives Meerschweinchenserum beobachtet, also durch das gleiche Serum, das in ihren Versuchen auch als Komplement fungierte. Die hemmende Wirkung des inaktivierten Meerschweinchenserums wurde aber ganz erheblich abgeschwächt, wenn die Komplemente des Meerschweinchenserums vor dem Inaktivieren durch ambozeptorbeladene Stromata entfernt worden waren, und man wird Muir und Bronwing recht geben müssen, wenn sie daraus folgern, daß die hemmende Wirkung des inaktivierten Meerschweinchenserums mindestens zu einem wesentlichen Teil durch dessen Gehalt an Komplementoiden bedingt ist. Seligmann, der eine analoge Hemmungswirkung des inaktivierten Meerschweinchenserums beobachtete, glaubt allerdings, Komplementoide ausschließen zu könnnen, ebenso aber eine hemmende Wirkung im Sinne eines Antiambozeptors oder eines Antikomplements. Er ist geneigt, den Vorgang unter physikalischen Gesichtspunkten zu betrachten und zu den Ad-

sorptions- und Umhüllungserscheinungen zu rechnen. Erklärungsmöglichkeiten bieten sich vielleicht aber auch durch die Annahme kombinierter Wirkungen, die erst in ihrer Gesamtheit den antilytischen Effekt bedingen. Man wird eben immer die von Morgenroth charakterisierten Möglichkeiten vor Augen behalten müssen, von denen außer der Komplementoidwirkung noch besonders Antiambozeptoren, cytophile Ambozeptoide und eigentliche antikomplementäre Wirkungen in Betracht kommen. Besonders würde eine beschränkte Thermostabilität geeignet sein, nach derartigen Faktoren zu suchen. Eine größere Thermostabilität oder gar Koktostabilität würde in der Regel darauf hinweisen, daß es sich nicht um alterierte Komponenten der Cytotoxine oder um normale Antikörper derselben (Antikomplemente oder Antiambozeptoren im engeren Sinne) handelt. Dagegen ist eine mehr oder minder ausgesprochene Spezifität wiederum geeignet, im Sinne von echten Haptinen zu sprechen.

Als normale Antiambozeptoren wurden zuerst von P. Th. Müller sowie von Ehrlich und Morgenroth die der hemmenden Wirkung gewisser Sera zugrunde liegenden Substrate beschrieben. Antikomplemente wurden zuerst von Müller im normalen Blutserum nachgewiesen. Das vielfache Vorkommen normaler Antikomplemente im Serum kann man sich nach der von Ehrlich und Morgenroth aufgestellten Ambozeptortheorie leicht vorstellen; denn es ist ja klar, daß Ambozeptoren, wenn nur die Avidität der komplementophilen Gruppe hinreichend ist, um ohne vorherige Verankerung an das entsprechende Substrat zu reagieren, als Antikomplemente fungieren können. Man wird allerdings heute, da wir wissen, daß eine Komplementbindung durch das Zusammenwirken von gelösten Antigenen und ihren Antikörpern zustande kommt, auch immer daran denken müssen, daß es sich bei den antikomplementären Wirkungen normaler Blutsera um derartig komplementbindende Ambozeptoren handelt, die ja gleichzeitig in dem als Komplement dienenden Serum auch die geeigneten Antigene vorfinden können. Eine Entscheidung für diese Möglichkeit, auf die ich schon an anderer Stelle hingewiesen habe, ist schwer zu erbringen. Wassermann und Citron haben ja in umgekehrter Weise gezeigt, daß normale Blutsera bereits bindende Gruppen für Glykogen, Pepton, Albumosen enthalten, und es erscheint auf Grund ihrer Erfahrungen naheliegend, die antikomplementären Wirkungen, welche diese Stoffe an und für sich ausüben, gleichfalls auf ein komplexes Phänomen zurückzuführen. Wassermann und Citron weisen mit Recht darauf hin, daß wir garnicht in der Lage sind, Antigene und Komplemente isoliert miteinander zu vereinigen. In dem komplementhaltigen Serum können ja immer außer dem Komplement noch Normalambozeptoren für die betreffenden Stoffe vorhanden sein. Und umgekehrt wird man die Möglichkeit erwägen müssen, daß auch beim Mischen eines inaktiven Serums mit einem komplementhaltigen anderer Art das eine Serum einen Ambozeptor, das andere ein geeignetes Antigen liefert, und daß durch dieses Zusammenwirken eine Komplementbindung zustande kommt. Schließlich ist es auch denkbar, daß in einem und demselben Serum bereits derartige Komplexe von Antigen und entsprechenden Ambozeptoren kreisen, die als Antikomplemente imponieren.

Die antihämolytischen Wirkungen menschlicher Blutsera sind auch von Marshall und Morgenroth eingehend untersucht worden. Diese Autoren gelangten zu dem Schluß, daß die Antikomplementwirkung bei weitem überwiegt. Daneben konnten in geringen Mengen auch Antiambozeptoren nachgewiesen werden. Marshall und Morgenroth

wenden sich besonders gegen die von Besredka vertretene Anschauung, daß sich im menschlichen Serum nur ein einheitliches Antihämolysin befindet, welches die Hämolyse von menschlichen Blutkörperchen hemmt und als Antiambozeptor aufzufassen wäre. Marshall und Morgenroth zeigen demgegenüber, daß die verschiedensten Serumarten menschliche Blutkörperchen gegen Hämolysin schützen und umgekehrt auch Menschenserum die Hämolyse von andersartigen Blutzellen hemmt. Die geringen Antiambozeptorwirkungen, welche sie nachweisen konnten, beziehen sie auf das Vorhandensein von freien Rezeptoren im Serum, die ja als Antiambozeptoren der cytophylen Ambozeptorgruppe wirken müssen. Auf die methodischen Schwierigkeiten, welche sich beim Nachweis derartig gelöster Rezeptoren darbieten, habe ich schon an anderer Stelle aufmerksam gemacht. Von Marshall und Morgenroth sind ferner auch eine Reihe von pathologischen Exsudaten auf antihämolytische Wirkung untersucht worden. Auch diese erwiesen sich, ebenso wie die menschlichen Blutsera im wesentlichen antikomplementär und weit schwächer auf den Ambozeptor wirkend. Methodisch interessant waren die Untersuchungen einer Ascitesflüssigkeit, in welcher gleichzeitig Antiambozeptoren, Antikomplemente und Ambozeptoren nachgewiesen werden konnten, wobei die letzteren durch die Antikomplemente larviert waren. Lüdke hat in menschlichen Transudaten und Exsudaten Antiambozeptoren und Antikomplemente beschrieben.

Eine besondere Besprechung erfordern noch die als „antagonistisch" erkannten Eigenschaften des Blutserums, dessen Kenntnis wir Pfeiffer und Friedberger verdanken. Für die Hämolysine wurden diese Stoffe zuerst von Sachs beschrieben. Das Phänomen besteht darin, daß normale Sera, welche für die Hämolyse von Blutkörperchen durch Immunserum und Komplement indifferent sind, dann eine antihämolytische Wirkung entfalten, wenn sie zuvor mit den gleichen Blutkörperchen digeriert sind. Zur Demonstration dieser Wirkung verfährt man also in der Weise, daß man das inaktivierte Serum mit dem Sediment eines nicht zu knapp bemessenen Überschusses von Blut eine Stunde bei 37° digeriert und darauf das Serum durch Zentrifugieren von den Blutkörperchen trennt. Man findet dann, daß das derart vorbehandelte Serum in spezifischer Weise antihämolytisch wirkt nur gegenüber der Hämolyse derjenigen Blutart, mit der es vorbehandelt wurde. Wie Sachs aber festgestellt hat, tritt diese „antagonistische" Funktion nach der Ausfällung des Normalserums mit Blutkörperchen nur dann in Erscheinung, wenn das native Serum hämolytische Ambozeptoren für die betreffende Blutart enthält. Ist das nicht der Fall, so wirkt das Serum bereits im nativen Zustande antihämolytisch und beim weiteren Digerieren mit Blutzellen tritt keine Verstärkung dieser antihämolytischen Wirkung ein. Diese sogenannten „antagonistischen" Stoffe sind also im Serum präformiert und werden nur durch die gleichzeitig vorhandenen Ambozeptoren verdeckt. Sachs hat die Art dieser Hemmungswirkung als antikomplementär aufgefaßt. Er nimmt an, daß die große Schar der im Normalserum vorhandenen Ambozeptoren als Antikomplemente wirkt, wenn die Zellen, welche zur Hämolyse dienen, nicht die entsprechenden Antigene sind. Sind dagegen im Serum auch Ambozeptoren für diese Zellart vorhanden, so bleibt die hemmende Wirkung aus, weil die an die Zelle gebundenen normalen Ambozeptoren eine höhere Avidität zum Komplement haben, als die normalen freien Ambozeptoren. Dagegen bleibt die Avidität der an die Zelle verankerten Immunambozeptoren noch immer hinter der

Avidität der freien Normalambozeptoren zurück. Wie Sachs von vornherein aufmerksam gemacht hat, müssen natürlich Verhältnisse der Massenwirkung dabei gleichfalls berücksichtigt werden. Auf andersartige Deutungsversuche, wie sie von Gay unternommen wurden, braucht nicht näher eingegangen zu werden, da sie von Sachs, sowie von Pfeiffer und Friedberger als sicherlich nicht zutreffend zurückgewiesen wurden; es sei nur auf die betreffenden Arbeiten hingewiesen. Bordet und Gay bestätigen in einer neueren Arbeit, daß die antagonistische Wirkung der normalen Sera nicht eine Beeinflussung des Ambozeptors betreffe; dagegen halten sie sie, wie schon erwähnt, nicht für antikomplementär im engeren Sinne, sondern gewissermaßen für antireaktiv wirkend. Bordet und Gay glauben nach ihren Erfahrungen nicht, daß die antagonistischen Sera stärker gegenüber der Hämolyse durch Immunambozeptoren als gegenüber derjenigen durch Normalambozeptoren wirken, und vermuten, daß die Unterschiede nur von der verwandten Ambozeptormenge abhängig sind. Sie erblicken in dem Einfluß der antagonistischen Stoffe den Ausdruck jener allgemeinen Eigenschaft des Serums, welche sich auf die Verhinderung der Bindung des Komplements an die ambozeptorbeladene Blutzelle bezieht, und die von dem Grade der Sensibilisierung abhängig ist. Es ist, wie ich schon mehrmals erwähnt habe, schwer, zwischen derartigen Funktionen und echten Antikomplementen zu entscheiden. Vielleicht gelingt es, durch Verfolgung des zeitlichen Reaktionsverlaufes beim vorhergehenden längeren Digerieren von antagonistischem Serum und Komplement einen näheren Einblick in diese Verhältnisse zu erlangen. Daß stärkere Serumkonzentrationen im Sinne von Bordet und Gay antireaktiv wirken können, soll natürlich nicht bestritten werden.

3. Antihämolytische Wirkungen durch Immunsera (Antisera).

Was nun die antihämolytischen Wirkungen, welche durch immunisatorisch erzeugte Antisera ausgeübt werden, anlangt, so ist unsere Kenntnis in den letzten Jahren erheblich modifiziert worden. Methodisch muß als erste Regel für den Nachweis antilytischer Wirkungen der Immunsera gelten, das Immunserum mit dem homologen Normalserum zu vergleichen. Nur dann, wenn die antihämolytische Wirkung des Immunserums diejenige des normalen erheblich überwiegt, und zwar in einem Grade, der außerhalb der durch individuelle Variationen der natürlichen Verhältnisse bedingten Breite liegt, kann man von antilytisch wirkenden Immunkörpern sprechen. Man hat zunächst dadurch Immun-Antihämolysine zu erzeugen versucht, daß man, die hämolytischen Stoffe des Blutserums als Toxine auffassend, Blutsera einer anderen Tierspezies injizierte. Eine derartige immunisatorische Erzeugung von Antihämolysinen wurde zum ersten Male von Camus und Gley sowie Kossel festgestellt. Diese Autoren zeigten, daß das Serum von Tieren, welche mit Aalserum immunisiert waren, die hämolytische Wirkung des letzteren aufhob. Nach Feststellung der komplexen Konstitution der normalen und immunisatorisch erzeugten Hämolysine des Blutserums waren von vornherein drei Möglichkeiten für die Bildung von Antikörpern gegeben, die Ehrlich frühzeitig erkannte und präzis formulierte. Da das komplexe Hämolysin nach der Ambozeptortheorie drei verschiedene Kategorien von haptophoren Gruppen enthält, den cytophilen und den komplementophilen Apparat der Ambozeptoren und die haptophoren Gruppen der Komplemente, so sind nach Ehrlich drei Möglichkeiten für die Antikörper-

bildung vorhanden: 1. können Antikomplemente erzeugt werden und 2. Antiambozeptoren. Die Antiambozeptoren können wiederum Antikörper der cytophilen oder der komplementophilen Gruppe darstellen.

Außer diesen theoretisch denkbaren drei Formen der Antikörper im engeren Sinne muß aber noch berücksichtigt werden, daß die Ambozeptoren an sich eine antihämolytische Wirkung bedingen können. Ich sehe hier von den durch Neisser und Wechsberg bekannt gewordenen Verhältnissen, nach denen ein Überschuß des Ambozeptors die Komplementwirkung aufheben kann, ab. Einmal ist die von Neisser und Wechsberg gegebene Deutung, daß durch den Überschuß freier Ambozeptoren das Komplement gebunden und von den durch die Bakterien gebundenen Ambozeptoren abgelenkt wird, in neuerer Zeit angezweifelt worden, dann aber sind analoge Verhältnisse bei den hämolytischen Immunseris bisher nicht bekannt. Die Möglichkeit, daß Ambozeptoren bereits in freiem Zustande befähigt sind, Komplement zu binden, ist schon erörtert worden, und ebenso ist darauf hingewiesen worden, daß durch diese Eigenschaft, die besonders bei normalen Ambozeptoren vorhanden zu sein scheint, eine antihämolytische Wirkung bedingt sein muß, wenn die komplementbindenden Ambozeptoren, welche interferieren, nicht gleichzeitig diejenigen sind, welche im gegebenen Fall zur Wirkung gelangen. Da wir aber nach dem heutigen Stande unserer Kenntnis als Gesetzmäßigkeit zu formulieren berechtigt sind, daß die einmal an das empfindliche Zellsubstrat verankerten Ambozeptoren resp. die dadurch resultierenden Komplexe eine Aviditätssteigerung in bezug auf ihre komplementophile Reaktionsfähigkeit erfahren, die immer zur Komplementbindung ausreicht, so folgt daraus, daß Ambozeptoren gleichzeitig als antilytische Antikörper wirken können, indem sie nach ihrer Verankerung an das empfindliche Substrat zwar für das letztere Komplement zulenkend, für andere ambozeptorbeladene Zellelemente aber komplementablenkend, also antikomplementär wirken. Die Komplementbindung oder Komplementwirkung kann stets als Komplementverbrauch nachgewiesen werden, und da dieser Komplementverbrauch, wie wir durch Bordet wissen, sich fast stets auf sämtliche Komplementfunktionen des betreffenden Serums bezieht, so ist es ersichtlich, daß eine ambozeptorbeladene Zellart in bezug auf ein anderes System von Zelle und zugehörigem Ambozeptor einen antikomplementären Komplex darstellt. Inwieweit diese antikomplementäre Wirkung zum sichtbaren Ausdruck kommt, wird lediglich von den Versuchsbedingungen abhängen; beim gleichzeitigen Mischen aller Komponenten werden die Verhältnisse der Massenwirkung entscheiden, wenn nicht besondere Unterschiede in der Avidität der ambozeptorbeladenen Elemente einen weiteren Ausschlag geben. Will man daher einen ausgesprochenen antikomplementären Effekt erzielen, so wird man das eine System erst eine Zeitlang mit dem komplettierenden Serum digerieren müssen, bevor man das andere hinzufügt; eine nachträgliche Verteilung des Komplements ist dann nur in beschränktem Maße zu befürchten, da die von Ehrlich erkannte sekundäre Verfestigung bei allen derartigen Reaktionen die Reversibilität der Komplementbindung auf ein praktisch meist nicht wahrnehmbares Minimum reduziert. Diese Funktion der verankerten Ambozeptoren haben Bordet und Gengou zu einem indirekten Nachweis von Ambozeptoren für zellige Elemente verwandt, indem sie eben von dem Gedanken ausgingen, daß ein Immunserum, welches Ambozeptoren enthält, beim Zusammenbringen mit den korrespondierenden Gruppen in antikomplementärer Weise wirken

und auf diese Weise seinen Ambozeptorgehalt auch dann dokumentieren müßte, wenn eine direkte sinnlich wahrnehmbare Einwirkung des Ambozeptors auf das korrespondierende Substrat nicht beobachtet wird. Gengou hat auf diese Weise festgestellt, daß man auch durch Vorbehandlung von Tieren mit artfremden gelösten Eiweißstoffen Ambozeptoren erhalten kann. Während man die Bildung der Präzipitine bei einem derartigen Immunisierungsprozeß ja schon kannte, zeigte Gengou, daß die Antisera, welche man von Kaninchen durch Vorbehandeln mit Milch, Eiereiweiß, Fibrinogen oder Blutserum erhält, die Fähigkeit besitzen, im Verein mit den entsprechenden Antigenen Komplemente zu binden, was er durch die antikomplementäre Wirkung dieser Gemische nachweisen konnte. Die Feststellung dieser interessanten Tatsache ist lange Zeit unbeachtet geblieben, zumal ihr Entdecker die praktisch und theoretisch wichtigen Konsequenzen nicht gezogen hatte.

Erst Moreschi gebührt das unbestreitbare Verdienst, durch die unabhängige Feststellung der bereits Gengou bekannten Tatsachen die Aufmerksamkeit von neuem auf diese Verhältnisse gelenkt und die sich in theoretischer Hinsicht ergebenden wichtigen Schlußfolgerungen gezogen zu haben. Moreschi suchte die Angaben der Autoren über die immunisatorische Erzeugung von Komplementen experimentell nachzuprüfen. Antikomplementäre Wirkungen von Immunseris, die durch Vorbehandeln mit normalem Serum erhalten waren, sind zuerst von Ehrlich und Morgenroth und unabhängig davon von Bordet nachgewiesen worden. Ehrlich und Morgenroth haben gezeigt, daß man auch durch Vorbehandeln mit inaktivierten Seris Immunsera von antikomplementärer Wirkung erzeugen kann, und hatten damals darin einen Beweis für die Existenz von Komplementoiden erblickt. Einige Widersprüche mußten einen gewissen Verdacht erregen, so besonders, daß die von Bordet vertretene Anschauung von der Spezifität der Antikomplemente im zoologischen Sinne mit den Erfahrungen Ehrlichs und Morgenroths nicht im Einklang stand. Moreschi arbeitete zunächst mit einem Antiserum, welches von Kaninchen durch Vorbehandeln mit normalem Ziegenserum gewonnen war. Dabei stellte es sich heraus, daß dieses Antiserum bei Verwendung eines von Kaninchen gewonnenen hämolytischen Ambozeptors und Rinderblut nur gegenüber Ziegenkomplement antihämolytisch wirkte, sich dagegen bei Verwendung von Meerschweinchen- und Kaninchenserum als Komplement gänzlich unwirksam erwies. Die Verhältnisse wurden aber sofort anders, wenn der von Kaninchen gewonnene hämolytische Ampozeptor durch einen von der Ziege erhaltenen ersetzt wurde. Bei dieser Versuchsanordnung wirkte das Antiserum stets antikomplementär, gleichgültig, welches Serum als Komplement diente. Daß es sich dabei nicht etwa um Verschiedenheiten der komplementophilen Gruppen der beiden hämolytischen Ambozeptoren handelte, konnte Moreschi durch folgende Versuche ausschließen.

Anstatt Ziegenimmunserum und Rinderblut getrennt zu verwenden, benutzte er das mit den Ambozeptoren dieses Immunserums vorher beladene Blut; in diesem Falle wirkte das Antiserum wiederum nur gegenüber dem Ziegenkomplement antilytisch. Der zweite Weg bestand darin, daß er bei Benutzung des von Kaninchen gewonnenen hämolytischen Ambozeptors dem Gemisch von Antiserum und Komplement noch etwas normales Ziegenserum hinzufügte. In diesem Fall wirkte das Antiserum in gleicher Weise gegenüber den Komplementen der Ziege, des Kaninchens und Meerschweinchens antikomplementär. Die Schlußfolgerung, zu der

Moreschi gelangte, ist: „Die antikomplementäre Wirkung des Serums des mit Ziegenserum behandelten Kaninchens gegen Meerschweinchen- und Kaninchenkomplement beruht auf der Wirkung von zwei Komponenten, einer spezifischen, durch den Immunisierungsprozeß erzeugten, und einer zweiten, im normalen Ziegenserum enthaltenen.“ Wenngleich diese Schlußfolgerung sich mit den Befunden Gengous im wesentlichen deckt, so zeigt doch die Schilderung der historischen Entwicklung, daß Moreschi auf ganz andere Weise zu den gleichen Resultaten gelangt ist, und die Fragestellung, die ihn führte, mußte auch die weiteren von ihm gezogenen Konsequenzen im Gefolge haben, die ihrerseits die Aufmerksamkeit der Immunitätswissenschaft in hohem Maße auf sich lenkten; denn die unmittelbare Konsequenz, die Moreschi selbst aus seinen Untersuchungen zog, ist die, daß die früheren Angaben über die immunisatorische Erzeugung von echten Antikomplementen (d. h. Antikörpern der Komplemente) nicht stichhaltig und revisionsbedürftig sind. Insbesondere die von Bordet vertretene Spezifität der vermeintlichen Antikomplemente erklärt sich allerdings ohne weiteres durch das Zusammenwirken von Eiweißantigen und ihren Antikörpern; denn wenn man das dem Antiserum korrespondierende Serum als Komplementquelle benutzt, so ist es ja ohne weiteres klar, daß man mit dem Komplement gleichzeitig das entsprechende Eiweißantigen zuführt, und es muß dann eine offene Frage bleiben, ob die antikomplementäre Wirkung auf die Bindung des Komplements durch ein Antikomplement zurückzuführen ist oder indirekt durch eine Reaktion zwischen dem Eiweißantigen des komplettierenden Serums und den ambozeptorartigen Antikörpern des Immunserums zustande kommt. Die Spezifität der Antiserumwirkung, die wir wahrnehmen, bezieht sich also gar nicht auf die Antikomplemente, sondern auf die Antikörper der Eiweißstoffe, und man muß Moreschi unbedingt recht geben, wenn er die von Bordet vertretene Anschauung von der Spezifität des Komplements einer Tierspezies und des entsprechenden Antikomplements durch seine Untersuchungen für widerlegt hält. Der die antikomplementäre Wirkung vermittelnde Antikörper ist zwar spezifisch, aber nicht im komplementophilen Sinne, sondern in bezug auf seine haptophoren Gruppen, die den gelösten Eiweißrezeptoren des komplettierenden Serums entsprechen.

Wenn man nun weiter untersuchen will, ob es auch echte Antikomplemente im engeren Sinne gibt, so sind eine Reihe von methodischen Umständen zu beobachten, die mehr oder weniger schwierig zu eliminieren sind. Wenn auch das als Komplement benntzte Serum nicht das dem Antiserum korrespondierende ist, so kann eine indirekte antikomplementäre Wirkung doch zustande kommen, wenn in dem benutzten System irgend ein Bestandteil vorhanden ist, der von der gleichen Tierart stammt, dessen Serum zur Gewinnung des Antiserums benutzt wurde. Insbesondere wird sehr oft der Fall eintreten können, daß der hämolytische Ambozeptor von derselben oder einer verwandten Tierart stammt. In diesem Falle wird man die Schwierigkeit freilich nach dem Vorgange Moreschis leicht dadurch umgehen können, daß man ambozeptorbeladene und sodann serumfrei gewaschene Blutkörperchen für die Versuche verwendet. Ein weiteres Vortäuschen von echten Antikomplementen kann aber auch dadurch hervorgerufen werden, daß das Antiserum noch Bestandteile des zur Immunisierung verwandten Serums, die immerhin minimal sein können, enthält. Auch darauf hat Moreschi die Aufmerksamkeit gelenkt. Ehrlich und Morgenroth hatten schon früher

über gleichsinnige Beobachtungen berichtet, die sie damals als den Ausdruck einer immunisatorischen Bildung von Autoantikomplementen auffaßten (vergl. auch Lüdke). Sie stellten nämlich fest, daß Kaninchen, die mit normalem Ziegenserum vorbehandelt waren, zu einer gewissen Zeit ihre eigenen komplementären Fähigkeiten verloren hatten. Moreschi erklärt nun diese Befunde damit, daß zur Zeit der Blutentnahme in dem Kaninchenserum noch Reste des injizierten Ziegenserums kreisten. Daß in der Tat auf diese Weise autoantikomplementäre Wirkungen vorgetäuscht werden können, konnte Moreschi experimentell dadurch nachweisen, daß er Kaninchen, die mit fremdartigem Serum vorbehandelt waren, das gleiche Serum erneut intravenös injizierte. Wurden nun kurze Zeit nach dieser Injektion den Tieren Blutproben entnommen, so erwies sich das Serum als autoantikomplementär und zu gleicher Zeit seiner eigenen komplettierenden Funktionen beraubt. Es ergibt sich daraus gleichzeitig, daß die Komplementbindung durch das Zusammenwirken von gelösten Eiweißantigenen und ihren Antikörpern auch in vivo erfolgen kann, ein Befund, den auch Fleischmann und Michaelis bestätigt haben.

Dieses Verfahren der Ausschaltung der Komplemente in vivo, das sich vielleicht auch für die Übertragung gewisser Infektionen auf sonst refraktäre Tiere eignet, entspricht in seiner Wirkung dem bekannten Experiment Wassermanns, dem es gelungen ist, die Resistenz von Tieren durch Injektion von antikomplementär wirkendem Serum herabzusetzen. Man kann den Vorgang Wassermanns als passive Komplementbindung im Gegensatz zu dem von Moreschi, Fleischmann und Michaelis geübten Verfahren der Komplementbindung durch aktive Immunisierung bezeichnen. Der letztere Weg ist bereits von Neisser und Wechsberg bei Tieren, welche nach der damaligen Anschauung Autoantikomplemente gebildet hatten, beschritten worden (vgl. Wechsberg).

Was also die immunisatorische Erzeugung von echten Antikomplementen anlangt, so dürfte das bisher vorliegende Material keine sicheren Anhaltspunkte für die Bildung von Antikörpern der Komplemente gewähren. Die Schwierigkeit für die Entscheidung der Frage ist besonders darin gelegen, daß man Komplemente und Eiweißantigene nicht voneinander trennen kann. Wenn es auch bei den vielfachen Analogien, welche zwischen Toxin- und Komplementwirkung bestehen, wahrscheinlich ist, daß auch die Komplemente Antigene sind, so steht der Nachweis von ihren Antikörpern doch noch aus, wenn auch der Beweis für die Differenzierung eines haptophoren und zymotoxischen Bestandteiles der Komplemente einerseits durch den Nachweis von Komplementoiden im Reagenzglasversuch, andererseits durch die gelungene Trennung des Komplements in zwei Komponenten als geführt zu erachten ist.

Was dagegen die immunisatorische Erzeugung von Antiambozeptoren anlangt, so hat das fortgesetzte Studium zwar auch einige nicht unerhebliche Modifikationen unserer Anschauung bedingt, jedoch muß die Tatsache, daß man durch Immunisierung mit Ambozeptoren Antiambozeptoren erzeugen kann, auch heute noch als zu Recht bestehend erkannt werden. Als immunisatorisch erzeugte Antiambozeptoren sind zuerst von Bordet, P. Müller, Ehrlich und Morgenroth Antikörper angesprochen worden, welche sie im Serum von solchen Tieren nachweisen konnten, die durch Injektionen von hämolytischem Immunserum vorbehandelt waren. Schütze hatte gleichfalls früher über die Erzeugung von Antiambozeptoren berichtet, die er nach Immunisierung mit normalem

Serum erhielt. Er glaubte antikomplementäre Wirkungen ausschließen zu können, weil das zur Vorbehandlung benutzte Serum inaktiviert war. Diese Schlußfolgerung ist natürlich nicht stichhaltig, da einerseits auch im inaktivierten Serum die darin enthaltenen Komplementoide zur Bildung von Antikomplementen genügen würden, andererseits durch das Serumeiweiß als solches die Gelegenheit zur Auslösung von Eiweißantikörpern gegeben ist, die dann im Verein mit den Antigenen wiederum antikomplementär wirken können. Der erste Prüfstein, um Antiambozeptoren von antikomplementär wirkenden Antikörpern zu unterscheiden, ist, wie noch einmal erwähnt werden mag, der Bindungsversuch. Man hatte ursprünglich die durch den Bindungsversuch nachgewiesenen Antiambozeptoren als Antikörper der cytophilen Ambozeptorgruppe aufgefaßt, ohne eigentlich vollgültige Beweise dafür zu haben*). Beobachtungen von Pfeiffer und Friedberger, welche an Antiseris von bakteriolytischen Ambozeptoren erhoben wurden, mußten zunächst stutzig machen. Pfeiffer und Friedberger zeigten nämlich, daß Antiambozeptoren, die durch Vorbehandlung mit Choleraserum gewonnnen waren, auch auf Typhusambozeptoren der gleichen Tierart wirkten. Da die cytophilen Gruppen der dabei in Frage kommenden bakteriziden Immunsera sicherlich different sein müssen, so ergab sich daraus bereits, daß die von Pfeiffer und Friedberger analysierten Antiambozeptoren auf eine andere Gruppe wirken mußten als auf die cytophile. Nachdem Ehrlich von Anfang an darauf aufmerksam gemacht hat, daß die Antikörper der Ambozeptoren ebenso gegen die komplementophile wie gegen die cytophile Gruppe gerichtet sein können, mußte man daran denken, daß die von Pfeiffer und Friedberger analysierten Antisera Antikörper des komplementophilen Ambozeptorapparates enthalten. Zur Gewißheit wurde diese Vermutung durch die Untersuchungen von Bordet über die Antikörper der hämolytischen Ambozeptoren.

Bordet hat nämlich gefunden, daß man durch Vorbehandeln von Tieren mit normalem Serum Antiambozeptoren erhält, welche gegen sämtliche Ambozeptoren wirken, die von derjenigen Tierart stammen, deren Serum zur Vorbehandlung gedient hat. Da nun im Normalserum solche Ambozeptoren fehlen können, die man bei der gleichen Tierart immunisatorisch hervorrufen kann, so ergab sich ohne weiteres daraus, daß die Antiambozeptoren nicht durch cytophile Gruppen aufgelöst sein konnten. Man mußte vielmehr folgern, daß es sich um Antiambozeptoren handelt, welche nicht spezifisch sind für die cytophile Gruppe gewisser Ambozeptoren, sondern spezifisch für die Tierart, von welcher das ambozeptorhaltige Serum stammt. Da nun nach den Anschauungen Ehrlichs die Ambozeptoren einer und derselben Tierart spezifisch sind in bezug auf einen mehr oder weniger großen Teil des komplementophilen Apparates, so war die von Ehrlich und Sachs gezogene Schlußfolgerung gegeben, daß die Antiambozeptoren Antikörper der komplementophilen Gruppe darstellen.

Der früher zum Nachweis der Antiambozeptoren geübte Bindungsversuch konnte über den Sitz des Angriffspunktes keinen Aufschluß geben,

*) Die von Morgenroth beschriebene Komplementablenkung durch das Zusammenwirken von Antiserum und hämolytischen Ambozeptoren, welche dieser Autor auf eine Komplementverankerung durch den Komplex „Antiambozeptor der cytophilen Gruppe-Ambozeptor“ bezog, muß heute wohl im Sinne einer Komplementbindung durch das Zusammenwirken von Antigenen des hämolytischen Immunserums und Antikörpern des Antiserums gedeutet werden.

denn eine einfache Überlegung zeigt, daß das Versuchsresultat dasselbe sein muß, gleichgültig, ob der Ambozeptor in die cytophile oder in die komplementophile Gruppe eingreift. Handelt es sich um einen Antikörper der cytophilen Gruppe, so wird die Bindung des Ambozeptors ausbleiben und das nach dem Zentrifugieren erhaltene Blutsediment wird durch Komplement nicht angegriffen werden. Handelt es sich andererseits um einen Antikörper der komplementophilen Gruppe, so wird zwar die Bindung des Ambozeptors eintreten können, gleichzeitig mit dem Ambozeptor wird aber der die komplementophile Gruppe besetzende Antiambozeptor gebunden, der wie ein Komplementoid wirkt, so daß gleichfalls die schließlich erhaltenen Blutsedimente der Wirkung von komplementhaltigem Serum nicht zugänglich sind. In der Tat stimmen die von Bordet erhaltenen Versuchsbefunde sehr gut mit dieser Vorstellung überein. Bordet stellte nämlich fest, daß der Antiambozeptor auch ambozeptorbeladene Blutkörperchen so verändern kann, daß sie sich im Komplement nicht mehr lösen. Er wirkt eben wie ein Komplementoid. Ebenso ist vom Standpunkt der entwickelten Auffassung aus der von Bordet erhobene Befund verständlich, daß die Antiambozeptorwirkung durch das homologe Normalserum aufgehoben wird, denn da auch das normale Serum Ambozeptoren enthält, die in ihrem komplementophilen Bau mit den Immunambozeptoren weitgehend übereinstimmen, so ergibt sich ohne weiteres, daß normale Sera die Antiambozeptorwirkung reduzieren oder aufheben können. Ebenso ist es durchaus denkbar, daß, wie dies Bordet, sowie auch Muir und Browning beschreiben, der bereits an die ambozeptorbeladenen Blutzellen verankerte Antiambozeptor durch einen Überschuß von normalen Ambozeptoren wieder abgerissen werden kann, wenn auch Ehrlich und Sachs diese Angaben nicht bestätigen konnten. Der ganze Tatsachenkomplex ist jedenfalls verständlich, wenn man annimmt, daß der Antiambozeptor an andere Gruppen als die cytophile angreift, eine Anschauung, der sich auch Muir und Browning angeschlossen haben, und man wird dabei an erster Stelle mit Ehrlich und Sachs an den komplementophilen Apparat denken müssen.

Nun wissen wir aber, wie schon an anderer Stelle erwähnt worden ist, durch die Untersuchungen von Friedberger und Moreschi, daß man nicht immer bei der Immunisierung einer Tierart mit dem Serum einer anderen Antiambozeptoren erhält, sondern in manchen Fällen Immunkörper, welche die Hämolyse geradezu beschleunigen. Die gegenwärtige Anschauung über diese Vorgänge ist wohl die auch von Friedberger und Bezzola vertretene, daß es sich um ein Analogon einer Komplementbindung durch das Zusammenwirken von Eiweißantigen und Antikörper handelt und statt einer Komplementablenkung eine Komplementzulenkung an die Zelle stattfindet, da der Prozeß an den Blutzellen selbst vor sich geht. Ich glaube, daß es am einfachsten ist, sich vorzustellen, daß der Ambozeptor selbst eine Gruppe besitzt, welche ihn eben gleichzeitig als Eiweißantigen charakterisiert, und daß dadurch auch durch Vermittlung des Ambozeptors als Antigen eine Komplementbindung resultieren kann, die eben dann, wenn der Ambozeptor an die Zelle gebunden ist, einer Zulenkung des Komplements zu den ambozeptorbeladenen Blutkörperchen entspricht*). Ich möchte daraus ganz allgemein

*) Allerdings scheinen damit frühere Erfahrungen von Moreschi in Widerspruch zu stehen. Moreschi konnte nämlich im Serum von Kaninchen, welche mit einem für Rinderblut hämolytischen Immunserum von der Ziege vorbehandelt waren, noch zu einer Zeit erhebliche Ambozeptormengen nachweisen, zu der Ziegenserum

schließen, daß bei der Vorbehandlung von Tieren mit ambozeptorhaltigem Blutserum zwei Antikörpertypen entstehen:

1. Antiambozeptoren in dem oben erörterten Sinne;
2. die beschleunigenden Immunstoffe FRIEDBERGERS und MORESCHIS, denen vielleicht Ambozeptornatur zuzusprechen ist, und die mit den die Komplementbindung vermittelnden identisch sind.

Es wird dann nach der jeweiligen relativen Konzentration dieser beiden Antikörperarten entweder eine Antiambozeptorwirkung oder eine Beschleunigung der Hämolyse oder endlich eine vollständige Unwirksamkeit des Antiserums zu beobachten sein. Um beschleunigende Wirkungen aufzudecken, wird es immer günstiger sein, mit ambozeptorbeladenen Blutzellen zu arbeiten, weil dadurch die Ablenkung der Eiweißantikörper von den ambozeptorbeladenen Blutzellen vermieden wird. Es ist nach dieser Anschauung von vornherein anzunehmen, daß diejenigen Tierarten, welche erfahrungsgemäß leicht Präzipitine resp. komplementbindende Antikörper der Eiweißantigene bilden, auch das Beschleunigungsphänomen besser hervortreten lassen, als solche Tierarten, welche sich zur Erzeugung von Eiweißantikörpern schlechter eignen und bei denen daher die Antiambozeptorwirkung überwiegt. So dürfte es zu verstehen sein, daß FRIEDBERGER und MORESCHI die beschleunigenden Antikörper gerade bei der Vorbehandlung von Kaninchen mit fremdartigem Serum nachweisen konnten, während bei der Immunisierung von Ziegen mit andersartigem Serum zunächst nur eine Bildung von Antiambozeptoren wahrzunehmen ist. Daß aber auch in Immunseris, die von der Ziege gewonnen sind, beschleunigende Wirkungen im Sinne von FRIEDBERGER und MORESCHI aufgedeckt werden können, dafür scheinen mir Befunde von EHRLICH und SACHS zu sprechen, die damals von den Autoren in etwas anderer Weise gedeutet wurden. Die von EHRLICH und SACHS beschriebene Beobachtung besteht in folgendem:

Wurden gleichbleibende Mengen Ambozeptor (vom Kaninchen durch Rinderblutinjektion gewonnen) mit absteigenden Mengen eines Antiserums gemischt, das von der Ziege durch Vorbehandlung mit Rinderblutimmunserum vom Kaninchen gewonnen war, wurde sodann Blut zugefügt, zentrifugiert und zu den Sedimenten Meerschweinchenserum als Komplement zugesetzt, so trat eine Hemmung der Hämolyse ein, die den Mengen des verwandten Antiserums proportional war. Wurden dagegen die Blutkörperchen zuerst mit den gleichen Ambozeptormengen vorbehandelt, sodann den ambozeptorbeladenen Blutzellen absteigende Mengen desselben Serums zugefügt und die abzentrifugierten Blutsedimente in Meerschweinchenserum aufgeschwemmt, so trat eine Aufhebung der Hämolyse nur bei mittleren Mengen des verwandten Antiserums auf; bei einem Überschuß des Antiserums trat wieder Hämolyse ein. Es zeigte sich, daß man diese bei Antiserumüberschuß eintretende Hämolyse durch einen Zusatz sehr geringer Mengen von normalem Kaninchenserum aufheben kann. Die von MORESCHI versuchte Deutung, daß es sich dabei um eine einfache antikomplementäre Wirkung durch die Kombination

als solches mittels des Verfahrens der Komplementbindung nicht mehr im Kaninchenorganismus aufzufinden war. MORESCHI schließt daraus, daß Ambozeptor und Eiweißantigen verschiedene Substanzen sind. Man wird allerdings bei dem MORESCHIschen Versuch daran denken müssen, daß die von ihm nachgewiesenen Ambozeptoren vielleicht nicht mehr die Bestandteile des passiv einverleibten Immunserums waren, sondern bereits aktiv erzeugte Immunkörper, die dann als Reaktionsprodukte auf die Einverleibung des Ziegenserums aufzufassen sein würden.

von Eiweißantigen und Antiserum handelt, wird dem gesamten Tatsachenkomplex nicht gerecht. Sie läßt die wichtige Tatsache, daß das von Ehrlich und Sachs beschriebene Phänomen erst bei einem Überschuß von Antiserum auftritt, daß dagegen eine geringere Menge Antiserum bereits an und für sich eine Hemmung der Hämolyse verursacht, vollständig unberücksichtigt. Man muß wohl aus diesem Phänomen, wie es Ehrlich und Sachs damals getan haben, folgern, daß im Antiserum zwei verschiedene Immunstoffe vorhanden sind, und ich möchte nach dem heutigen Stande unserer Kenntnis glauben, daß es sich damals um die kombinierte Wirkung von Antiambozeptoren und von hämolysebeschleunigenden Immunsubstanzen gehandelt hat. Wenn man nämlich annimmt, daß die letzteren in dem von der Ziege gewonnenen Immunserum nur in geringer Konzentration vorhanden waren, die Antiambozeptoren dagegen überwogen, so ergibt sich daraus, daß geringe Mengen des Antiserums durch Antiambozeptorwirkung die Hämolyse aufheben müssen, daß dagegen in größeren Mengen des Antiserums neben der Antiambozeptorwirkung ein zweiter Faktor interferiert, den man wohl in den von Friedberger und Moreschi beschriebenen hämolysebeschleunigenden Immunsubstanzen erblicken darf. Es erklärt sich dann auch, daß ein Zusatz von Normalserum die Wirkung der letzteren wieder aufhebt; denn die Eiweißambozeptoren reagieren dann mit den gelösten Eiweißantigenen des Normalserums, und die Antiambozeptorwirkung kommt voll zur Geltung.

Die Bedingungen für die Analyse der Antiambozeptorwirkung und für die Deutung der Versuchsergebnisse liegen also heute sehr kompliziert. Gerade die Quote der von Friedberger und Moreschi entdeckten beschleunigenden Immunstoffe bringt eine neue Schwierigkeit der Beurteilung. Sie zeigt, daß die Tatsache, daß ein Antiserum nur beim vorherigen Mischen mit dem Ambozeptor schützt aber nicht nach der Verankerung des Ambozeptors an die Blutzelle (Heilversuch) durchaus nicht gegen die Auffassung des Antiambozeptors als Antikörper der komplementophilen Gruppe zu sprechen geeignet ist. Denn beim vorherigen Mischen können eben beschleunigende Stoffe von den hämolytischen Ambozeptoren abgelenkt werden, während sie bei ambozeptorbeladenden Blutzellen zur Wirkung gelangen und die Antiambozeptorwirkung larvieren, wenn man nicht dafür sorgt, daß die den Ambozeptor enthaltenden Serummengen im Gemisch verbleiben. Die Einwände, welche von Friedberger und Moreschi gegenüber der Auffassung der Antiambozeptoren als Antikörper der komplementophilen Gruppe geäußert wurden, erscheinen daher heute nicht stichhaltig. Was die prinzipiellen Bedenken dieser Autoren anlangt, so habe ich schon an anderer Stelle ausgeführt, daß es durchaus nicht als ein notwendiges Postulat der Seitenkettentheorie erscheint, daß Ambozeptoren, welche auf die Blutkörperchen der zu injizierenden Tierart hämolytisch wirken, Antikörper der cytophilen Gruppe auslösen müßten. Es ist im Gegenteil anzunehmen, daß in diesem Falle die cytophilen Gruppen sich mit den Rezeptoren der Blutkörperchen oder mit freien Rezeptoren vereinigen und erst diese Komplexe, welche ja dann nur den komplementophilen Apparat frei haben, als Antigene wirken. Der Nachweis von Antiambozeptoren der cytophilen Gruppen kann bis heute nicht als geführt gelten. Möglich sind aber solche Antikörper jedenfalls, und man könnte zu ihrer Demonstration entsprechend den von Ehrlich und Sachs gegebenen Vorschlägen verfahren, indem man versucht, den komplementophilen Komplex vor der

Injektion unwirksam zu machen, sei es durch Zerstörung, sei es durch Besetzung mit dem entsprechenden Antikörper. Vielleicht eignen sich auch für die Gewinnung dieser Antiambozeptoren gerade solche Tierarten, welche die entsprechenden Gegengruppen der cytophilen Gruppe nicht so zahlreich in den Säften und den Blutzellen, sondern mehr an denjenigen Stellen lokalisiert enthalten, die als Bildungsstätten der Antikörper in Betracht kommen.

Was den etwaigen Zusammenhang zwischen der Bildung von Antiambozeptoren und dem Verbleib der passiv einverleibten Ambozeptoren anlangt, so liegen Angaben, welche die Hämolysine betreffen, meines Wissens nicht vor. Aus den Untersuchungen mit bakteriziden Immunseris (Pfeiffer und Friedberger, Schütze, Shibayama, Wassermann und Bruck) wurde geschlossen, daß die artfremden heterologen Ambozeptoren rascher aus dem Blut verschwinden als die homologen, und daß eine Präzipitationswirkung nicht die Ursache dafür ist. Wenn es sich also dabei um Antiambozeptorwirkung handelt, so würde es wieder schwer sein, anzunehmen, daß es Antiambozeptoren der cytophilen Gruppe sind, deren Entstehung bei Einverleibung von bakteriziden Ambozeptoren Ehrlich und Morgenroth im allgemeinen a priori für unwahrscheinlich halten.

Man könnte nun in Anbetracht der Komplement bindenden Kraft der Verbindungen von Eiweißantigen und Antikörper zweifelhaft sein, ob es überhaupt Antiambozeptoren gibt. Denn bei den gegen den komplementophilen Apparat gerichteten Antiambozeptoren muß ja das Zusammenwirken von Eiweißantigen und Antiserum stets interferieren*). Der Ehrlich-Morgenrothsche Bindungsversuch kann von vornherein eine Komplementbindung nicht ausschließen. Es könnten sich ja beim Mischen von Antiserum und Ambozeptor Präzipitate bilden, die antikomplementär wirken und beim Abzentrifugieren der digerierten Blutzellen mit in das Sediment gehen könnten. Die von Browning und Sachs vorgenommene eingehende Analyse war daher durchaus notwendig, zumal von Pfeiffer und Moreschi ausdrücklich hervorgehoben wurde, daß Antiambozeptorwirkungen durch die Komplement bindende Kraft der Präzipitate vorgetäuscht werden können. Allerdings führt der von Pfeiffer und Moreschi eingeschlagene Weg zu keinem bindenden Schluß. Pfeiffer und Moreschi, die mit bakteriolytischen Ambozeptoren arbeiteten, haben nämlich Antiserum mit dem korrespondierenden Normalserum versetzt. Sie trennten das ausfallende Präzipitat von der Flüssigkeit und stellten fest, daß nunmehr nur ersteres antilytisch wirkt. Daraus schlossen die Autoren, daß ihr Antiserum Antiambozeptoren nicht enthielt. Wie aber Browning und Sachs hervorheben, ist dabei übersehen, daß ja durch das zur Präzipitation benutzte Normalserum bereits normale Ambozeptoren mit dem Antiserum in Reaktion treten konnten und dadurch

*) Daß die Ambozeptoren durch Präzipitation nicht ausgefällt werden, ergab sich bereits aus Untersuchungen von Pfeiffer und Friedberger, sowie Wassermann und Bruck für die bakteriolytischen Ambozeptoren, und Zebrowski hat nach Versuchen an hämolytischen Ambozeptoren direkt darauf hingewiesen, daß die präzipitierende Wirkung der Antisera durch direkte Ausfällung der Ambozeptoren Antiambozeptoren nicht vortäuschen kann. Es fand nach erschöpfender Präzipitierung des hämolytischen Immunserums den Ambozeptor unvermindert in der Flüssigkeit und schließt daraus auf die Unabhängigkeit von Präzipitinogen und Ambozeptor. Die Erfahrungen über die Hämolyse beschleunigenden Immunstoffe und ihre Deutung haben allerdings dazu geführt, dem Ambozeptor auch Eiweißantigen-Natur zu vindizieren. Vielleicht klärt sich der Widerspruch dadurch, daß nicht alle Eiweißantigene präzipitabel sind. Der Ambozeptor müßte dann zu diesen nicht präzipitablen, nur die komplementbindenden Eiweißantikörper verankernden Eiweißantigenen gehören.

die darin enthaltenen Antiambozeptoren neutralisieren mußten. Die Unwirksamkeit des Serums nach der Präzipitation beweist also nichts für oder gegen die Anwesenheit von Antiambozeptoren im nativen Antiserum.

BROWNING und SACHS konnten aber verschiedene Verfahren angeben, mittels denen es gelingt, Antiambozeptoren mit Sicherheit zu differenzieren. Der einfachste Weg ist ja darin gelegen, daß man ambozeptorbeladene Blutkörperchen benutzt und an diese nach dem Vorgang BORDETS den Antiambozeptor verankern läßt. Allein, es dürfte zwar der Einwand, daß sorgfältig gewaschenen Blutzellen noch genügend Eiweißantigen anhaftet, um Präzipitatbildung zu erzeugen, bedeutungslos sein, aber, wie schon erwähnt, ist die Möglichkeit, den verankerten Ambozeptor durch die Antiambozeptoren zu sperren, äußerst variabel, und wenn man die Interferenz der Hämolyse beschleunigenden Immunstoffe bedenkt, so ist das leicht erklärlich. Man braucht aber, wenn nicht gerade die Bedingungen für die Bildung ganz exorbitanter Präzipitate vorliegen, gar nicht die Ambozeptoren zu verankern. Denn wie BROWNING und SACHS gezeigt haben, ist in der Regel eine Komplementbindung nicht wahrzunehmen, wenn man Normalserum — das entsprechende Antiserum — Blut — Ambozeptor eine zeitlang digeriert, sodann abzentrifugiert und erst dem Sediment Komplement hinzufügt. Wenn man also einfach nach der EHRLICH-MORGENROTHschen Bindungsmethode verfährt, so ist ein positives Ergebnis auch heute noch sehr wahrscheinlich auf Antiambozeptorwirkung zu beziehen*). Diese Wahrscheinlichkeit wird zur Gewißheit, wenn einer der von BROWNING und SACHS benutzten Wege gelingt. Die letzteren bestehen in folgendem:

1. Man ersetzt den Ambozeptor durch die äquivalente Menge eines von einer anderen Tierart gewonnenen Ambozeptors und fügt außerdem die der zuerst verwandten Ambozeptormenge entsprechende Dosis des homologen Normalserums zu. Die hemmende Wirkung muß dann im Falle eines Antiambozeptors ausbleiben.

2. Man fügt außer dem Ambozeptor noch die gleiche Menge des homologen Normalserums hinzu und setzt zwei Parallelreihen an:

a) Antiserum + Ambozeptor + Normalserum — $^3/_4$ Stunden Zimmertemperatur — Blutzusatz — eine Stunde 37°, zentrifugieren — zu den Sedimenten Komplement;

b) Antiserum + Normalserum — $^3/_4$ Stunden Zimmertemperatur — Blutzusatz — eine Stunde 37°, zentrifugieren — zu den Sedimenten Ambozeptor — eine Stunde bei 37°, zentrifugieren — zu den Sedimenten Komplement.

Bleibt in b auch bei Verwendung der doppelten Menge des Normalserums die Hemmungswirkung aus, so muß es sich bei einer Aufhebung der Hämolyse in Reihe A um Antiambozeptorwirkung handeln, da die Bedingungen für Präzipitatbildung in beiden Reihen gleich günstig sind.

Durch Verwendung dieser beiden Methoden ist BROWNING und SACHS der sichere Nachweis gelungen, daß echte Antiambozeptoren in dem von ihnen untersuchten Antiserum vorhanden waren, und auch FRIEDBERGER und MORESCHI konnten mit dem gleichen Antiserum „das Vorhandensein einer nicht auf Präzipitation beruhenden Antiserumwirkung bestätigen“.

Wenn auch BROWNING und SACHS durch die beschriebenen Verfahren die Vortäuschung von Antiambozeptorwirkung durch Präzipitate

---

*) Auf Grund analoger Versuchsergebnisse spricht sich auch ROSE für die Existenz echter Antiambozeptoren im Antiserum aus.

ausgeschlossen haben, so halten sie es doch für möglich, daß Präzipitate einen begünstigenden Einfluß auf die Antiambozeptorwirkung ausüben. Die Autoren haben nämlich den Umstand, daß die Möglichkeit, den Ambozeptor auch dann noch wirken zu lassen, wenn die Blutkörperchen vorher mit Ambozeptor beladen und von der Zwischenflüssigkeit getrennt sind, nicht immer gegeben ist, dadurch zu erklären versucht, daß sie annehmen, daß das Komplement unter Umständen befähigt ist, den bereits an den Ambozeptor gebundenen Antiambozeptor zu verdrängen. Diese Sprengung der Ambozeptor-Antiambozeptorbindung würde dann dadurch aufgehoben sein, daß das Komplement gleichzeitig durch ein Präzipitat gebunden wird. Browning und Sachs konnten in der Tat zeigen, daß die Antiambozeptorwirkung markanter in Erscheinung tritt, wenn man unter Verwendung von ambozeptorbeladeneu Blutkörperchen die die normalen Serumbestandteile enthaltenden Zwischenflüssigkeiten zurückläßt, als wenn man sie vor dem Antiserumzusatz durch Zentrifugieren entfernt. Dagegen war bei zeitlicher Beobachtung des Verlaufes der Hämolyse gerade das umgekehrte Verhalten zu bemerken, indem sich hierbei zu einer gewissen Zeit eine stärkere Wirkung des Antiserums auf die abzentrifugierten ambozeptorbeladenen Blutzellen dokumentierte. Browning und Sachs haben diese Befunde durch die Annahme erklärt, daß die normalen Serumbestandteile einerseits durch ihren Ambozeptorgehalt die Antiambozeptorwirkung reduzieren, andererseits aber einer Verdrängung des Antiambozeptors durch das Komplement durch ihren Gehalt an Eiweißantigen vorbeugen. Man wird allerdings heute vielleicht auch eine andere Erklärungsmöglichkeit zu berücksichtigen haben; die temporär bessere Wirkung des Antiserums bei Verwendung von ambozeptorbeladenen Blutzellen könnte eben einfach darin ihren Grund haben, daß die Antikörper der komplementophilen Gruppe unter diesen Bedingungen a priori stärker zur Wirkung gelangen. Wenn aber nach einer gewissen Zeit gerade bei Verwendung von ambozeptorbeladenen Blutzellen doch noch Hämolyse eintritt, so könnte dafür die Interferenz von hämolysebeschleunigenden Immunsubstanzen verantwortlich gemacht werden, deren Wirkung wiederum beim Verbleiben der normalen Serumbestandteile im Reaktionsgemisch reduziert werden muß. Vielleicht hat die zuletzt entwickelte Anschauung den Vorzug, da sie die Annahme einer Verdrängung des gebundenen Antiambozeptors durch das Komplement, welche von Friedberger und Moreschi beanstandet wurde, überflüssig macht. Weitere Untersuchungen werden darüber erst entscheiden können. Jedenfalls sprechen dafür, daß die Ambozeptoren Antikörper der komplementophilen Gruppe sind, auch die von Browning und Sachs erhobenen Befunde, denen zufolge auch trotz der Gegenwart reichlich nachweisbarer Komplementmengen die Hämolyse ausbleibt. Dem Komplement muß also unbedingt der Zugang zu den ambozeptorbeladenen Blutzellen durch die Wirkung des Antiserums gesperrt sein, wie dies auch Bordet von vornherein festgestellt hatte. Die wohl sicher anzunehmende Möglichkeit der Interferenz von hämolysebeschleunigenden Immunstoffen im Sinne von Friedberger und Moreschi wird man bei weiteren Untersuchungen über Antiambozeptorwirkungen nicht außer acht lassen dürfen.

Wenn wir also die bisherigen Erfahrungen über die antilytische Wirkung der durch Immunisierung im Blutserum erhaltenen Antisera zusammenfassen, so ergibt sich, daß wir vorläufig zwischen zwei Funk-

tionen dieser Antisera, die als sicher erwiesen gelten können, unterscheiden müssen:

1. die Fähigkeit des Antiserums, im Verein mit den korrespondierenden Antigenen komplementbindend zu wirken (Antieiweißambozeptoren Gengous);

2. die Fähigkeit des Antiserums, die Ambozeptorwirkung aufzuheben (Antiambozeptoren, Antikörper der komplementophilen Gruppe).

Was die immunisatorische Erzeugung dieser antilytisch wirkenden Antikörper anlangt, so lassen sich wenig präzise Vorschriften geben, da ja die heute gültigen Vorstellungen über die hier in Frage kommenden Antikörper erst jüngeren Datums sind und genügende Erfahrungen über die zweckmäßigste Art der Immunisierung noch fehlen. Jedenfalls genügt es, wenn man normale Blutsera, die auch durch Erhitzen auf 50 bis 55° inaktiviert werden können, zur Vorbehandlung der Tiere benutzt. Wenn man die bis heute noch nicht nachgewiesenen Antikörper der cytophilen Ambozeptorgruppe hervorrufen will, wird man allerdings bei Verwendung von cytotoxischen Immunseris naturgemäß bessere Bedingungen haben. Größeren Tieren (Ziegen, Schafen etc.) wird man große Serummengen (100—500 ccm) subkutan oder peritoneal injizieren können. Bei Kaninchen injiziert man 5—20 ccm peritoneal und vorteilhaft auch intravenös, wenn nicht gerade das zu injizierende Serum auf die Blutkörperchen des Versuchstieres hämolytisch wirkt. Nach 2—3 Injektionen werden die Antisera in der Regel brauchbar sein. Für die Erzeugung der komplementbindenden Eiweißantikörper gelten vorläufig dieselben Regeln wie für die Erzeugung der Präzipitine, und es sei auf dieses an anderer Stelle in diesem Handbuch abgehandelte Kapitel verwiesen. Jedoch kann es nach den schon erwähnten Erfahrungen vorkommen, daß das Antiserum zur Zeit der Blutentnahme noch Spuren der injizierten Eiweißantigene enthält. Dann kann einerseits eine direkte antikomplementäre Wirkung des Antiserums vorgetäuscht, andererseits eben dadurch der Demonstration der Komplementbindung durch das Zusammenwirken von Eiweißantigen und Antiserum eine Schwierigkeit bereitet werden. Nach den Untersuchungen Roses können noch am 10. oder 11. Tage nach der letzten Injektion Eiweißantigene im Blut kreisen und dadurch bewirken, daß das Antiserum an und für sich antikomplementär wirkt. Es wird sich also empfehlen, bei der Gewinnung von komplementbindenden Antikörpern mit der Serumgewinnung etwa 10 Tage von der letzten Injektion ab zu warten, wenn man sich nicht durch eine Probeblutentnahme davon übezeugt hat, daß das Antiserum an und für sich nicht antikomplementär wirkt oder nicht stärker als das homologe Normalserum.

4. Komplementbindung.

Unter Komplementbindung (Komplementablenkung) wird die antikomplementäre Wirkung verstanden, welche durch das Zusammenwirken von Antigen und den entsprechenden Antikörpern resultiert. Es handelt sich also um die Wirkung der Antikörper, welche nach Injektion irgend welcher Zellen oder gelöster Eiweißstoffe auftreten, die aber nicht durch eine direkte sinnlich wahrnehmbare Einwirkung auf das Antigen nachzuweisen sind, sondern ihre Wirkung nur dadurch dokumentieren, daß sie durch ihr Zusammenwirken mit dem Antigen die Komplemente eines Serums unwirksam machen. Diese Antikörper, welche von Bordet und

Gengou als Analoga der Ambozeptoren angesprochen wurden, sind ja im vorigen Abschnitt schon beschrieben worden, besonders im Hinblick darauf, daß durch ihre Existenz, wie das Moreschi erkannt hat, die immunisatorische Erzeugung von Antikomplementen bis heute nicht als erwiesen gelten kann.

Wir müssen uns nunmehr aber noch mit dem Phänomen der Komplementbindung besonders beschäftigen, sowohl mit Rücksicht auf die wissenschaftliche Bedeutung, die ihm zukommt, als auch ganz besonders in bezug auf die mannigfache praktische Anwendung, welche die Komplementbindung in den letzten Jahren gefunden hat. Das eingehende Studium der Komplementbindung wurde ausgelöst durch die bedeutsamen Arbeiten Moreschis. Da die Gegenwart von Eiweißantigen und Antiserum, welche für den Eintritt der Komplementbindung erforderlich ist, gleichzeitig die Bedingung für das Zustandekommen von Präzipitaten darstellt, so war es naheliegend, daß man zunächst das Verschwinden der Komplementwirkung mit der Funktion der Präzipitine in Zusammenhang brachte. In der Tat haben sich Moreschi, sowie Gay und Klein, welche unabhängig zu analogen Versuchsergebnissen gelangten, zunächst in diesem Sinne ausgesprochen. Demgegenüber haben bald darauf M. Neisser und Sachs an die damals in Vergessenheit geratenen Untersuchungen Gengous erinnert und in Übereinstimmung damit die Auffassung vertreten, daß es sich bei der komplementbindenden Wirkung der aus Eiweißantigen und Antiserum entstehenden Komplexe um eine Ambozeptorwirkung und nicht um Präzipitation handelt. Ich möchte dabei gleich bemerken, daß, wenn dem so ist, natürlich auch Eiweißpräzipitate komplementbindend wirken können oder müssen. Denn es ist ja von vornherein anzunehmen, daß die als Antigene wirkenden Komplexe gleichzeitig Präzipitine und Ambozeptoren binden können, aber trotzdem diese beiden Funktionen durch differente Atomgruppierungen ausüben. Jedenfalls ist auch dann, wenn man sich auf den Standpunkt der Ambozeptorwirkung stellt, nur zu erwarten, daß die durch Präzipitinwirkung entstehenden Präzipitate gleichzeitig auch Ambozeptoren gebunden haben, ebenso wie das bei Blutkörperchen, die durch ein Immunserum agglutiniert sind, der Fall ist. Man wird also bei der Frage, ob die präzipitierenden und die die Komplementbindung vermittelnden Antikörper identisch sind, aus der Untersuchung der Präzipitate wenig Nutzen ziehen können. Die Fragestellung muß vielmehr lauten: Gibt es Komplementbindung ohne Präzipitation oder umgekehrt? Nun haben Neisser und Sachs bereits in ihrer ersten Arbeit und im Verfolg der Angaben Morschis darauf aufmerksam gemacht, daß die Komplementbindung bereits unter Verwendung minimalster Mengen der als Antigen fungierenden Eiweißlösungen zustande kommt, welche nicht mehr sichtbar präzipitabel sind. Diese Angaben sind allgemein bestätigt; ich erwähne nur die Arbeiten von Friedberger, Liefmann, Muir und Martin, Rose u. a. Als extremstes Beispiel sei der von Friedbergbr mitgeteilte Fall angeführt, der ein durch Vorbehandeln von Kaninchen mit Menschenblut gewonnenes Antiserum betrifft. Dieses Antiserum war imstande, noch im Verein mit $^1/_{1000000000}$ ccm Menschenserum eine vollständige Komplementbindung zu bewirken, und sogar mit menschlichem Schweiß reagierte es noch in 10000facher Verdünnung. Das sind minimale Mengen, bei denen eine Wirkung der Präzipitine nach den allgemeinen Erfahrungen ausgeschlossen ist, und man ist wohl berechtigt, aus diesen quantitativen Unterschieden bei der Präzipitatreaktion und bei der Komplementbindung darauf zu schließen, daß

die Bildung von Präzipitaten als solche nicht für den Eintritt der Komplementbindung verantwortlich gemacht werden kann (vergl. auch die Beobachtungen Moreschis mit Vogelantiserum). Uhlenhuth bemerkt allerdings, nicht beobachtet zu haben, daß die Komplementbindung mit wesentlich geringeren Antigenmengen zu erzielen ist, als die Präzipitation. Er muß wohl offenbar für diese Versuche schwächer wirksame Antisera in Händen gehabt oder nicht die optimalen Bedingungen für das Zustandekommen der Komplementbindung benutzt haben.

Abgesehen von dem quantitativen Vergleich kann man aber auch noch auf andere Weise Aufschluß darüber erhalten, ob Komplementbindung und Präzipitation unabhängig voneinander verlaufende Vorgänge sind. In dieser Hinsicht müssen zunächst die Untersuchungen von Wassermann und Bruck erwähnt werden, welche allerdings mit Bakterienextrakten arbeiteten. Wassermann und Bruck stellten nämlich fest, daß abgelagerte Bakterienextrakte im Gegensatz zu den frisch gewonnenen die Fähigkeit, durch die entsprechenden Immunsera präzipitiert zu werden, eingebüßt haben. Dagegen stimmten beide Extrakte bei der Komplementbindung in ihrer Wirksamkeit als Antigene vollkommen überein. Wassermann und Bruck haben sich auf Grund dieser Versuchsergebnisse auch der Ambozeptortheorie für die Komplementbindung angeschlossen. In ganz analoger Weise verfuhr Liefmann, welcher als Immunserum ein von Kaninchen durch Vorbehandeln mit Eiereiweiß gewonnenes Antiserum benutzte. Er konnte durch künstlichen Eingriff, nämlich durch Erhitzen, die Eiweißlösung so verändern, daß sie nicht mehr präzipitiert wurde, aber sich bei der Komplementbindung noch als wirksam erwies. Man muß also aus diesen Versuchen schließen, daß die Fällbarkeit der Eiweißantigene durch Präzipitin und ihre Fähigkeit, die komplementbindenden Antikörper zu verankern und wirken zu lassen, zwei differente Funktionen sind. Daraus kann man aber noch nicht ohne weiteres den Schluß ziehen, daß es sich um zwei verschiedene Funktionen in dem Antigenmolekül handelt, denn man kann sich ja vorstellen, daß, wie es für die Präzipitine auch beschrieben worden ist, durch das Erhitzen oder durch das Lagern zwar die Fällbarkeit der Antigenlösungen aufhört, ihre antikörperbindenden Funktionen aber in ungeschwächtem Maße bestehen bleiben. Daß man aber auch Antisera, die gleichzeitig präzipitieren und komplementbindend wirken, so verändern kann, daß sie die eine Wirkung verlieren, die andere aber beibehalten, haben Friedberger und Liefmann unabhängig voneinander zu zeigen vermocht. Es gelang diesen Autoren nämlich zu zeigen, daß durch Erhitzen des Antiserums auf 67°, wobei bekanntlich die präzipitierende Funktion aufgehoben wird, die Antisera sich zur Komplementbindung in ungeschwächtem Maße eignen. Auch diese Versuche lassen den sicheren Schluß zu, daß die komplementbindende Wirkung von der präzipitierenden vollständig unabhängig ist. Man kann aber auch daraus nicht direkt schließen, daß es sich um zwei verschiedene Antikörper handelt. Man könnte ja annehmen, daß der zur Wirkung gelangende Antikörper zwar ein einheitliches Molekül darstellt und eine haptophore Gruppe, eine präzipitierende und einen komplementbindenden Komplex besitzt. Die beiden letzteren müßten natürlich vollständig unabhängig voneinander sein und die präzipitierenden weit labiler, als die die Komplementbindung vermittelnden Komponenten. Das würde der Anschauung entsprechen, die von Wassermann für die cytotoxischen Ambozeptoren diskutiert worden ist. Die ganze Frage ist in der Tat sehr verwandt derjenigen nach der Verschiedenheit oder Identität zwischen

Agglutininen und hämolytischen Ambozeptoren. Wenn man also eine Differenz von Ambozeptoren und Agglutininen anerkennt, so wird man mit derselben Berechtigung auch präzipitierende und komplementbindende Antikörper im Antiserum differenzieren dürfen.

Für eine wirkliche Differenz der beiden Antikörper sprechen noch ganz besonders einige Umstände, die von Muir und Martin beobachtet wurden. Diese Autoren haben nämlich festgestellt, daß man komplementbindende Antikörper schon zu einer Zeit im Serum auffinden kann, zu der Präzipitine noch nicht nachgewiesen werden können. Dieser Befund sagt allerdings nicht viel anderes aus, als die Tatsache, daß die Komplementbindung eben die weit empfindlichere Reaktion ist, als die Präzipitation. Mehr Bedeutung wird man der weiteren Beobachtung von Muir und Martin beilegen müssen, daß sie auch vom Kaninchen durch Immunisieren mit Meerschweinchenserum ein Antiserum erhielten, das sich für die Komplementbindung sehr gut eignete, während Präzipitin in diesem Fall überhaupt nicht gebildet wurde. Zu erwähnen sind auch hier die interessanten Befunde Moreschis, daß Antisera, welche von Vögeln durch Vorbehandeln mit Kaninchenserum gewonnen wurden nnd äußerst stark präzipitierten, die Bindung weder von Vogel- noch von Säugetierkomplement zu vermitteln vermochten. Moreschi hat sich selbst durch diese Befunde veranlaßt gesehen, der Komplementbindung jeden Zusammenhang mit der Präzipitation abzusprechen.

Interessant sind auch die Beobachtungen Moreschis, denen zufolge bei Verwendung von Antiserum, das vom Kaninchen gewonnen ist, Komplementbindung bei Komplettierung durch Vogelserum nur dann zustande kommt, wenn der hämolytische Ambozeptor vom Kaninchen, aber nicht, wenn er von Vögeln stammt. Diese Tatsache spricht auch für die Pluralität der Komplemente.

Jedenfalls ergibt sich übereinstimmend, daß von einem etwaigen mechanischen Niederreißen der Komplemente durch das Präzipitat keine Rede sein kann, und daß im Gegenteil vieles dafür spricht, daß diejenigen Antikörper, welche die Komplementbindung bedingen, von dem Präzipitin verschieden sind. Diejenigen Feststellungen, welche die komplementbindende Wirkung der Präzipitate betreffen (Gay, Moreschi, Pfeiffer und Moreschi, Liefmann, Muir und Martin, Zebrowski) sind, wie ich schon auseinandergesetzt habe, für diese Frage ohne Bedeutung.

Es sei hier auch auf die Arbeiten Nicolles und seiner Mitarbeiter Pozerski und Abt verwiesen. Nicolle unterscheidet allgemein zwei Arten von Antikörpern, welche bei der der Immunisierung entstehen, „Koaguline" und „Lysine". Zu den Koagulinen gehören die Agglutinine für die zelligen Elemente und die Präzipitine für die gelösten Eiweißantigene, während die lytischen Ambozeptoren und die komplementbindenden Antikörper zu den Lysinen gerechnet werden.

Auf die theoretischen Erwägungen und Schlußfolgerungen Nicolles sei hier nur hingewiesen. Er nimmt an, daß auch die komplementbindenden Antikörper, wenn auch eine Einwirkung in vitro nicht sinnlich wahrzunehmen ist, lytische Funktionen ausüben, die sich in vivo durch das Freiwerden von Endotoxinen dokumentieren und die Erscheinungen der Überempfindlichkeit herbeiführen. Er berichtet über Versuche, in denen es ihm gelungen ist, im Serum von Tieren, die gegenüber Toxinen oder artfremdem Blutserum überempfindlich gemacht waren, Antikörper mittelst Komplementbindung nachzuweisen, die er eben für die Überempfindlichkeit verantwortlich macht.

Was nun die Ambozeptornatur der die Komplementbindung vermittelnden Antikörper anlangt, so konnte man zunächst von der Untersuchung der Bindungsverhältnisse einigen Aufschluß erhoffen. In dieser Erwartung ist Liefmann vorgegangen. Von der durch Ehrlich und Morgenroth entdeckten Tatsache ausgehend, daß von den Hämolysinen bei 0° zwar der Ambozeptor, nicht aber das Komplement gebunden wird, suchte er die gleichen Verhältnisse auch bei Verwendung von Hühnereiweiß als Antigen und dem entsprechenden Antiserum zu erzielen. Das ist ihm nicht gelungen. Dieses negative Ergebnis spricht aber nicht gegen die Ambozeptornatur der fraglichen Antikörper. Denn gerade diesem Problem stehen nicht unerhebliche methodische Schwierigkeiten gegenüber. Liefmann hat Eiereiweiß, Antiserum und Komplement bei 0° gemischt, dann den Niederschlag abzentrifugiert und die Flüssigkeit auf ihren Komplementgehalt durch Zusatz von Blut und hämolytischem Ambozeptor geprüft. Es erfolgte keine Hämolyse. Dafür können nun folgende Umstände verantwortlich gemacht werden:

1. Es kann in dem nach Abzentrifugieren des Präzipitates erhaltenen Abguß noch Antigen und Antikörper vorhanden sein und die Komplementbindung erst bei höherer Temperatur erfolgen. Demgegenüber bemerkt Liefmann, daß auch größere Mengen von Antigen und Antiserum nicht imstande sind, die Hämolyse vollständig aufzuheben, wenn sie gleichzeitig mit Komplement, Blut und Ambozeptor gemischt werden. Man muß aber bedenken, daß dann, wenn Antiserum, Antigen und Komplement vorher bei 0° gemischt sind, die Reaktion zwischen Antigen und Antiserum zu der Zeit bereits eingetreten ist, zu welcher der Zusatz von Blut und Ambozeptor erfolgt. Das Komplement wird also zunächst nur mit dem „sensibilisierten“ Eiweißantigen reagieren können, das eben eine Erhöhung der komplementophilen Avidität schon erfahren hat. Mit dem hämolytischen Ambozeptor wird es aber erst nach Ablauf einer gewissen Zeit, welche für die Verankerung an die Blutzellen erforderlich ist, in Beziehungen treten können. Inzwischen wird es aber zur Komplementbindung durch den Komplex „Eiweißantigen—Antiserum“ kommen können. Es ergibt sich daraus die Forderung, für derartige Versuche Blutkörperchen zu verwenden, die bereits vorher durch den Ambozeptor beladen sind.

2. An zweiter Stelle genügt es, an die bei der Besprechung der Komplemente erörterten näheren Umstände zu erinnern, welche für das Ausbleiben der Komplementverankerung bei 0° maßgebend sind. Es hat sich ja nach neueren Erfahrungen gezeigt, daß das Ehrlich-Morgenrothsche Gesetz nur für ganz bestimmte Bedingungen gültig ist, nämlich nur dann, wenn die Ambozeptormenge die Ambozeptoreinheit nicht wesentlich übersteigt. Bei einem Ambozeptorüberschuß ist aber auch unter Verwendung von ambozeptorbeladenen Blutzellen Komplement nach dem Digerieren bei 0° nicht mehr nachzuweisen. Ob dabei eine Bindung des Mittelstücks stattgefunden hat, das Endstück aber in Lösung bleibt, oder ob ein andersartiger Wirkungsmechanismus obwaltet, ist für die hier interessierende Frage gleichgültig. Jedenfalls ergibt sich, daß aus dem Mißlingen der Kältetrennung eine Schlußfolgerung in bezug auf die Ambozeptornatur der die Komplementbindung vermittelnden Antikörper überhaupt nicht gezogen werden darf, wenn nicht wenigstens die Bedingungen so gewählt sind, daß ein Überschuß von Antiserum sicherlich vermieden wird. Neue Untersuchungen unter Berücksichtigung der dis-

kutierten Momente können daher erst über den Einfluß der Temperatur auf das Zustandekommen der Komplementbindung Aufschluß bringen.

Der Kältetrennungsmethode haben sich auch NEUFELD und HÄNDEL zur Analyse der komplementbindenden Antikörper bedient. Obwohl die Untersuchungen NEUFELDS und seiner Mitarbeiter im wesentlichen die antibakteriellen Antikörper betreffen, so müssen wir sie doch wenigstens kurz streifen, weil die Autoren dazu gelangt sind, die die Komplementbindung vermittelnden Antikörper von den Ambozeptoren zu differenzieren, sie zwar nicht mit den Präzipitinen für identisch zu erachten, aber sie als Antikörper sui generis aufzufassen und mit der Bezeichnung „BORDETsche Antikörper" zu belegen. NEUFELD und HÄNDEL stellten fest, daß die mit spezifischem Immunserum versetzten Cholerabazillen bei 0° das hämolytische Komplement binden. Dieses Resultat hat nichts Befremdendes, da ja, wie schon mehrfach erwähnt, nach den neueren Erfahrungen ein Komplementschwund auch bei 0° durch ambozeptorbeladene Elemente erfolgt, wenn nicht gerade ein Ambozeptorüberschuß vermieden wird. Bemerkenswert ist die weitere, von den Autoren festgestellte Tatsache, daß unter den gleichen Verhältnissen das bakterizide Komplement erhalten war. Wurde der gleiche Versuch bei 37° ausgeführt, so ergab sich, daß sowohl hämolytisches als bakterizides Komplement gebunden wurde. NEUFELD und HÄNDEL schließen daraus, daß bei 0° die Komplementbindung nur durch den BORDETschen Antikörper stattfand, bei 37° dagegen gleichzeitig durch bakteriolytische Ambozeptoren. Diese Schlußfolgerung erscheint allerdings nicht ohne weiteres zwingend. Es ergibt sich daraus zunächt nur, daß hämolytisches und bakteriolytisches Komplement differente Stoffe sind, und es ist ja ohne weiteres denkbar, daß sie sich derart unterscheiden, daß das hämolytische Komplement bei einem Ambozeptorüberschuß zwar auch bei 0° gebunden wird, das bakterizide aber trotz Ambozeptorüberschuß bei 0° nicht reagiert. Es ist auch eine offene Frage, ob die bakteriolytischen Komplemente, ebenso wie die hämolytischen, komplexer Konstitution sind; wenigstens stehen Untersuchungen darüber noch aus. Aber auch wenn die bakteriolytischen Komplemente in gleicher Weise durch das Zusammenwirken von Mittelstück und Endstück zur Wirkung gelangen, so ist doch die Möglichkeit gegeben, daß die relative Konzentration der beiden Komponenten im Serum eine verschiedene ist. Wenn z. B. für das hämolytische Komplement ein Überschuß von Endstück, für das bakteriolytische ein Überschuß von Mittelstück in demselben Serum besteht, so wird es verständlich sein, daß durch Digerieren des Serums mit ambozeptorbeladenen Bakterien bei 0° genügend Mittelstück entfernt wird, um das hämolytische Komplement seiner Wirksamkeit zu berauben, aber nicht genügend, um auch das bakterizide Komplement inaktiv zu machen. Eine einfache Bestimmung der komplettierenden Wirkung für beide Funktionen ist daher vielleicht heute nicht mehr hinreichend, um über die tatsächlichen Verhältnisse des Komplementgehaltes vollkommen Aufschluß zu geben. Bedeutungsvoller erscheinen daher Versuche von NEUFELD und HÄNDEL, in denen sie zeigen, daß ein Choleraserum, das stark bakterizid, aber schwach komplementbindend wirkte, bei 37° zwar das bakterizide Komplement stark band, dagegen das hämolytische Komplement nur in geringem Grade. Es muß zwar bemerkt werden, daß, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, in diesem Versuch der Autoren Serum und Kultur an und für sich das hämolytische Komplement vollständig unbeeinflußt ließen, während sie in dem anderen Versuch bereits an und für sich eine nicht unerhebliche Abschwächung

des hämolytischen Komplements bedingten. Es fragt sich daher, ob nicht in dem Versuch, in welchem sich eine starke Bindung der hämotytischen Komplemente bei 37° ergab, das Resultat wenigstens teilweise durch Summation bedingt ist.

Neufeld und Händel berichten ferner über einen Versuch, den sie mit einem durch Immunisieren mit einem Wasservibrio erhaltenen Immunserum ausführten, welches auf Cholerabazillen nicht bakteriolytisch wirkte. Dasselbe wirkte bei 37° im Verein mit Cholerakultur sowohl auf das bakterizide als auch auf das hämolytische Komplement bindend. Ganz besonders aus diesen Versuchen folgern die Autoren, daß der komplementablenkende Antikörper different von dem bakteriziden Ambozeptor ist, weil eben der hier zur Wirkung gelangende Antikörper die Bindung des für Cholerabazillen bakteriziden Komplements vermittelt, ohne eine Auflösung der Vibrionen bewirken zu können. Nun wird man ja ohne weiteres zugeben dürfen, daß ein die Komplementbindung vermittelnder Antikörper nicht bakterizid zu sein braucht. Daraus ergibt sich aber noch nicht, daß ein so beschaffener Antikörper die Ambozeptornatur ausschließt. Es kommt hierbei alles auf die Definition des Ambozeptors an. Man hat ja ursprünglich den Ambozeptor, wie es auch Neufeld und Händel in der betreffenden Arbeit tun, dahin definiert, daß man darunter einen mit zweierlei bindenden Gruppen versehenen Körper verstand, der sich einerseits an die haptophore Zellgruppe verankert, sich andererseits mit dem Komplement verbindet und dadurch die Wirkung des Komplements auf die Zelle vermittelt.

Aber gerade der letzte Zusatz ist insbesondere von der Ehrlichschen Schule im Hinblick auf die Tatsache der Bindung nichtdominanter Komplemente fallen gelassen worden. Und es sind auch für die hämolytischen Sera Ambozeptoren nachgewiesen worden, welche die Bindung der Komplemente an die Zelle vermitteln, ohne Hämolyse zu bedingen, obgleich die gleichen Komplemente bei Verwendung anderer Ambozeptoren hämolytisch wirken. So hat bereits Browning einen Ambozeptor im Pferdeserum nachgewiesen, der das Pferdekomplement an Meerschweinchenblutkörperchen bindet, ohne hämolytisch zu wirken, obwohl das gleiche Komplement unter Verwendung eines Ambozeptors des Rinderserums hämolytisch wirkt. In analoger Weise haben Sachs und Bauer auch im hämolytischen Immunserum die Gegenwart von zwei Ambozeptorfraktionen festgestellt, wobei das gleiche Komplement für die eine dominant, für die andere nicht dominant ist. Es zeigt sich dies dadurch, daß schwach sensibilisierte Blutzellen das betreffende Komplement vollkommen binden, ohne aufgelöst zu werden, während bei stark sensibilisierten Blutzellen — in diesem Falle unter besonderen Bedingungen — Hämolyse eintritt. Die Tatsache, daß das sonst für die Lyse der gleichen Zellart wirksame Komplement durch Vermittlung eines anderen Antikörpers an das gleiche Zellelement gebunden wird, ohne lytisch zu wirken, scheint mir also nicht dagegen zu sprechen, daß man derartige Antikörper als Ambozeptoren bezeichnen darf. Man muß eben nur unter Ambozeptoren solche Antikörper verstehen, die die Bindung des Komplements an die entsprechenden Antigene vermitteln; dabei kann man dann zwischen cytotoxischen und atoxischen Ambozeptoren unterscheiden. Es kann aber sehr wohl sein, daß der bei einer bestimmten Komplettierung atoxische Ambozeptor bei einer anderen zytotoxisch ist,

und umgekehrt*). Nur atoxische oder inaktive Ambozeptoren würden dem BORDETschen Antikörper im Sinne von NEUFELD und HÄNDEL entsprechen. Differenzen, wie sie von den Autoren zwischen bakteriolytischem Titer und Komplementbildungsvermögen beschrieben wurden, würden sich auch dadurch erklären; man könnte sogar von vornherein annehmen, daß Immunsera, welche ein starkes Komplementbindungsvermögen aufweisen, in gewissen Fällen gerade dadurch schwach bakteriolytisch wirken, wenn man nämlich annimmt, daß das Komplement durch die nur komplementbindenden Ambozeptoren von den bakteriziden abgelenkt wird. Der wirkliche Effekt wird aber wohl die Resultante einer Reihe von Faktoren darstellen, wobei Massenwirkung und Aviditätsunterschiede an erster Stelle zu berücksichtigen sein werden. Im übrigen kann an dieser Stelle auf die mit antibakteriellen Seris gewonnenen Erfahrungen über Komplementbindung und auf ihre Bedeutung für die Praxis nicht näher eingegangen werden, da ja diese Verhältnisse an anderen Orten in diesem Handbuch Besprechung finden.

Für die hämolytischen Sera liegen einige Versuche vor, aus denen sich ergab, daß die Bindung des bakteriziden Komplements durch Vermittlung hämolytischer Immunsera an die Blutzellen nicht etwa durch Präzipitate erfolgt, sondern durch direkte Bindung des Komplements an die zelligen Elemente. HÄNDEL fand dabei die komplementbindende Wirkung des Serums seiner hämolytischen Kraft annähernd parallel. Im Gegensatz zu der von NEUFELD und HÄNDEL vertretenen Ansicht, daß der von ihnen sogenannte BORDETsche Antikörper bei 0° nur das hämolytische, aber nicht das bakterizide Komplement bindet, steht übrigens ein Versuch von HÄNDEL, aus dem sich ergibt, daß ambozeptorbeladene Hammelblutkörperchen bei 0° sowohl hämolytisches als auch bakterizides Komplement gebunden haben. Wenn es aber eine besondere Eigentümlichkeit des BORDETschen Cholera-Antikörpers ist, bei 0° nur das hämolytische Komplement zu binden, so ist es schwer zu verstehen, wieso der BORDETsche Erythrocyten-Antikörper bei 0° sowohl das hämolytische, als auch das bakterizide Komplement bindet. Denn man müßte doch wohl annehmen, daß der BORDETsche Antikörper allgemein bei 0° entweder nur hämolytische oder gerade nichtdominante Komplemente bindet. Es ergibt sich schon daraus, daß es schwierig sein dürfte, eine Differenzierung von BORDETschen Antikörpern und cytotoxischen Ambozeptoren im Sinne NEUFELDS und HÄNDELS unter Berücksichtigung der Abhängigkeit der Komplementbindung von der Temperatur als Kriterium streng durchzuführen. Jedenfalls scheint es heute mit der Definition des Ambozeptors durchaus vereinbar, wenn man die die Komplementbindung vermittelnden Antikörper allgemein als Ambozeptoren auffaßt und sich nur bewußt ist, daß eine Komplementbindung durch Ambozeptoren auch an zellige Elemente erfolgen kann, ohne zu cytotoxischer Wirkung zu führen.

MUIR und MARTIN haben die hämolytische und komplementbindende Fähigkeit verglichen. Hämolytische Sera, welche durch Rinderblutzelleninjektion erhalten waren, und deren Ambozeptoreinheit 0,0015 ccm betrug, bewirkten mit nicht geringeren Dosen als 0,001 ccm Rinderserum Komplementbindung, während Antisera, welche durch Vorbehandeln von Rinder-

*) Die Annahme derartiger „inaktiver" Ambozeptoren im bakteriolytischen Immunserum hat übrigens schon LEVADITI gemacht, um den Mechanismus des NEISSER-WECHSBERGschen Phänomens der Komplementablenkung durch einen Ambozeptorüberschuß zu erklären.

serum erhalten waren, bei einer Ambozeptoreinheit von 0,05 ccm, noch im Verein mit 0,000001 ccm Rinderserum zur Komplementbindung geeignet waren. Wurde ein Antiserum letzterer Art mit Rinderblut ausgefällt, so hatte es bei Verlust der hämolytischen Fähigkeit seine präzipitierende und Komplement bindende Wirkung bewahrt. Daraus schließen Muir und Martin, daß die reagierenden Antigene des Blutserums, welche die Komplementbindung auslösen, von den die hämolytischen Ambozeptoren bindenden Rezeptoren der Erythrocyten different sind.

Daß sich übrigens die Komplementbindung durch das Zusammenwirken von gelösten Eiweißantigenen und ihren Antikörpern nicht nur auf hämolytische, sondern auch auf bakterizide Komplemente erstreckt, hatten bereits Pfeiffer und Moreschi in Tierversuchen gezeigt. Man wird andererseits nicht in allen Fällen, in denen die Bedingungen für die Reaktion zwischen Antigenen und Antikörpern gegeben sind, ohne weiteres eine Komplementbindung erwarten dürfen. Die Voraussetzung für das Zustandekommen der Komplementbindung ist ja, daß die benutzten Antikörper geeignete komplementophile Gruppen zur Bindung des zur Verwendung gelangenden Komplements besitzen, Moreschi hat auf diese Weise das Versagen der Komplementbindung bei Seris, welche nachweislich bakterizide Ambozeptoren enthielten, zu erklären versucht, und auch für die Antikörper gegen gelöste Eiweißstoffe liegen Befunde in dieser Richtung vor. So berichten Muir und Martin, eine Komplementablenkung vermißt zu haben, wenn sie die Hämolysine des Rinderblutserums als Komplemente benutzten, und ebenso auch dann, wenn sie Kaninchenkomplement und Meerschweinchenblutkörperchen, die mit spezifischem Immunserum vorbehandelt waren, als hämolytisches System verwandten. Was die natürlichen Hämolysine anlangt, so scheint das Versagen der Komplementbindung in diesem Falle nicht zu den Seltenheiten zu gehören. So berichtet Sachs darüber, daß die Komplementbindung versagt, wenn die normalen Hämolysine des Rinder- und Hundeserums für Kaninchen- und Meerschweinchenblut benutzt werden. Analage Befunde sind von Rose mit den gleichen Seris, und auch mit Hammelserum erhoben worden. Es kommt hier vielleicht außer dem Umstande, daß die verwandten Antikörper, die ja fast stets vom Kaninchen stammen, vielleicht keine geeignete komplementophile Gruppe für die in Frage stehenden Komplemente besitzen, noch ein weiterer Faktor in Betracht. Ich habe schon an anderer Stelle darauf aufmerksam gemacht, daß möglicherweise das Ausbleiben der Komplementbindung bei Verwendung natürlicher Hämolysine darauf zurückzuführen ist, daß Ambozeptor und Komplement in diesen Seris doch bereits in ziemlich festen Beziehungen zu einander stehen, so daß eine Ablenkung des Komplements durch das Zusammenwirken von Eiweißantigen und Antikörper nicht möglich wird. Gerade die erwähnten normalen Sera sind dadurch ausgezeichnet, daß bei ihnen auch die Trennung von Ambozeptor und Komplement durch die Kältemethode auf erhebliche Schwierigkeiten stößt oder überhaupt undurchführbar ist. Es ist in diesem Zusammenhange interessant, darauf hinzuweisen, daß gerade bei solchen Hämolysinen, bei denen das Kältetrennungsverfahren sehr gut gelingt, auch die Ablenkungsreaktion prompt eintritt. Es sind dies das im Kaninchenserum enthaltene Hämolysin für Hammelblut (Neisser und Sachs) und das im Schweineserum enthaltene Hämolysin für Hammelblut (Sachs).

Was nun das Verhalten der bei der Komplementablenkung zusammentretenden Komponenten gegenüber verschiedenen Einflüssen an-

langt, so beschreibt Moreschi die Zerstörung der Antikörper durch einstündiges Erhitzen auf 75°. Rose fand bereits bei 70° eine Abschwächung der komplementbindenden Antikörper. Jedenfalls sind die Antikörper thermostabil, das heißt, sie behalten bei halbstündigem Erhitzen auf 55° ihre volle Reaktionsfähigkeit, und nach den Versuchen von Friedberger und Liefmann vertragen sie auch einstündiges Erhitzen bei 67° ungeschwächt. Was die Antigene anlangt, so gibt bereits Moreschi an, daß Erhitzen auf 75° die Fähigkeit von Eiweißlösungen, im Verein mit dem Antiserum durch Komplementbindung zu reagieren, nur schwächt und erst Temperaturen von 100° sie vollständig aufheben. Diese Zerstörbarkeit der Antigene beim Kochen ist praktisch wichtig, denn es ergibt sich daraus, wie Neisser und Sachs bemerkt haben, für den Fall, daß man im Zweifel ist, ob die Komplementbindung durch echte Antigene erfolgt, eine einfache Kontrolle, indem man die zu untersuchenden Lösungen auch im gekochtem Zustande untersucht. Handelt es sich um Antigene, so muß die Komplementbindung dann aufgehoben sein. Sehr merkwürdig ist die von Pick und Pribram beschriebene Tatsache, daß Rinderserum als Antigen durch Ätherextraktion in seiner Empfindlichkeit bei der Komplementbindung um das 100fache gesteigert wird (ebenso in seiner Präzipitierbarkeit), und daß durch Zusatz des Ätherextraktes zu dem extrahierten Serum die ursprünglichen Verhältnisse wiederhergestellt werden. Ob Pferdeserum, das durch Ätherextraktion in seiner Präzipitierbarkeit unbeeinflußt bleibt, und Hunde- sowie Menschenserum, die durch Ätherextraktion an Präzipitierbarkeit einbüßen, sich bei der Komplementbindung analog verhalten, ist von Pick und Pribram nicht angegeben.

In theoretischer und praktischer Hinsicht wichtig sind ferner die quantitativen Verhältnisse, welche bei der Komplementbindung eine Rolle spielen. Fleischmann und Michaelis haben zuerst darauf aufmerksam gemacht, daß ein Überschuß von Antigen die Komplementbindung aufheben kann. Liefmann hat weiter beobachtet, daß, wenn zunächst unter Verwendung einer geeigneten Menge von Antigen eine Komplementbindung eingetreten ist, diese durch einen nachträglich zugesetzten Überschuß des Antigens nicht mehr gelöst wird, während beim sofortigen Mischen der gesamten Antigenmenge die Komplementbindung ausbleibt (vergl. auch Zebrowski). Diese Hemmung der Komplementbindung durch einen Überschuß von Antigen steht übrigens in Übereinstimmung mit der unter gleichen Verhältnissen auftretenden Aufhebung der Präzipitation. Merkwürdiger ist, daß, wie Neisser und Sachs sowie Moreschi zuerst gezeigt haben, für das Zustandekommen der Komplementbindung nicht nur ein Überschuß von Antigen, sondern auch ein Überschuß von Antiserum vermieden werden muß. Es kann nämlich vorkommen, daß kleinere Antikörpermengen eine Komplementbindung vermitteln, während größere sich unwirksam erweisen. Um allerdings dieses Phänomen im Sinne einer Aufhebung durch einen Antikörperüberschuß zu verwerten, muß man verschiedene Fehlerquellen ausgeschaltet haben. Es kann nämlich vorkommen, daß das Antiserum normale Ambozeptoren für die zur Verwendung gelangende Blutart besitzt, die erst bei Verwendung größerer Mengen interferieren und dann durch Verstärkung der hämolytischen Wirkung eine Komplementbindung larvieren können. Man wird auch an die von Liefmann zur Erklärung herangezogene Möglichkeit denken müssen, daß ein Überschuß von Antiserum eine Ablenkung des Komplements von den Antigenen durch die freien, nicht

mehr an das Antigen gebundenen Antikörper verursacht, so daß also eine Komplementablenkung im Sinne von Neisser und Wechsberg resultiert, die aber, wenn nachträglich Blutzellen und Ambozeptoren zugefügt werden, gerade die Hämolyse verursachen muß. Die Verhinderung der Komplementbindung kann man schließlich auch auf die antireaktive Funktion größerer Serummengen zurückführen. Diese letztere würde dann im Sinne von Bordet und Gay bei Zusatz von Blut und Ambozeptor durch die resultierende Verdünnung fortfallen, so daß das Komplement nunmehr zur hämolytischen Wirkung gelangt.

Aus den mitgeteilten Angaben ergibt sich bereits, daß der stärkste Grad der Komplementbindung von einem optimalen Verhältnis zwischen Antigen und Antiserum abhängig ist. Besondere Untersuchungen von Pfeiffer und Moreschi, sowie Moreschi, Muir und Martin haben dieses Abhängigkeitsverhältnis eingehend illustriert. Nach diesen Autoren fällt das Optimum der Komplementbindung mit dem Optimum der Präzipitation zusammen. Wenn auch in vielen Fällen eine derartige Relation zu bemerken sein dürfte, so stellt sie doch keineswegs eine allgemeine Gesetzmäßigkeit dar. Es sind schon Befunde erwähnt worden, welche zeigen, daß Antisera, welche nur schwach oder gar nicht präzipitieren, starke Komplementbindung vermitteln können, und nach Angaben von Neisser und Sachs sowie von Klein darf man schließen, daß Stärke der Niederschlagsbildung und Ablenkungsvermögen durchaus nicht immer einander proportional sind. In gleicher Weise haben Muir und Martin konstatiert, daß eine Proportionalität zwischen Stärke des Niederschlags und Komplementbindung nicht immer besteht. Nach Untersuchungen von Bauer hat es den Anschein, als ob man auch mit einem und demselben Antiserum je nach den Umständen Präzipitate ohne Komplementbindung und umgekehrt Komplementbindung ohne Präzipitation erhalten kann. Es zeigte sich nämlich, daß bei Verwendung des homologen Normalserums als Antigenkomponente Komplementbindung noch mit so geringen Mengen zu erzielen war, die eine sichtbare Präzipitation nicht mehr hervortreten ließen. Dagegen reagierten die gleichen Antisera mit größeren Mengen von heterologen Blutseris präzipitierend, bewirkten aber im Verein mit letzteren keine Komplementbindung. Ob diese Verhältnisse dadurch bedingt sind, daß die präzipitierenden und komplementbindenden Antikörper (Ambozeptoren) different sind, sei vorläufig dahingestellt. Jedenfalls muß man tatsächlich damit rechnen, daß Komplexe von Antiserum und heterologem Antigen zur Komplementbindung wenig geeignet sind, während die aus Antiserum und homologem Antigen resultierenden Verbindungen auch dann noch komplementbindend wirken, wenn ihr Entstehen durch eine Präzipitatbildung nicht mehr wahrzunehmen ist. Das ist für die Verwendung der Komplementbindung in der Praxis wichtig, weil sich daraus eine außerordentliche Spezifität der Reaktion ergibt.

Was die Spezifität der Komplementbindung überhaupt anlangt, so ergab sich bereits aus den Untersuchungen Moreschis, daß es sich um eine spezifische Reaktion handelt. Neisser und Sachs konnten dann den hohen Grad der Spezifität erweisen, indem sie zeigten, daß Antisera, welche mit dem homologen Serum noch in einer Menge von 0,00001 ccm reagierten, auch mit 0,01 ccm von heterologen Seris eine Komplementbindung nicht mehr ergaben. Zu dem gleichen Ergebnis sind Wassermann und Schütze gelangt. Die gegenteiligen Angaben von Schulz und Marx müssen wohl unbedingt auf methodischen Abweichungen beruhen; offen-

bar haben die von ihnen benutzten Blutextrakte bereits an und für sich — ohne Zusatz von Antiserum — antikomplementär gewirkt, zumal diese Autoren normale Hämolysine gleichzeitig als Komplement verwendeten. Bei allen Funktionen der Immunsera muß als Regel gelten, daß eine um so größere Spezifität zu erwarten ist, je schwächer wirksam die zu verwendenden Antisera sind. Denn je stärker die Immunisierung, je mächtiger der Ictus immunisatorius ist, um so mehr ist die Möglichkeit gegeben, daß auch Rezeptoren zur Erzeugung von Antikörpern gelangen, welche die injizierten Antigene mit anderen gemeinsam haben. Diese auf heterologe Antigene wirkenden Antikörper bleiben in der Regel an Menge zurück. Will man daher Studien über die Spezifitätsfrage mittels der Komplementbindung anstellen, so wird es sich um zweierlei Fragestellungen handeln, die für die zu wählende Versuchsanordnung leitend sein müssen. Handelt es sich um den Nachweis von gemeinsamen Rezeptoren, so dürfte es sich empfehlen, mit hochwertigen Antiseris in großen Mengen zu arbeiten. Will man aber grade Artverschiedenheiten und die Spezifität erkennen, so wird man allzu hochwertige Antisera vermeiden müssen und sie jedenfalls in nicht zu großen Mengen verwenden dürfen. Wenn man in letzterer Hinsicht vorgeht, so erweist sich die Komplementbindungsreaktion, wie insbesondere die Untersuchungen von Rickmann und Bauer gezeigt haben, von einer außerordentlichen Spezifität und darin der Präzipitinwirkung nicht unerheblich überlegen.

Es muß dabei dahingestellt bleiben, ob diese größere Spezifität bei der Komplementbindung dadurch bedingt ist, daß man mit geringeren Mengen von Antiserum arbeiten kann und muß, als bei der Präzipitation, oder ob die komplementbindenden Antikörper an und für sich spezifischer sind als die Präzipitine. Versuche von Bauer, auf welche hier verwiesen sei, sprechen in letzterem Sinne. Bruck gelang es sogar, durch Verwendung nicht sehr hochwertiger Antisera eine derartige Spezifität zu erzielen, daß das Blutserum verschiedener Affenarten differenziert werden konnte. So wirkte ein Antiserum, welches durch Vorbehandlung von Kaninchen mit dem Serum einer Makakusart gewonnen war, auf das Blutserum von Makakus in viel stärkeren Verdünnungen, als auf das Blutserum der anthropoiden Affen und auf letzteres wieder erheblich stärker als auf dasjenige des Menschen komplementbindend. Umgekehrt konnte Bruck mit einem Antiserum, welches von Kaninchen durch Immunisieren mit Menschenblut gewonnen war, Menschenserum noch in 1000facher Verdünnung mittels Komplementbindung nachweisen, während das Blutserum vom Orang-Utang erst in 50facher Verdünnung reagierte und Makakuserum auch in dieser starken Konzentration eine Komplementbindung nicht ergab. Endlich konnte Bruck auch verschiedene Menschenrassen mittels des Komplementbindungsverfahrens unterscheiden, also eine ganz außerordentliche Spezifität der komplementbindenden Antikörper bei geeigneter Verdünnung des Antigens nachweisen. Bruck beschreibt auch, daß es bei geeigneter Versuchsanordnung gelingt, mit schwach wirksamen Antiseris, welche durch Immunisieren mit Blut gewonnen sind, eine Komplementbindung mit Blut als Antigen zu erzielen, während eine Komplementbindung bei Verwendung von Sperma der gleichen Tierart ausbleibt.

Wir haben zuletzt schon die praktische Verwendbarkeit der Komplementbindung gestreift, müssen aber, bevor wir näher auf die Methodik für die Praxis eingehen, noch einige Umstände erwähnen, die zu berücksichtigen sind. Es muß zunächst darauf hingewiesen werden, daß nicht

ohne weiteres eine antikomplementäre Wirkung, welche durch den Zusammentritt von zwei, in gleichen Mengen an und für sich nicht antikomplementär wirkenden Stoffen erfolgt, durch die kombinierte Wirkung von Antigen und Antikörper bedingt sein muß. Es kann sich um Summationserscheinungen handeln, indem die zur Verwendung gelangenden Komponenten zwar in denjenigen Mengen, in denen sie benutzt werden, an und für sich nicht antikomplementär wirken, wohl aber in etwas größeren, so daß immerhin durch ihr Zusammenwirken eine antikomplementäre Wirkung durch einfache Summation entstehen kann. Man muß daher darauf bedacht sein, zu Komplementbindungsversuchen nur solche Dosen von Antigen und Antiserum zu verwenden, welche auch in doppelter Menge an und für sich nicht antikomplementär wirken. Es können auch noch andere Umstände in Betracht kommen (chemische Reaktionen, kolloidale Zustandsänderungen und bisher unbekannte Momente), welche durch formale Analogie eine echte Komplementbindung vortäuschen. Wenn man z. B. an die Zerstörung der Komplemente im salzfreien Medium denkt und an deren Abhängigkeit von minimen Schwankungen der Reaktion, so wird man es begreiflich finden, daß Ursachen vorkommen können, die zu einer Zerstörung des Komplements führen, ohne daß es sich um eine echte Komplementbindung zu handeln braucht, und ohne daß wir vorläufig in der Lage sind, einen näheren Einblick in den Wirkungsmechanismus dieser Vorgänge zu erlangen. Mir scheint es insbesondere zweifelhaft, ob die interessanten Befunde von Seligmann, der eine antikomplementäre Wirkung durch das Zusammenwirken zweier Chemikalien (Kalziumchlorid und Soda, Mastix und Kochsalz, Schellack und Kochsalz, Schellack und Gelatine, Gelatine und Formalin) beschreibt, mit der wirklichen Komplementbindung durch Antigene und Antisera etwas zu tun haben. Jedenfalls sind derartige Befunde interessant genug, um weiter analysiert zu werden, und es wird Aufgabe der weiteren Forschung sein, diese Verhältnisse aufzuklären.

Für die praktische Anwendung ist ferner wichtig, daß die Reihenfolge der Zusätze für die komplementbindende Wirkung nicht gleichgültig ist. Schon Moreschi hat darauf aufmerksam gemacht, daß Hämolyse eintritt, wenn man alle Komponenten mischt und erst später das Komplement hinzufügt. Wie ferner auch die Arbeiten von Michaelis und Fleischmann, Browning und Sachs, Liefmann, Rose gezeigt haben, muß, damit eine maximale Komplementbindung erzielt wird, Antigen, Antiserum und Komplement erst eine zeitlang aufeinander einwirken, bevor man Blut und Ambozeptor zusetzt. Es empfiehlt sich im allgemeinen, die Gemische, welche die drei erstgenannten Komponenten enthalten, eine Stunde bei 37° zu digerieren und sodann Ambozeptor und Blut hinzuzufügen.

Was weiterhin die Beziehungen zwischen Antiserum, Ambozeptor und Komplement bei der Komplementbindung anlangt, so beschäftigen sich Untersuchungen von Moreschi eingehend mit dieser Frage. Schon früher hatten Morgenroth und Sachs über quantitative Beziehungen zwischen Antikomplement, Ambozeptor und Komplement berichtet. Es sei auch hier noch einmal daran erinnert, daß in vielen Fällen die zur Hämolyse notwendigen Komplementmengen von der Ambozeptormenge abhängig sind, das heißt, daß in der Regel der zur kompletten Hämolyse erforderliche Komplementbedarf um so geringer ist, je mehr Ambozeptor verwendet wird. Was nun die Beziehungen zwischen Antikomplement und hämolytischem System anlangt, so hatten Morgenroth

und Sachs schon damals gezeigt, daß die zur vollständigen Hemmung notwendige Antiserummenge viel mehr eine Funktion des Ambozeptors als des Komplements darstellte, das heißt, das Antiserum hemmte viel stärker, wenn bei einer geringen Ambozeptormenge die minimal lösende (absolut hohe) Komplementdosis verwandt wurde, als wenn bei einem Ambozeptorüberschuß die minimale (absolut niedrige) Komplementdosis zur Anwendung gelangte. Diese Untersuchungen konnten natürlich dem heutigen Stande unserer Kenntnis noch nicht gerecht werden, da die Antisera entsprechend der damals gültigen Anschauung als einfache Antikomplemente aufgefaßt wurden. Indes führten die Untersuchungen Moreschis, die unter Berücksichtigung der komplexen Konstitution der antikomplementär wirkenden Serumstoffe angestellt wurden, zu einem analogen Ergebnis. Es zeigte sich nämlich auch hier, daß dieselbe Antiserumdosis bei Verwendung der gleichen Antigenmenge stärker komplementbindend wirkte, wenn die Ambozeptoreinheit mit einer großen Komplementmenge, als wenn ein Ambozeptorüberschuß mit einer geringen Komplementmenge verwandt wurde. Durch Erhöhung der Antigendosis gelingt es dann aber, wie Moreschi gezeigt hat, die gleiche Antiserummenge auch für eine große Ambozeptor- und minimale Komplementdosis zur antikomplementären Wirkung gelangen zu lassen. Für die Praxis ergibt sich daraus, daß man zweckmäßig nach wie vor an den von Morgenroth und Sachs aufgefundenen Prinzipien festzuhalten hat. Man wird in der Regel bessere antikomplementäre Wirkungen und so auch stärkere Komplementbindung erhalten, wenn man mit einer geringen Ambozeptormenge und dementsprechend höheren Komplementdosis arbeitet. Daß ein Überschuß von hämolytischen Ambozeptoren überhaupt die Komplementbindung vereiteln kann, darauf haben bereits Neisser und Sachs hingewiesen. Es ist ja auch ohne weiteres verständlich, da mit der Steigerung der Ambozeptormengen der Komplementbedarf abnimmt, und daher noch sehr geringe freigebliebene Komplementmengen durch ihre hämolytische Wirkung in Erscheinung treten.

Anwendung der Komplementbindung.

Was nun die Anwendung der Komplementbindung zu praktischen Zwecken anlangt, so ist ja in den letzteren Jahren durch die Arbeiten von Moreschi sowie Neisser und Sachs der Anstoß zu mannigfacher Verwendung gegeben worden. Es handelt sich dabei immer um den indirekten Nachweis, daß eine Reaktion zwischen zwei Stoffen (Antigen und Antikörper) stattgefunden hat. Ist nur die eine der beiden Komponenten bekannt, so wird aus der stattgefundenen Komplementbindung geschlossen, daß auch die korrespondierende in dem Reaktionsgemisch vorhanden war. Man bedient sich zu diesem indirekten Nachweis aus Zweckmäßigkeitsgründen stets der hämolytischen Komplemente, mischt also einerseits das bekannte Antigen oder bekannte Antiserum mit dem unbekannten X, fügt komplettierendes Serum hinzu und stellt fest, ob eine Reaktion eingetreten ist, das heißt, ob das unbekannte X entweder Antikörper oder Antigen enthält. Die eingetretene Reaktion dokumentiert sich eben in diesem Falle durch die Komplementbindung, den Komplementverbrauch, und nachträglich hinzugefügte Blutkörperchen bleiben daher trotz eines geeigneten Zusatzes von hämolytischem Ambozeptor ungelöst.

Was den Antikörpernachweis mittels Komplementbindung anlangt, so haben bereits Bordet und Gengou dieses Verfahren angewandt, um antibakterielle Ambozeptoren, deren bakterizide Wirkung nicht ohne weiteres festzustellen ist, im Reagenzglasversuch nachzuweisen. Während aber Bordet und Gengou dabei nur mit intakten Bakterienzellen arbeiteten, haben Wassermann und seine Mitarbeiter das Verfahren erheblich erweitert, indem sie den Antikörpernachweis auch auf die Benutzung von gelösten Bakterienextrakten ausdehnten. Durch das zielbewußte Vorgehen Wassermanns in dieser Richtung wurde der Serodiagnostik der Infektionskrankheiten ein neues Gebiet eröffnet, über welches heute bereits eine Fülle von Arbeiten vorliegt. An dieser Stelle muß jedoch Verzicht darauf geleistet werden, auf diesen Teil der praktischen Verwendung der Komplementbindung näher einzugehen. Es sei nur daran erinnert, zu welch großer Bedeutung in so kurzer Zeit die von Wassermann geschaffene Serodiagnostik der Syphilis gelangt ist, die eine weitgehende formale Analogie mit dem Phänomen der Komplementbindung aufweist, wenn es auch noch nicht als sicher erwiesen erscheint, daß es sich hier um wesensgleiche Vorgänge handelt. Auch dieses Gebiet wird ja an anderer Stelle dieses Handbuches eine besondere Besprechung erfahren.

Ein zweites großes Terrain, welches mittels der Komplementbindung gangbar ist, ist der Antigennachweis. Das Verfahren des Antigennachweises mittels Komplementbindung stammt von M. Neisser und Sachs. Neisser uud Sachs erkannten, daß durch die Spezifität der im Antiserum enthaltenen Antikörper und durch den Umstand, daß das Antiserum bereits mit den minimalsten Mengen des entsprechenden Antigens mittels Komplementbindung reagiert, die Bedingungen gegeben waren, den Nachweis der Antigene in außerordentlich feiner Weise zu führen. Es gelang ihnen, nachzuweisen, daß die Komplementbindung für die Eiweißdifferenzierung mit Erfolg anzuwenden ist, und dadurch die Grundlage zu legen zu einer neuen biologischen Methode. Verwiesen kann an dieser Stelle nur werden auf die Anwendung und den umfassenden Ausbau, den das Verfahren durch Wassermann und seine Schule für die Differenzierung des Bakterieneiweißes und den Nachweis von gelösten Bakteriensubstanzen gefunden hat. Es sei nur auf den von Wassermann und Bruck bereits in ihrer ersten Arbeit gegebenen Ausblick verwiesen, „bei der Verwendung eines hochwertigen von Tieren gewonnenen Immunserums kleinste Mengen in Körpersäften des Kranken vorhandener gelöster Bakteriensubstanzen, beispielsweise bei Meningitis in Gelenkpunktionsflüssigkeiten, und chronischen Ausflüssen aus den Genitalien bei Gonorrhoe, bei anderen Krankheiten im Serum usw., zwecks Stellung der Diagnose aufzufinden".

Gleichgültig, ob es sich nun um den Nachweis von Antigen oder Antikörpern handelt, empfiehlt es sich, bei der Komplementbindungsreaktion als hämolytisches System stets immunisatorisch erzeugte Ambozeptoren und das dazu passende Komplement zu benutzen. Von der Verwendung normaler Hämolysine ist aus dem Grunde abzuraten, weil einmal der hämolytische Titer individuell mehr oder weniger schwankt, man dann aber auch nicht weiß, ob in der gerade komplett lösenden Dosis eine Äquivalenz zwischen Ambozeptor und Komplement besteht oder nicht, die eine der beiden Komponenten im Überschuß vorhanden ist und dadurch die Bedingungen für das Zustandekommen der Komplementbindung schädigt. Man wird ferner, insbesondere bei dem Nachweis von Antigen

auch aus dem Grunde von der Verwendung normaler Hämolysine Abstand nehmen, weil indifferente Stoffe von antikomplementärer Wirkung, welche sich sowohl in den Seris als auch in den Antigenlösungen vorfinden können, bei Verwendung normaler hämolytischer Ambozeptoren, wie insbesondere UHLENHUTH gezeigt hat, eine erheblich stärkere Hemmung entfalten als bei Anwendung von Immunambozeptoren. Als hämolytisches System kommt daher an erster Stelle in Betracht Rinder- oder Hammelblut (1 ccm der 5 %igen Aufschwemmung) — inaktiviertes Serum von Kaninchen, welche mit Rinder- oder Hammelblut vorbehandelt sind (Ambozeptor) — normales Meerschweinchenserum (Komplement). Man arbeitet auf Grund der oben erörterten Erfahrungen mit kleinen Ambozeptordosen, da dann, wenn auch mehr Komplement zur kompletten Hämolyse benötigt wird, die komplementbindende Wirkung markanter in Erscheinung tritt. Es empfiehlt sich, hämolytische Immunsera von ziemlich starker Wirkung zu verwenden, und zwar soll die Ambozeptoreinheit bei den erwähnten Kombinationen höchstens 0,0025 ccm Immunserum betragen. Der Titer des hämolytischen Immunserums wird in gewöhnlicher Weise festgestellt, indem 1 ccm 5 %iger Blutaufschwemmung mit absteigenden Mengen des inaktivierten Immunserums und je 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement (Gesamtvolumen 2,1 ccm) 2 Stunden bei 37° digeriert werden. Es empfiehlt sich dann, von der minimalen komplett lösenden Ambozeptormenge das zweifache Multiplum als Testdosis zu verwenden. Während sich der Titer des Ambozeptorserums erfahrungsgemäß äußerst lange hält, muß die komplettierende Wirkung des frisch gewonnenen Meerschweinchenserums jedesmal in einem Vorversuch bestimmt werden. Man mischt zu diesem Zweck je 1 ccm 5 %iger Blutaufschwemmung mit der Testdosis des Ambozeptors (in 0,2 ccm enthalten), setzt absteigende Mengen des als Komplement fungierenden Meerschweinchenserums zu, wobei es genügt, 10fach verdünntes Meerschweinchenserum in den Mengen von 1,0—0,75—0,5—0,35—0,25—0,15—0,1 ccm zu verwenden (Gesamtvolumen 2,2 ccm). Von der sich ergebenden minimalen komplett lösenden Menge wählt man wiederum das zweifache Multiplum als Testdosis für Komplementbindungsversuche.

Nachweis von Antikörpern mittels Komplementbindung.

Was nun die Technik des Nachweises von Antikörpern betrifft, so handelt es sich darum, im Immunserum oder in einem normalen Serum, in dem Antikörper durch direkten Nachweis nicht erkannt sind, dieselben aufzudecken. Man verfährt dabei in einfachster Weise in der Art, daß man gleichbleibende Mengen Antigen mit absteigenden Mengen des zu prüfenden Serums mischt. Als Antigen können Aufschwemmungen von Erythrocyten in Betracht kommen; denn es kann sich um den Nachweis von solchen Antikörpern der Blutkörperchen handeln, welche auch unter dem Einfluß des Komplements nicht hämolytisch wirken, also Ambozeptoren, für welche die zu verwendenden Komplemente nicht dominant sind. Man mischt in diesem Falle etwa 1 ccm 5 %iger Blutaufschwemmung mit absteigenden Mengen des zu prüfenden inaktivierten Serums und fügt überall die Testdosis von Komplement hinzu. Die Gemische bleiben 1 Stunde bei 37° stehen. Dabei darf Hämolyse nicht eintreten. Sodann wird zentrifugiert, und die Abgüsse werden mit der Blutaufschwemmung der für das hämolytische System zur Verwendung gelangenden Blutart und der Testdosis des Ambozeptors nochmals bei 37° dige-

riert. War ein Antikörper in dem zu untersuchenden Serum enthalten, so wird die Hämolyse ausbleiben. Bis zu welchem Grade auf diese Weise eine Komplementbindung nachweisbar ist, wird von der Konzentration des Antikörpers abhängig sein. Im allgemeinen wird man es aber bei der Komplementbindung nicht mit zentrifugablen Antigenen zu tun haben. Das Verfahren der Komplementbindung tritt vielmehr dann in sein besonderes Recht, wenn wir Antikörper gegen gelöste Antigene, also z. B. gegenüber den Eiweißantigenen des Blutserums oder der Organextrakte, sowie gegenüber Stoffen, deren Antigennatur wir auf anderem Wege noch nicht kennen gelernt haben, nachweisen wollen. Man wird zu diesem Zwecke in analoger Weise gleichbleibende Mengen der das Antigen enthaltenden Flüssigkeit mit absteigenden Mengen des zu prüfenden Serums mischen und Komplement hinzufügen. Jedoch ergeben sich für die Determination der zu wählenden Antigenmenge doch einige Schwierigkeiten. Natürlich wird zunächst eine Forderung erfüllt werden müssen: das Antigen darf an und für sich nicht antikomplementär wirken, und zwar, um Summationswirkungen auszuschließen, auch in doppelter Menge der zur Verwendung gelangenden Dosis nicht. Aber es ist ja schon erwähnt worden, daß die Komplementbindung sowohl durch einen Überschuß von Antigen, als auch durch einen Überschuß von Antiserum aufgehoben werden kann. Es ist daher nicht möglich, allgemein eine bestimmte Antigenmenge anzugeben, welche für den Nachweis von Antikörpern mittels Komplementbindung geeignet ist. Nimmt man eine große Antigenmenge, so läuft man bei nur geringem Antikörpergehalt des Antiserums Gefahr die Antikörper durch die interferierende Wirkung des Antigenüberschusses zu übersehen. Wählt man wiederum eine geringere Antigendosis, so können bei reichem Gehalt an Antikörpern dieselben larviert werden, bei geringerem kann die verwandte Antigenmenge bereits außerhalb der Reaktionsbreite liegen. Es ist daher beim Nachweis neuartiger Antiköper mittels Komplementbindung unerläßlich, die Versuchsanordnung auf möglichst breiter Basis zu variieren. Daß man außerdem durch Parallelversuche mit dem entsprechenden Normalserum sich davon überzeugen muß, ob es sich wirklich um immunisatorisch ausgelöste Stoffe handelt, ist selbstverständlich. Natürlich ist es kaum angängig, die möglichen Variationen für die Versuchsanordnung zu erschöpfen. Es empfiehlt sich im allgemeinen Reihenversuche mit absteigenden Mengen des Antiserums anzulegen. Die zuzusetzenden Antigenmengen müssen unterhalb der an und für sich hemmenden Dosis liegen. Für das Antiserum wird eine Dosierung von 1,0—0,1 ccm der 10fachen Verdünnung meistenteils genügen. Unter Umständen werden noch Glieder der 100fachen Verdünnung anzuschließen sein. Die einzelnen Reihen dieser verschiedenen Antiserummengen werden dann mit gleichbleibenden Mengen des Antigens gemischt werden müssen, und zwar scheinen bei Verwendung von Serum als Antigen die Dosen 0,1—0,01—0,001 ccm im allgemeinen zu genügen. Im ganzen kämen also vier Reihen mit absteigenden Mengen Antiserum in Betracht, von denen die eine ohne Zusatz von Antigen zur Untersuchung gelangt. Bei andersartigen Antigenen (Extrakten etc.) wird es sich gleichfalls empfehlen, als Testdosen die als nicht antikomplementär erwiesene maximal zulässige um den $^1/_{10}$ und $^1/_{100}$ Teil derselben zunächst heranzuziehen. Lassen sich die erwarteten Antikörper nicht nachweisen, so werden feinere Gliederungen ($1—^1/_2—^1/_4—^1/_8$ etc.) noch in manchen Fällen Antikörper aufdecken können. Jedenfalls ist sehr anzuraten, bei den orientierenden Versuchen den zeitlichen Verlauf der Hämolyse zu

verfolgen, da Verzögerungen bereits wichtige Hinweise auf eine zweckentsprechende Gestaltung der quantitativen Verhältnisse geben können. Im einzelnen ist es nach dem Gesagten kaum möglich, allgemein gültige Regeln aufzustellen. Man wird von Fall zu Fall die Versuchsanordnung variieren müssen, und es muß insbesondere wegen der mehr oder weniger großen Abhängigkeit von relativen Mengen des Antigens und des Antiserums davor gewarnt werden, aus negativen Versuchsergebnissen voreilig Schlüsse zu ziehen.

Was die Antikörper gegenüber den Antigenen tierischen Ursprungs anlangt, so ist die Komplementbindungsmethode zum Nachweis derartiger Antikörper, wie schon erwähnt, zum ersten Male von Gengou benutzt worden. In der Tat lassen sich ja, wie die Erfahrungen der letzten Jahre gezeigt haben, in allen denjenigen Antiseris, welche Präzipitine enthalten, auch komplementbindende Antikörper nachweisen, und es scheint sogar die Regel zu sein, daß das Vorhandensein dieser komplementbindenden Antikörper in den mit tierischen Antigenen gewonnenen Antiseris noch allgemeiner ist, als die Gegenwart der Präzipitine. So konnten Muir und Martin im Serum von Kaninchen, die mit Meerschweinchenserum vorbehandelt waren, Präzipitine nicht auffinden, obwohl das gleiche Serum eine hochgradige Komplementbindung verursachte. Nicolle und Abt beschreiben das Vorhandensein von komplementbindenden Antikörpern im Serum der gegenüber fremdartigem Blutserum überempfindlichen Tiere. Uhlenhuth konnte auch mit einem Antiserum, das durch Linseneiweißinjektion gewonnen war, Komplementbindung erzielen und auf diese Weise außer den von ihm schon früher nachgewiesenen Präzipitinen für Linseneiweiß auch die komplementbindenden Antikörper feststellen. Ebenso konnte Uhlenhuth auch bei der kreuzweisen Immunisierung nahe verwandter Tiere (Hase-Kaninchen, Mensch-Affe) die komplementbindenden Antikörper mit großer Schärfe nachweisen.

Über den Nachweis von Antikörpern gegenüber den Eiweißbestandteilen von Anchylostoma duodenale und Ascaris lumbricoides im Serum von Individuen, welche diese Parasiten beherbegen, berichtet Ghedini. Verwiesen sei auch auf die Angaben Fleischmanns über komplementbindende Antikörper im Serum von Tieren, die mit trypsinverdautem Rinderserum vorbehandelt waren.

Wassermann und Citron haben mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion auch Fragen der Ernährungsphysiologie in Angriff genommen und insbesondere die Beziehungen des Serums zu gewissen Nährstoffen analysiert. Sie konnten im normalen Serum durch die Komplementbindung Antikörper für Albumosen, Pepton und Glykogen nachweisen. Es sei auf ihre ausführliche Besprechung der Methodik verwiesen, da deren striktes Einhalten gerade bei dem Nachweis von Antikörpern im normalen Serum eine große Rolle spielt. Es kommt im wesentlichen darauf an, daß man nicht durch die an und für sich antikomplementäre Wirkung der zu untersuchenden Stoffe getäuscht wird. Man muß dabei, wie wir das schon im allgemeinen besprochen haben, streng darauf achten, daß beim positiven Ausfall der Komplementbindung solche Dosen von dem auf Antigennatur zu untersuchenden Stoff und dem Immunserum verwandt werden, welche eine Summationswirkung als ausgeschlossen erscheinen lassen. Nur wenn es gelingt, absolut unwirksame Dosen des vermeintlichen Antigens durch Zusatz nicht hemmender Dosen des Serums komplementbindend zu machen, kann man von Anitikörpern sprechen.

Wassermann und Citron haben sich dann bemüht, immunisatorisch eine Steigerung der Antikörper gegen die erwähnten Nährsubstanzen zu erzeugen. Es gelang ihnen in der Tat, durch Immunisierung von Tieren mit Glykogen eine immunisatorische Steigerung der entsprechenden Antistoffe wahrscheinlich zu machen. Ebenso konnten sie durch Vorbehandlung mit Witte-Pepton und Hemialbumosen anscheinend eine immunisatorische Antikörperbildung erzeugen, dagegen konnte bei Versuchen mit Chapotautpepton, Peptonum puriss., Drüsenpepton und Seidenpepton eine Antigennatur mittels Komplementbindung nicht mehr ermittelt werden (vergl. auch Citron). Auch Lüdke beschreibt die Entstehung komplementbindender Antistoffe nach Injektion von Deuteroalbumosen. Zu erwähnen ist noch, daß die Versuche von Wassermann und Citron zu dem Schlusse führten, daß eine hochgradige Steigerung der gegen die Nährstoffe gerichteten komplementbindenden Antikörper nicht gelingt. Einer größeren Steigerung wird nach den Autoren durch physiologische Regulationsvorrichtungen bald ein Ende gesetzt.

Nachweis von tierischen Antigenen mittels Komplementbindung.

Soweit es sich um Antigene tierischen Ursprungs handelt, ist der Antigenennachweis mittels Komplementbindung von einer größeren Bedeutung als der Antikörpernachweis. Es handelt sich dabei nicht nur um den Nachweis, sondern auch ganz besonders um die Differenzierung der Antigene. Neisser und Sachs haben daher auch von Anfang an die Komplementbindung für die biologische Eiweißdifferenzierung empfohlen, für die bis dahin nur das Uhlenhuth-Wassermannsche Präzipitationsverfahren zur Verführung stand. Die Hauptvorzüge der Komplementbindungsmethode für die Eiweißdifferenzierung sind nun, abgesehen von der Sinnfälligkeit des Endresultats, die größere Empfindlichkeit und die größere Spezifität. Es ist ein wesentlicher Vorteil der Komplementbindungsmethode, daß man je nach dem vorliegenden Bedürfnis die Versuchsbedingungen so gestalten kann, daß das Verfahren außerordentlich empfindlich oder spezifisch arbeitet. Die größte Empfindlichkeit wird man durch Verwendung hochgradig wirksamer Antisera in möglichst großen Mengen erhalten, den höchsten Grad der Spezifität dagegen gerade bei Verwendung geringerer Antiserummengen, die eben noch hinreichen, um einen immerhin hohen Grad von Empfindlichkeit zu erzielen.

Bei der Präzipitinreaktion liegen die Verhältnisse insofern anders, als die Sichtbarkeit des Präzipitats bei einer Verminderung der Antiserummengen sehr bald erlischt. Es ist dabei praktisch gleichgültig, ob man die beiden Reaktionen für wesensgleich hält oder sie als durch völlig differente Antikörper bedingt auffaßt; Tatsache ist, daß die beiden zum Ausdruck kommenden Funktionen des Antigens und des Antiserums unabhängig voneinander sind. Durch die größere Spezifität des Komplementbindungsverfahrens, welche durch die Untersuchungen von Rickmann und Bauer erwiesen ist, ergibt sich, daß das Verfahren der Komplementbindung ganz besonders dann am Platze ist, wenn es sich um die Differenzierung von Eiweiß in Eiweißgemischen verschiedener Herkunft handelt. So konnten Sachs und Bauer in der Tat nachweisen, daß der Nachweis von Eiweißantigenen, die in relativ geringer Menge in einer anderen Eiweißlösung gelöst waren, mittels der Komplement-

bindung noch gut gelang, während das Präzipitationsverfahren dabei bereits im Stiche ließ, insofern, als die konzentriertere Eiweißart bereits allein genügte, um dieselbe Präzipitinreaktion hervortreten zu lassen. Es ergibt sich daraus, daß man das Komplementbindungsverfahren ganz besonders dann wird heranziehen müssen, wenn es sich um den Nachweis von Eiweißantigenen in einer eiweißhaltigen Lösung anderer Art handelt. Es kommt hier in Betracht der Nachweis von fremdartigen Antigenen im Blute, die Demonstration des Überganges von Eiweißantigen in das Blutserum bei der Ernährung, die Differenzierung von Nahrungseiweiß im eiweißhaltigen Urin usw. So konnte Bauer die Eiweißantigene der Kuhmilch im Blutserum eines atrophischen Säuglings mittels Komplementbindung nachweisen. Die Versuchsergebnisse von Ganghofner und Langer, welche die von Bauer empfohlene Anwendung des Komplementbindungsverfahrens zum Nachweis von artfremdem Eiweiß im Säuglingsblut beanstanden, dürften, wie bereits Bauer ausgeführt hat, durch eine unzweckmäßige Gestaltung ihrer Versuchsbedingungen veranlaßt sein. Bauer konnte das Verfahren dank seiner außerordentlichen Spezifität für die Michdifferenzierung und für den Nachweis von Milchverfälschungen mit Erfolg verwenden. Er hat nachgewiesen, daß man mittels der Komplementbindung den Zusatz von 1 ccm Kuhmilch zu einem Liter Frauenmilch einwandsfrei erkennen kann, und hält das Verfahren auch für die annähernde Bestimmung der Menge der in betrügerischer Absicht zugegossenen Milch für geeignet. Gerade für die Milchdifferenzierung soll nach den Erfahrungen Bauers die Komplementbindung durch ihre große Empfindlichkeit der Präzipitinreaktion bei weitem überlegen sein. Daß die größere Spezifität der Komplementbindung auch in der forensischen Medizin und zum Nachweis von Fleischverfälschungen im allgemeinen von Bedeutung ist, darauf werden wir noch zu sprechen kommen. Zunächst müssen wir uns jetzt mit der Anwendung der Komplementbindung für die forensische Unterscheidung verschiedener Blutarten etwas näher beschäftigen.

Nachdem die Komplementbindung für die forensische Blutdifferenzierung von Neisser und Sachs empfohlen war, haben sich eine Anzahl von Autoren mit Nachprüfungen beschäftigt, die übereinstimmend zu dem Schluß führten, daß das Komplementbindungsverfahren vor der Präzipitinreaktion den Vorzug der größeren Empfindlichkeit und der Sinnfälligkeit des Endresultats unbedingt hat (Uhlenhuth, Wassermann, Schütze, Schulz und Marx, Ehrnrooth, Friedberger und viele andere). Andererseits ist gerade der großen Empfindlichkeit der Methode ein Vorwurf in bezug auf die Verwendung in der forensischen Praxis gemacht worden. Es gründen sich diese Bedenken auf eine Mitteilung von Friedberger, der ein Antiserum beschrieb, welches sich bei der Komplementbindung ganz außerordentlich wirksam erwies, indem es menschliches Blutserum noch in einer Verdünnung von 1:1000000000 nachzuweisen erlaubte, gleichzeitig aber auch mit menschlichem Schweiß in der Verdünnung 1:10000 noch eine positive Reaktion ergab. Dieser von Friedberger beschriebene Fall wird immer wieder, besonders auch von Uhlenhuth, ins Feld geführt, obwohl eine so außerordentliche Empfindlichkeit des Antiserums offenbar ein Kuriosum darstellt. So ist es Schulz und Marx trotz besonders darauf gerichteter Bemühungen nicht gelungen, mit menschlichem Schweiß als Antigen eine Komplementbindung zu erhalten. Andererseits muß erwähnt werden, daß von Biondi auch über ein positives Ergebnis der Präzipitinreaktion bei Verwendung von Schweiß

berichtet wurde. Auch Friedberger hat von vornherein angegeben, daß diese starke Reaktionsfähigkeit des von ihm untersuchten Antiserums für die praktische Verwendung der Komplementbindung keine Rolle spielt. Sie zeigt nur, daß die Antisera vor Benutzung auf ihre Wirksamkeit geprüft werden müssen, und daß solche Antisera, welche eine so außerordentliche Empfindlichkeit aufweisen, von der Verwendung in der forensischen Praxis auszuschließen sind. Man kann aber selbst hochwertige Antisera, wie dies Friedbergdr bemerkt, dadurch für die Praxis noch geeignet machen, daß man entweder die Antiserummenge herabsetzt oder die Komplementmenge erhöht. Unter allen Umständen aber empfiehlt es sich, die für die praktischen Zwecke zu verwendenden Antisera vorher auf ihren Wert genau einzustellen. Es ist dies übrigens bei Anstellung der Präzipitinreaktion in gleicher Weise notwendig. Die präzipitierenden Sera können besonders dadurch zu bedenklichen Fehlschlüssen führen, daß sie, wenn sie hochwertig sind, in ihrer Reaktionsfähigkeit gegenüber der homologen Blutart nur so wenig die heterologe Reaktion übertreffen, daß eine Differenzierung in der Praxis ausgeschlossen ist. Ich habe selbst ein durch Injektion von Menschenblut gewonnenes präzipitierendes Serum in Händen gehabt, welches in den Blutlösungen auch fernerstehender Tierarten fast ebenso starke Reaktionen hervorrief. Natürlich ist auch der Präzipitinreaktion daraus kein Vorwurf zu machen, denn man darf, wie dies Uhlenhuth für diese, und Neisser und Sachs für die Komplementbindungsmethode stets betont haben, nur solche Antisera für die forensische Blutdifferenzierung verwenden, welche man durch Vorversuche genau analysiert hat. und die man eben kennt.

Ich muß überdies auch an dieser Stelle besonders hervorheben, daß die biologischen Methoden — Präzipitation und Komplementbindung — nicht die Anwesenheit von Blut zu diagnostisieren erlauben, sondern nur die Anwesenheit von eiweißartigen Bestandteilen bestimmter Herkunft. Sie sind eben Eiweißdifferenzierungsmethoden im Sinne Wassermanns. Der Blutnachweis muß daher, wie dies Uhlenhuth mit Recht von Anfang an betont hat, stets besonders durch die bekannten mikrochemischen oder spektroskopischen Verfahren geführt werden. Ist Blut erwiesen und fällt gleichzeitig das biologische Verfahren auf eine bestimmte Tierart, z. B. auf menschliche Bestandteile positiv aus, so ergibt sich, daß an derselben Stelle einerseits Blut, andererseits menschliche Bestandteile vorhanden sind. Daraufhin die Anwesenheit von Menschenblut zu diagnostizieren ist, wie dies Neisser und Sachs eingehend ausgeführt haben, keine wissenschaftliche Folgerung mehr, sondern ein Wahrscheinlichkeitsschluß, der je nach den näheren Umständen mehr oder weniger berechtigt sein kann. Dagegen kann man durch die biologischen Verfahren mit Sicherheit die Anwesenheit einer bestimmten Blutart ausschließen, wenn die biologischen Methoden auf Bestandteile der betreffenden Tierart negativ ausfallen. Sichere Schlüsse in bezug auf die Herkunft des Blutes als solche können also nur durch Exklusion gezogen werden. Immerhin wird die Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit einer bestimmten Blutart eine um so größere werden, wenn man nach dem Vorschlag Wassermanns die Untersuchung nicht allein auf diejenigen Stellen, an welchen die betreffenden Blutflecken sitzen, sondern auch auf die Umgebung des Fleckes, welcher frei von Blut ist, ausdehnt. Denn es ist ja anzunehmen, daß, wenn Blut und noch ein anderer eiweißhaltiger Stoff an derselben Stelle vorhanden sind, diese nicht genau die gleiche Begrenzung haben werden. Die erwähnte Vorsichtsmaßregel dürfte sich aber ebenso bei Anstellung der

Präzipitinreaktion, wie bei Ausführung der Komplementbindung empfehlen, denn beide Verfahren sind, wie gesagt, nicht Blut- sondern Eiweißdifferenzierungsmethoden. Für die gerichtliche Medizin bleibt es daher ein Desiderat, eine Methode aufzufinden, welche gleichzeitig für Blut als solches und für die Herkunft von einer besimmten Tierart spezifisch ist. Vielleicht gelingt es, durch eine quantitative Gestaltung des Komplementbindungsverfahrens, dieses Postulat zu erfüllen. Wenigstens berechtigen die Angaben von Bruck, dem es mittels der Komplementbindung gelungen ist, Affenblut und Affenspermaflecke durch schwach wirkende Immunsera zu unterscheiden, zu einiger Hoffnung. Vorläufig wird man immerhin gut tun, die Versuchsanordnung bei der Komplementbindung so zu gestalten, daß eine übermäßige Empfindlichkeit vermieden wird. Es genügt ja auch im allgemeinen, wenn die Empfindlichkeit diejenige der Präzipitinreaktion, bei der verlangt wird, daß $^1/_{10000}$ g Blut einen Ausschlag gibt, um das 10—100fache übertrifft. Die Vorteile der Komplementbindung sind dann immer noch darin gelegen, daß man ein einwandsfreies, sinnfällig leicht wahrnehmbares Resultat erhält und auch dann noch erfolgreich arbeiten kann, wenn es nicht angängig ist, die Flüssigkeiten in dem Maße zu klären, wie es für die Anstellung der Präzipitinreaktion unumgänglich notwendig ist.

Was nun die Einstellung des Antiserums für die praktischen Zwecke der Komplementbindung anlangt, so ergeben sich die einschlägigen Verhältnisse besonders aus folgenden beiden Umständen:

1. Ein Überschuß des Antiserums kann die Komplementbindung hemmen*).

2. das Antiserum kann in größeren Mengen bereits an und für sich antikomplementär wirken.

Man muß deshalb zunächst mit jedem Antiserum einen Vorversuch anstellen, indem man das Antiserum in absteigenden Mengen einmal allein, gleichzeitig in einer Parallelreihe mit einer bestimmten gleichbleibenden Menge des Antigens auf antikomplementäre Wirkung prüft. Was die zu verwendende Antigenmenge anlangt, so muß die für die forensische Praxis geltende Forderung maßgebend sein, daß man mit der Methode mindestens $^1/_{10000}$ ccm des homologen Blutserums nachweisen kann. Man verwendet daher $^1/_{10000}$ ccm Blutserum als Antigenmenge, und zwar zweckmäßig in Form von 0,2 ccm einer 2000fachen Serumverdünnung. Da die meisten Antisera erfahrungsgemäß in geringeren Mengen als 0,01 ccm eine vollständige Komplementbindung nicht mehr bedingen, genügt es, die 10fache Verdünnung des Antiserums für den Versuch heranzuziehen. Ein vollständiges Versuchsprotokoll, welches der Arbeit von Neisser und Sachs entnommen ist, möge als Beispiel dienen. Die vorhergehende Einstellung des hämolytischen Ambozeptors und des Komplements führte zur Benutzung des folgenden hämolytischen Systems:

*) Man muß bei der Erklärung der durch Serumüberschuß bedingten Hemmung der Komplementbindung auch an die von Bordet und Gay diskutierte Möglichkeit denken, daß das Serum als solches in irgend einer Weise antireaktiv wirkt und in dieser Funktion von seiner Konzentration abhängig ist. So würde beim Mischen von Antigen, Antiserum und Komplement eine Hemmung der Komplementbindung resultieren, das Komplement aber durch die bei Blut- und Ambozeptorzusatz resultierende Verdünnung die Reaktionsfähigkeit wieder erlangen.

1 ccm 5 %iges Rinderblut + 0,1 ccm des 100fach verdünnten, vom Kaninchen durch Rinderblutinjektion gewonnenen Immunserums (Ambozeptor) + 0,1 ccm Meerschweinchenserum (Komplement)*).
Zur Einstellung gelangt ein Serum, welches von Kaninchen durch Vorbehandlung mit Menschenserum gewonnen ist. Es werden zwei Versuchsreihen angestellt:

In Reihe A werden gemischt absteigende Mengen des Antiserums + je 0,2 ccm 2000fach verdünnten Menschenserums + je 0,1 ccm Meerschweinchenserum. Nach einstündigem Aufenthalt bei 37° erfolgt Zusatz von je 1 ccm 5 %igen Rinderblutes + je 0,1 ccm 100fach verdünnten Ambozeptorserums.

In Reihe B (Kontrolle) werden gemischt absteigende Mengen Antiserums + je 0,2 ccm physiologische Kochsalzlösung + je 0,1 ccm Meerschweinchenserum Nach einstündigem Aufenthalt bei 37° erfolgt Zusatz von je 1 ccm 5 %igen Rinderblutes + je 0,1 ccm 100fach verdünnten Ambozeptorserums.

Das Versuchsergebnis zeigt die folgende Tabelle:

Menge des 10fach verdünnten Antiserums in ccm	Eingetretene Hämolyse in	
	Reihe A	Reihe B
1,0	Spürchen	komplett.
0,75	Spürchen	
0,5	0	
0,35	0	
0,25	0	
0,15	Spur	
0,1	wenig	
0	komplett	

Die Tabelle zeigt, daß in diesem Fall das Antiserum an und für sich die Hämolyse nicht hemmt (Reihe B). Aus Reihe A ersehen wir, daß die Verwendung der größten Antiserumdosen zu vermeiden ist, da die Komplementbindung in den ersten Gliedern der Reihe nicht vollständig ist. Die minimale Dosis, welche noch zur vollständigen Komplementbindung ausreicht, liegt zwischen 0,025 und 0,015 ccm. Um die Empfindlichkeit der Reaktion nicht unnötig zu erhöhen und eine möglichste Spezifität zu erhalten, wählt man als Testdosis für weitere Versuche einen nicht zu großen Überschuß der minimalen noch reagierenden

*) Im allgemeinen empfiehlt es sich, für die Eiweißdifferenzierung hämolytische Ambozeptoren für Hammel- oder Rinderblut zu verwenden. Nur wenn es sich um den Nachweis von Rinder-, Hammel- oder Ziegeneiweiß handelt, kann dadurch eine Störung der Versuchsbedingungen entstehen, die allerdings praktisch im Sinne der Vortäuschung eines positiven Resultates kaum in die Wagschale fallen dürfte, da einmal die als hämolytische Ambozeptoren in Betracht kommenden geringen Mengen des Immunserums sich erfahrungsgemäß für die Komplementbindung nicht mehr eignen, dann ja aber auch erst zum Schluß zugesetzt werden. Aber es kann ein negatives Resultat dadurch vorgetäuscht werden, daß die für Rinder-, Hammel- und Ziegeneiweiß spezifischen Antisera gleichzeitig hämolytische Ambozeptoren für die entsprechenden Blutkörperchen enthalten, wodurch die Ambozeptormenge über Gebühr gesteigert wird. Es empfiehlt sich daher, in diesem Falle eine der von Neisser und Sachs angegebenen hämolytischen Kombinationen zu verwenden und zwar entweder „Meerschweinchenblut — Immunambozeptor vom Kaninchen — Kaninchenkomplement" oder die besonders empfehlenswerte Kombination „Schweineblut — Immunambozeptor von Kaninchen — Meerschweinchenkomplement".

Menge, in diesem Falle 0,03 ccm, die man, um die Flüssigkeitsmenge nicht über Gebühr zu vermehren, als 0,15 ccm der 5fachen Verdünnung für die weiteren Versuche heranziehen muß. Die meisten Antisera, die ich zu untersuchen Gelegenheit hatte, bewirkten im Verein mit $^1/_{10\,000}$ ccm des homologen Serums in der Menge 0,01—0,015 eine vollständige Komplementbindung, so daß sie in der Testdosis von 0,2 ccm der 10-fachen Verdünnung zum Gebrauch gelangen konnten. Bei einer derartigen Einstellung des Antiserums ist es nach meinen Erfahrungen so gut wie ausgeschlossen, daß man eine übermäßig gesteigerte Empfindlichkeit der Reaktion nach dem Beispiel FRIEDBERGERS erhält. Um sich aber noch zu vergewissern, daß eine derartige Empfindlichkeit nicht vorhanden ist, kann man die ermittelte Testdosis des Antiserums nun noch in der Weise prüfen, daß man sie mit absteigenden Mengen des Antigens reagieren läßt. Es wäre dabei zu verlangen, daß eine vollständige Komplementbindung höchstens bei der Benutzung von $^1/_{100\,000}$ ccm des homologen Blutserums noch eintritt, daß dagegen bei Verwendung von $^1/_{1\,000\,000}$ ccm Blutserum die Komplementbindung entweder ausbleibt oder nur partiell in Erscheinung tritt. Man verfährt zu diesem Zweck in folgender Weise: in Reihe A werden absteigende Mengen Menschenserums mit der Testdosis des Antiserums und des Komplements gemischt. Nach einstündigem Aufenthalt bei 37° erfolgt der Zusatz von Ambozeptor und Blut.

In Reihe B ist das Antiserum durch das entsprechende Volumen physiologischer Kochsalzlösung ersetzt. Ein derartiges Versuchsergebnis zeigt die folgende, wiederum der Arbeit von NEISSER und SACHS entnommene Tabelle:

Mengen des Menschenserums in ccm	Eingetretene Hämolyse in	
	Reihe A	Reihe B
0,1	0	komplett.
0,01	0	
0.001	0	
0,0001	0	
0,00001	wenig	
0	komplett	

Aus der Tabelle ergibt sich, daß einerseits das Menschenserum auch in größeren Mengen an und für sich die Hämolyse nicht hemmt, daß andererseits die Empfindlichkeit des Antiserums bei Verwendung der vorher ermittelten Testdosis nicht zu groß ist, indem bereits bei der Benutzung von $^1/_{100\,000}$ ccm Serum als Antigen die Komplementbindung nur unvollständig ist. Hat man sich über den Wirkungswert eines Serums einmal auf diese Weise orientiert, so ist es vollständig ausgeschlossen, daß die spätere Verwendung des Antiserums zu praktischen Zwecken durch eine zu große Empfindlichkeit zu Trugschlüssen führt.

In der gerichtlichen Praxis liegen nun die Verhältnisse so, daß man in der Regel keine reinen Blutlösungen für die Anstellung der Reaktion erhält, sondern als Antigen Extrakte aus den verschiedenartigsten Gegenständen benutzen muß, die neben dem ausgelaugten Blut noch Bestandteile des materiellen Substrats enthalten können. Da nun,

wie schon ausführlich erwähnt worden ist, die verschiedensten Stoffe bereits an und für sich unter Umständen antikomplementär wirken, können bei einfachem Mischen des hergestellten Extraktes mit dem Antiserum bei der Komplementbindung dadurch Trugschlüsse entstehen, daß Stoffe, welche in dem Extrakt neben den Blutbestandteilen vorhanden sind, die Hämolyse hemmen. Auf diese Fehlerquelle haben Neisser und Sachs bereits in ihren ersten Arbeiten mit Nachdruck hingewiesen, zugleich aber die Kontrollversuche angegeben, welche angestellt werden müssen, und welche mit Sicherheit einen aus dieser Fehlerquelle sich ergebenden Trugschluß unmöglich machen. Diese Kontrollversuche bestehen in folgendem:

1. Die Eiweißantigene werden durch Kochen zerstört, während die nichtspezifischen hemmenden Stoffe koktostabil sind. Handelt es sich also um die Wirkung der letzteren, so muß die hemmende Wirkung auch nach dem Kochen der Extraktlösung bestehen bleiben.

2. Die nichtspezifisch hemmenden Stoffe unterscheiden sich dadurch von den echten Antigenen, daß sie bereits an und für sich antikomplementär wirken, während die Antigene erst nach dem Zusammenwirken mit den entsprechenden Antikörpern zur komplementbindenden Funktion gelangen.

Für die Praxis empfiehlt es sich stets, den sich aus dem zweiten Umstand ergebenden Modus zu befolgen; die Komplementbindung muß also stets in zwei Parallelversuchen ausgeführt werden, indem einmal der Extrakt allein, das andere Mal der Extrakt im Verein mit dem Antiserum auf antikomplementäre Wirkung geprüft wird. Nur wenn im ersteren Falle vollständige Hämolyse, im zweiten vollständiges Ausbleiben der Hämolyse wahrzunehmen ist, liegt ein positives Versuchsresultat vor. Leider hat Uhlenhuth bei dem ersten praktischen Fall, den er mit der neuen Methode untersuchte, diese wichtige Kontrolle ausgelassen. Es ergab sich ihm erst bei nachträglicher Prüfung, daß der von ihm benutzte Extrakt an und für sich die Hämolyse hemmte. Die von ihm gezogene Schlußfolgerung, daß die Komplementbindungsmethode in der Praxis zu Fehlschlüssen führen kann, ist demnach natürlich unberechtigt, da er eben zuerst ohne Berücksichtigung der notwendigen Kontrollen arbeitete.

Es ist ein Verdienst Uhlenhuths, die nichtspezifische Hemmung durch antikomplementär wirkende Stoffe zum Gegenstand eingehender Analyse gemacht zu haben, und es hat sich dabei ergeben, daß dieser Hemmungswirkung eine wesentliche Rolle nur bei Verwendung normaler Hämolysine zukommt. Auf Grund dieser Ergebnisse ist, wie ich schon erwähnt habe, für die praktische Verwendung der Komplementbindung zu verlangen, die Hämolysine normaler Blutsera nicht in den Bereich der Untersuchung zu ziehen, sondern ausschließlich Immunambozeptoren zu verwenden. Auch Neisser und Sachs haben in Anerkennung dieser Tatsachen den von ihnen früher gemachten Vorschlag, im Interesse einer Vereinfachung der Methodik normale Hämolysine zu verwenden, zurückgezogen. Bei Befolgung dieser sich nunmehr ergebenden Konsequenzen:

1. Verwendung von hämolytischen Immunambozeptoren;

2. Kontrolle mit Verwendung der gleichen Menge des auf Antigennatur zu untersuchenden Extraktes unter Fortlassen des Antiserums, ist eine Fehldiagnose ausgeschlossen. Es kann natürlich der Fall eintreten, daß der Extrakt an und für sich ebenso stark hemmt, wie in der Kombination mit dem Antiserum. Aber auch in diesem Falle ist ein Trugschluß nicht möglich, man wird sich eben dann begnügen müssen,

ein non liquet abzugeben. Indes kann man von vornherein diesen Übelstand vermeiden, indem man nicht mit einer einzigen Menge des Extraktes arbeitet, sondern den Extrakt in absteigenden Mengen verwendet. Die zn benutzenden Mengen werden von dem vorhandenen Versuchsmaterial abhängig sein. Wenn es angängig ist, wird es sich empfehlen, die Reihe derart zu gestalten, daß jedes folgende Glied der Reihe die Hälfte der in der vorhergehenden vorhandenen Extraktmenge enthält. Nach oben hin werden ja die Reihen ohnedies nicht allzuweit ausgedehnt werden dürfen. Man wird mit Verdünnungen anfangen, die nicht zu stark rot gefärbt sind, und wenn man vorher die Präzipitinreaktion ausgeführt hat, höchstens solche Mengen für den Komplementbindungsversuch verwenden, welche eine Präzipitinreaktion eben noch erkennen lassen. Immerhin ist bei Anwesenheit von hemmenden Stoffen auch beim Arbeiten mit absteigenden Mengen der zu untersuchenden Lösung das Resultat davon abhängig, daß die nichtspezifischen hemmenden Stoffe in dem zu untersuchenden Extrakt nicht so stark konzentriert sind, daß sie auch beim Verdünnen der Lösungen nicht ausgeschaltet werden können. Dieses Extrem kommt aber in praktischen Fällen, wie dies die Erfahrungen von Wassermann sowie Neisser und Sachs zeigen, wohl gar nicht oder äußerst selten vor. Darüber können ja nur die Erfahrungen aus der Praxis entscheiden. Ich selbst bin bei der Untersuchung eines sehr reichhaltigen Materials mittels Komplementbindung dem störenden Einfluß dieser nichtspezifischen Hemmung in der forensischen Praxis noch niemals begegnet.

Sollte es sich einmal zeigen, daß der zu untersuchende Extrakt an und für sich in größeren Dosen hemmt, in kleineren aber erst im Verein mit dem Antiserum, so ist ein eindeutiger Schluß zulässig. Natürlich muß man ausschließen können, daß es sich um Summationswirkungen handelt. Solche sind aber, wenn die Kontrolle mit gleicher Extraktmenge eine antikomplementäre Wirkung nicht aufweist, bereits ausgeschlossen, wenn man die richtige Antiserumdosis für die Reaktion verwendet, d. h. eine solche, welche auch in doppelter Menge an und für sich die Hämolyse nicht hemmt. Vorsichtshalber kann man schließlich noch die Forderung aufstellen, daß die Extraktlösung auch in der doppelten Menge der die Komplementbindung ergebenden Dosis an und für sich nicht hemmen darf. Das Resultat ist zeitigstens nach zweistündigem Aufenthalt der Versuchsreihen bei 37° abzulesen. Zeitliche Hemmungen der Hämolyse sind in der Praxis ebensowenig zu berücksichtigen wie partielle Hemmungen. Bei positivem Ausfall der Reaktion muß absolutes Fehlen der Hämolyse den komplett gelösten Kontrollen gegenüberstehen.

Bei Berücksichtigung der hier gegebenen Vorschriften arbeitet die Komplementbindungsmethode zuverlässig und überaus exakt. Der positive Ausfall der Reaktion muß bei folgerichtigem Vorgehen dieselbe Beweiskraft haben wie der positive Ausfall der Präzipitinreaktion. In der Regel wird man auch einen parallelen Ausfall beider Methoden erwarten dürfen. Da indes, wie schon besprochen wurde, die Präzipitabilität der Antigene labiler ist als ihre Fähigkeit, durch Komplemenbindung zu wirken (Erwärmung!), so kann es vorkommen, daß man es mit Blutantigenen zu tun hat, welche sich nur noch durch Komplementbindung, nicht mehr durch Präzipitation nachweisen lassen. Außerdem können bei der Komplementbindung auch getrübte Antisera verwendet werden, ebenso wie eine mangelhafte Klärung der Extraktlösung ohne Belang ist.

Jedenfalls dürfte es für den gerichtsärztlichen Sachverständigen nur erwünscht sein, über ein weiteres Verfahren der Eiweißdifferenzierung zur Kontrolle und zur Ergänzung der Präzipitierungsmethode, wie Neisser und Sachs die Komplementbindung empfohlen haben, zu verfügen. Bei der oft folgenschweren Bedeutung derartiger Gutachten und der oft recht schwer zu beurteilenden Präzipitatreaktion in Extrakten aus alten Blutflecken ist es mir stets außerordentlich angenehm gewesen, die Präzipitinreaktion mittels der Komplementbindung kontrollieren zu können. Das Urteil Uhlenhuths, daß der positive Ausfall der Komplementbindungsmethode für sich allein nicht entscheidend ist, dürfte, natürlich unter der Voraussetzung, daß methodisch einwandsfrei gearbeitet wird, durch nichts gestützt sein. Die Fehlerquelle der nicht spezifischen Hemmungen hat er selbst auszuschalten gewußt, und die von ihm wiederholt ins Feld geführten Angaben Friedbergers über die übermäßige Empfindlichkeit der Reaktion spielen bei folgerichtigem Vorgehen keine Rolle und erscheinen von Seiten Uhlenhuths um so weniger stichhaltig, als er selbst seine Erfahrungen dahin resumiert, daß „die Ablenkung niemals viel weiter geht, als die makroskopisch sichtbaren Trübungen". Bei der schwerwiegenden Bedeutung des Resultats in der gerichtlichen Praxis kann man Uhlenhtuh immerhin darin beipflichten, daß der gerichtsärztliche Sachverständige sich bei differentem Ausfall der beiden Methoden des positiven Gutachtens enthalten soll. Es ist aber unter diesen Umständen niemals der Präzipitinreaktion die größere Beweiskraft zuzuschreiben. Bei positivem Ausfall der Präzipitinreaktion und negativem Ausfall der Komplementbindungsreaktion darf ein positives Gutachten meines Erachtens ebensowenig gegeben werden. Über Faktoren, welche einen positiven oder negativen Ausfall der Präzipitinreaktion vortäuschen können, sind ja auch noch nicht so zahlreiche Untersuchungen angestellt worden*). Ein auch für die Praxis unverkennbarer Vorteil der Komplementbindung ist aber auch die von Rickmann, Bauer, Sachs demonstrierte markante Spezifität. Wie Sachs und Bauer hingewiesen haben, spielt dieser Umstand besonders dann eine Rolle, wenn es sich in Gemischen mehrerer Blutarten verschiedener Konzentration um die Identifizierung des schwach konzentrierten Blutes handelt. Hier kann die Komplementbindungmethode noch in solchen Fällen erfolgreich zum Ziele führen, in denen die Präzipitinreaktion durch die Interferenz der stark konzentrierten Blutart nicht mehr anwendbar ist.

Die Schwierigkeit bei der Präzipitinreaktion ist darin gelegen, daß man, den Forderungen Uhlenhuts entsprechend, mit Blutverdünnungen von 1:1000 arbeiten muß, wenn die Methode spezifisch arbeiten soll. Ganz abgesehen davon, daß es nicht immer leicht ist, in der Praxis eine Lösung von einem derartigen Verdünnungsgrad herzustellen, ist es dann unmöglich, diese Forderung einzuhalten, wenn die Frage dahin lautet, ob an einer Stelle, an der die Anwesenheit von viel Tierblut erwartet wird, sich auch Spuren von Menschenblut befinden. Stellt man sich aus dem

---

*) Man wird Uhlenhuth darin ohne weiteres recht geben müssen, daß die Technik der Komplementbindung eine kompliziertere ist, wenn auch die Schwierigkeiten leicht überschätzt werden. Für die umständliche Versuchsanordnung wird man indes durch das klare, eindeutige Resultat entschädigt. Die Komplementbindung kann auch nur von den auf diesem Gebiete vollständig vertrauten Forschern und in den darauf eingerichteten Instituten für die Praxis ausgeführt werden. Aber auch für die Präzipitinreaktion ist diese Forderung früher von Uhlenhuth stets aufrecht erhalten worden und es wäre auch jetzt nur wünschenswert, wenn die Anstellung derart feiner biologischer Reaktionen diesen Stätten vorbehalten bliebe.

Blutfleck einen Extrakt her, der dem äußeren Anschein nach etwa einer Verdünnung von 1:1000 entspricht, so wird man das in großer Menge vorhandene Tierblut in der gewünschten Verdünnung erhalten. Spuren von Menschenblut aber werden in einer derartigen Lösung in erheblich geringerer Konzentration vorhanden sein und daher dem Nachweise entgehen können. Wählt man aber eine stärkere Konzentration des Extraktes, so ist das Tierblut wiederum so konzentriert vorhanden, daß auch dadurch allein bei Zusatz eines für Mencheneiweiß spezifischen Antiserums heterologe Trübungen entstehen können. Auf diese natürliche Grenze der Präzipitinreaktion haben Sachs und Bauer aufmerksam gemacht und zugleich den Nachweis geführt, daß unter diesen Verhältnissen das Komplementbindungsverfahren noch eine einwandsfreie Differenzierung gestattet. Diese Befunde zeigen, daß die Komplementbindung unter gewissen Bedingungen dem Präzipitationsverfahren überlegen ist. Wieweit diese durch Laboratoriumsversuche gewonnenen Erfahrungen auch für die Praxis nutzbar sind, darüber kann nur die Erfahrung entscheiden. Die einzige Möglichkeit, welche die Bedeutung dieser Befunde in der Praxis herabsetzen könnte, wäre darin gelegen, daß in den konzentrierteren, aus Blutflecken hergestellten Extrakten gleichzeitig nichtspezifische hemmende Stoffe vorhanden sind, welche das Zustandekommen einer eindeutigen Komplementbindungsreaktion verhindern. Ein Fehlschluß kann, wie schon mehrfach hervorgehoben worden ist, dadurch nicht entstehen, da die stets unbedingt anzusetzenden Kontrollen dann anzeigen, daß eine nichtspezifische Hemmung der Hämolyse vorliegt.

Gerade die Tatsache, daß die Komplementbindung den Nachweis von Eiweißantigenen in Eiweißgemischen in weiterem Maße erlaubt als die Präzipitinreaktion, dürfte die erstere Methode auch zum Nachweis von Fleischverfälschungen, insbesondere von Pferdefleisch bedeutungsvoll erscheinen lassen. Daß das Komplementbindungsverfahren, ebenso wie die Präzipitinreaktion zum Nachweis von Pferdefleischverfälschungen in Würsten etc. anwendbar ist, ist von vornherein selbstverständlich, und es hat sich dies durch die besonderen Untersuchungen von Wassermann, Schütze und Uhlenhuth ergeben. Schütze hat im besonderen den Nachweis geführt, daß das Komplementbindungsverfahren zum Nachweis von Pferdebestandteilen in gekochter Pferdewurst dem Präzipitationsverfahren überlegen ist, und empfiehlt daher die Komplementbindung in denjenigen Fällen, in welchen das Präzipitationsverfahren eine sichere Diagnose nicht zuläßt, für den Nachweis von Fleischverfälschungen.

Weidanz und Borchmann haben, wie schon erwähnt, eine Anzahl von Gewürzen und Konservierungsmitteln, welche den Fleischwaren zugesetzt sein können, auf hemmende Wirkung untersucht, und bei einem großen Teil derselben antihämolytische Funktionen aufgefunden. Inwieweit diese Störungen unter den Verhältnissen der Praxis eine Rolle spielen, läßt sich aus der Arbeit von Weidanz und Borchmann schwer entnehmen, da hinreichende Angaben darüber fehlen, ob unter den gegebenen Verhältnissen der Praxis oft Fälle vorkommen, in denen die Präzipitinreaktion ein einwandfreies Resultat ergibt, die Komplementbindung dagegen auch bei Verdünnung der Extraktlösung wegen der nichtspezifischen hemmenden Stoffe zu keinem eindeutigen Ergebnis führt. Was die vergleichenden Bestimmungen der Autoren mittels der Präzipitation und Komplementbindung bei Extrakten aus gekochten Pferdewürsten anlangt, so gab, wie ihre Tabelle zeigt, die Komplementbindungsmethode stärkere Ausschläge als die Präzipitinreaktion, wenn auch die

vollständige Hemmung der Hämolyse nicht weiter ging als die eben sichtbare Präzipitation. Es ist wohl aber sicher anzunehmen, daß man die Methode durch Verwendung geeigneter Antisera und in geeigneten Mengen erheblich empfindlicher gestalten kann als die Präzipitation, und eine etwas höhere Empfindlichkeit würde ja im Fall der Pferdefleischidentifizierung ohne die störende Bedeutung sein, welche sie in der gerichtlichen Praxis in Ausnahmefällen haben kann. Weidanz und Borchmann beschreiben allerdings einen Fall, der eine künstlich nach ihren Angaben hergestellte, Pferdefleisch und verschiedene Gewürze und Salze enthaltende Wurst betrifft, in dem die Präzipitationsmethode zu einem positiven Ausfall führte, während die Komplementbindung innerhalb derjenigen Verdünnung, die nicht mehr an und für sich hemmte, negativ ausfiel. Ob in der Praxis derartige Verhältnisse öfter vorkommen, müssen weitere Untersuchungen lehren.

Die wissenschaftlich begründete größere Spezifität der Komplementbindung muß es jedenfalls ratsam erscheinen lassen, gerade in denjenigen Fällen, in denen es sich um den Nachweis von Eiweißantigenen in Eiweißgemischen handelt, neben der Präzipitinreaktion auch das Komplementbindungsverfahren heranzuziehen. Außer den bereits erwähnten Fragestellungen dieser Art (forensische Eiweißdifferenzierung, Nachweis von Fleischverfälschungen, Nachweis von fremdartigem Antigen im Blute, Nachweis von Übergang von Nahrungsbestandteilen in den Urin, Milchdifferenzierung) sei noch erwähnt, daß die Komplementbindung in letzter Zeit auch neben der Präzipitinreaktion von Uhlenhuth, Weidanz und Angeloff zu dem wichtigen biologischen Nachweis der Herkunft von Blut in blutsaugenden Insekten herangezogen worden ist. Soviel ist sicher, daß wir in der Komplementbindung das feinste Verfahren für die Eiweißdifferenzierung zum Nachweis von Eiweißantigenen besitzen, und die Methode muß daher für alle einschlägigen Fragestellungen von besonderer Bedeutung sein.

II. Cytotoxine.

In der vorgehenden Darstellung haben unsere bisherigen Kenntnisse über das Wesen der hämolytischen Sera und die Methoden ihrer Erforschung eine eingehende Besprechung erfahren. Es erübrigt schließlich noch, darauf hinzuweisen, daß es sich bei der Bildung von Antikörpern gegenüber den roten Blutkörperchen nur um einen besonderen Fall allgemeiner Gesetzmäßigkeit handelt. Antikörper entstehen ja nicht nur nach Einführung von Erythrocyten in den fremdartigen Organismus, sondern allgemein nach der Injektion von artfremden Zellen, resp. der in ihnen enthaltenen oder aus ihnen stammenden genuinen Eiweißstoffe. Man hat für die Gesamtheit dieser antizellulären Serumstoffe, die auch normaler Weise im Blutserum vorkommen können, dem Vorgang Metschnikoffs folgend, die Bezeichnung „Cytotoxine“ gewählt. Was das Studium dieser Stoffe anlangt, so eignen sich am besten diejenigen, welche die Einwirkung von Antikörpern am sinnfälligsten wahrnehmen lassen, und dadurch haben die roten Blutzellen und ihre Antikörper von vornherein mit Recht eine Vorzugsstellung eingenommen. Die übrigen Cytotoxine teilen mit den Hämolysinen und Hämagglutininen die wesentlichen Eigenschaften und den Wirkungsmechanismus. Von einer detaillierten Besprechung kann daher abgesehen werden. Die verlockenden Probleme, welche sich auf Grund des Studiums der Cytotoxine besonders in bezug

auf die Pathogenese der Krankheiten und ihre Therapie aufgerollt haben, finden leider nicht unerhebliche Schwierigkeiten in der Tatsache, daß die Cytotoxine wohl in weitem Maße artspezifisch sind, aber nur eine sehr beschränkte quantitative Spezifität in bezug auf die Organe aufweisen.

Das Studium der direkt wahrnehmbaren Cytotoxinwirkungen im Reagenzglase muß auf diejenigen Zellarten beschränkt bleiben, die sich leicht isolieren lassen und eine Schädigung in wahrnehmbarer Weise anzeigen. Darüber ist schon im I. Bande dieses Handbuches (Antigene tierischen Ursprungs) berichtet worden. Es handelt sich im wesentlichen um folgende Zelltypen:

1. Epithelzellen (von Dungern),
2. Spermatozoen (Landsteiner, Metschnikoff),
3. Leukocyten (Metschnikoff),
4. Netzhautelemente (Hess und Römer) und
5. Corpus luteum-Zellen, die nach Lichtwitz bei Einwirkung lytischer Immunsera den Farbstoff abgeben.

Bei anderen Zellen kommt als Reaktion auf die eingetretene Schädigung oder den Zelltod noch die bereits im I. Bande beschriebene „bioskopische“ Methode von M. Neisser und Wechsberg in Betracht. Im übrigen ist man auf die Präzipitation unter Verwendung von klaren Organ- oder Zellextrakten angewiesen und in neuerer Zeit besonders auf die Komplementbindungsmethode. Daß man auch Agglutinationswirkungen an Emulsionen von Organzellen beobachten kann, haben die Untersuchungen von Michaelis und Steindorff, wenigstens für das Ricin erwiesen.

Was die Komplementbindung anlangt, so liegen die ersten den Nachweis von cytotoxischen Antikörpern betreffenden Befunde von Rehns vor. Später haben Michaelis und Fleischmann den Nachweis von Ambozeptoren gegenüber Leberzellen mittels Komplementbindung geführt. Schütze hat in ausführlichen Versuchsreihen sich bemüht, Antisera durch Vorbehandeln mit verschiedenen Organemulsionen zu erzeugen und eine Spezifität ihrer Wirkung mittels Komplementbindung zu demonstrieren. Es ist ihm aber nicht gelungen, eine Spezifität der Organantigene nachzuweisen. Auch Miller erhielt bei Immunisierungen mit Corpus luteum, die er auf Wassermanns Veranlassung unternahm, Antisera, welche sowohl auf den Extrakt aus Corpus luteum, als auch auf andere Organextrakte in artspezifischer Weise komplementbindend wirkten. Bruck dagegen ist es, wie schon erwähnt, gelungen, Blut und Sperma, resp. Eiter vom Affen mittels Komplementbindung zu unterscheiden. Eine Sonderstellung nimmt bei der Komplementbindung ebenso, wie bei der Präzipitinreaktion bisher nur das Linseneiweiß ein (Uhlenhuth, Römer), das im biologischen Sinne Spezifität in bezug auf das Organ besitzt, dabei aber nicht artspezifisch ist. Römer, dem wir ja überhaupt eine gründlich durchgeführte Anwendung der Cytotoxinforschung auf Fragen der Ophthalmologie verdanken, hat besonders in dieser biologischen Sonderstellung der Linsenbestandteile eine weitere Bestätigung für die sich ihm ergebende Auffassung gefunden, daß die cataracta senilis durch Cytotoxinwirkungen bedingt ist. Bezüglich der näheren Details sei auf die Arbeiten Römers verwiesen. Hier sei nur erwähnt, daß man, wie Römer ausführt, mittels der Komplementbindung nachweisen kann, ob das bei einer Katarakt im Kammerwasser gefundene Eiweiß aus der Linse stammt oder Bluteiweiß ist. Römer konnte ferner im Blutserum von erwachsenen Menschen Autoambozeptoren gegen die

Linsenbestandteile durch das Komplementbindungsverfahren nachweisen, während die gleichen Antikörper im fötalen Serum fehlten.

Was den Nachweis von Antikörpern gegenüber karzinomatösem Material mittels Komplementbindung anlangt, so liegen außer vereinzelten Beobachtungen (Salomon, Westenhöffer) ausgedehntere Versuchsreihen von seiten Ranzis vor. Ranzi konnte im Blutserum von Karzinomatösen Antikörper, welche im Verein mit Karzinomextrakten komplementbindend wirkten, nicht nachweisen. Durch Vorbehandeln von Kaninchen, Affe und Mensch mit Tumormaterial wurden Antisera erhalten, die aber bei der Komplementbindung nicht für Tumorgewebe spezifisch wirkten. Lüdke dagegen beschreibt das Zustandekommen einer Komplementbindung beim Mischen von Serum karzinomatöser mit Karzinomextrakt. Die Differenzen im Vergleich zu den Versuchen mit Normalserum sind allerdings so geringfügig, daß erst ausgedehnte Untersuchungen zeigen könnten, ob es sich um eine Differenz handelt, die außerhalb der individuellen Schwankungen liegt.

Bei allen denjenigen Materialien, die im Reagenzglase sich nicht nachweisen lassen, oder bei denjenigen Problemen, welche auf Fragen der Pathogenese oder der Therapie gerichtet sind, ist man beim Studium der Cytotoxine auf die Wirkungen in viro angewiesen, sei es, daß man erst am Sektionstisch pathologisch-anatomische Veränderungen der Organe kontrolliert, sei es, daß man die klinischen Erscheinungen beobachtet, resp. nach prophylaktischen oder therapeutischen Erfolgen sucht*). Auf die Fülle von Versuchen und Arbeiten, welche in dieser Richtung vorliegen, erübrigt es sich näher einzugehen, zumal die Ergebnisse wegen der mangelnden Organspezifität der Cytotoxine meist wenig eindeutig sind. Eine Reihe von vorliegenden zusammenfassenden Referaten und Arbeiten mit zahlreichen Literaturangaben ermöglichen eine leichte Orientierung (vergl. London, Lüdke, Römer, Sachs, Sata, Sobernheim, Théohari und Babes**)).

Eines besonderen Hinweises bedürfen die Beziehungen der Cytotoxine zu der Karzinomforschung. Seitdem von Dungern Cytotoxine gegenüber Epithelzellen erzeugt hatte, war die schon durch von Dungern vorgeschlagene serotherapeutische Beeinflussung der karzinomatösen Neubildungen auf eine experimentelle Grundlage gestellt. Immerhin lagen von vornherein gewichtige Bedenken vor, die sich hauptsächlich wiederum auf die mangelnde Organspezifität der Epitheliotoxine stützten. In neuerer Zeit wird allerdings die Frage viel diskutiert, ob die in der experimentellen Krebsforschung festgestellte aktiv erworbene Immunität bei Impfungen mit Karzinommaterial der gleichen Art durch Cytotoxinwirkungen veranlaßt ist. Es könnte sich dabei einmal um Entstehung von Isoantikörpern handeln. Dann käme aber auch die Bildung von Autoantikörpern in Betracht. Wenn auch die Bildung von Autoantikörpern in der Regel nicht beobachtet wurde, so liegt doch eine Angabe Métalnikoffs vor, nach welcher nach Injektion von Spermatozoen der gleichen Art Ambozeptoren entstehen, welche auch auf die Spermatozoen

*) Hingewiesen sei auch auf den neuerdings von Bayer gemachten Vorschlag, Organe vom Kaltblüter (Frosch) den Cytotoxinstudien nutzbar zu machen und die Wirkung der Cytotoxine durch die Prüfung auf elektrische Erregbarkeit zu beobachten. Bayer illustriert dies an einem Beispiel, in dem er zeigt, daß die myotoxische Wirkung des Saponins in einer Herabsetzung der elektrischen Erregbarkeit zum Ausdruck kommt und darin durch Cholesterin aufgehoben wird.

**) Besonders aufmerksam gemacht sei auch auf die inzwischen erschienene Arbeit von Fleischmann und Davidsohn mit einer vortrefflichen Literaturübersicht.

des immunisierten Tieres wirken, also den Charakter von Autoantikörpern haben. Man wird endlich an die Möglichkeit denken müssen, daß die Karzinomzellen gewissermaßen körperfremde Zellen im eigenen Organismus darstellen, etwa in dem Sinne, daß sie in einem mehr oder weniger großen Teil ihres Rezeptorenapparates von den übrigen Körperzellen differenziert sind. Dann würde sich die Bildung von Autoantikörpern ohne weiteres erklären. Es würde sich um ein Analogon der natürlicher Weise bereits in der Linse vorhandenen Verhältnisse und der künstlich von Obermayer und Pick geschaffenen Umwandlungsprodukte der genuinen Eiweißstoffe handeln. In diesem Falle würde man auch mehr Aussicht haben, von Individuen der gleichen Art durch Komplementbindung usw. nachweisbare Antikörper gegenüber Geschwulstmaterial zu erhalten, da bei Immunisierung einer andersartigen Tierspezies die artspezifischen Antikörper die speziellen antikarzinomatösen wohl überwiegen würden, während bei Immunisierung der gleichen Tierart für die Bildung der ersteren eine natürliche Schranke gesetzt ist. Indessen würde es zu weit führen, hier auf diese Fragen und den ganzen Stand der experimentellen Erforschung der Geschwülste näher einzugehen; die Übersichten von Apolant und Schöne bieten eine kritische und gründliche Orientierung.

Zum Schluß sei noch auf das von Metschnikoff inaugurierte Verfahren hingewiesen, die Cytotoxine therapeutisch als Zellstimulantien zu verwenden. Der leitende Gedanke geht davon aus, daß die in größeren Mengen zellzerstörenden und, wie sich schon aus den Untersuchungen von Belfanti und Carbone ergab, toxisch wirkenden, Hämolysine und Cytotoxine in geringen Dosen einen stimulierenden Reiz auslösen müßten. Die ersten Versuche in dieser Richtung rühren von Cantacuzène her, der den Hämolysinen in kleinen Mengen eine stimulierende Funktion auf das hämatopoetische System zuschreibt, und von Metschnikoff und Besredka, die über günstige Erfolge von Leukotoxininjektionen bei Leprakranken berichteten.

Literatur.

Die auf Vollständigkeit keinen Anspruch machende Übersicht der Literatur reicht bis zum August 1908. Es wurden im allgemeinen nur diejenigen Arbeiten berücksichtigt, welche sich auf Hämolysine und Antikörper der von höheren Tieren stammenden Antigene beziehen. Von den sich mit bakteriziden Antikörpern beschäftigenden Arbeiten sind nur einige aufgenommen, welche in theoretischer Hinsicht auch für die hier interessierenden Fragen wichtig erschienen. — Es sei auch darauf hingewiesen, daß ein Teil der einschlägigen Arbeiten bereits bei der Besprechung der Antigene tierischen Ursprunges im ersten Bande dieses Handbuches angeführt ist.

I. Zusammenfassende und lehrbuchartige Darstellungen über Hämolysine, Cytotoxine und verwandte Gebiete, unter besonderer Berücksichtigung der mit ausgiebigen Literaturangaben versehenen Arbeiten.

1) Apolant, H., Die experimentelle Erforschung der Geschwülste. Kolle-Wassermann, Handbuch der pathog. Mikroorganismen 1906, Ergänzungsbd. I, Heft 2.
2) Arrhenius, S., Immunochemie. Leipzig 1907. Akad. Verlagsgesellschaft.
3) Ders., Immunochemie. Asher-Spiros Ergebnisse der Physiologie. Wiesbaden 1908, 7. Jahrg.
4) Aschoff, L., Ehrlichs Seitenkettentheorie und ihre Anwendung auf die künstlichen Immunisierungsprozesse. Jena 1905. G. Fischer.
5) Dieudonné, A., Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie. Leipzig 1905, 4. Aufl.
6) Dungern, E. v., Die Antikörper. Jena 1903. (Enthält zu einem wesentlichen Teil eigene Versuchsergebnisse.)

7) Ehrlich, P., On Immunity with special reference to cell-life. Croonian Lecture, Proc. of the Royal Soc. 1906, Vol. LXVI.
8) Ders., Schlußbetrachtungen. Nothnagel, Spezielle Path. und Ther. 1901, Bd. VIII.
9) Ders., Die Schutzstoffe des Blutes. Deutsche med. Wochenschr. 1901.
10) Ehrlich, P. und Morgenroth, J., Wirkung und Entstehung der aktiven Stoffe im Serum nach der Seitenkettentheorie. Kolle-Wassermann, Handbuch der pathog. Mikroorganismen 1904, Bd. IV, I. Teil. Jena.
11) Friedberger, E., Die bakteriziden Sera. Ebenda 1904, Bd. IV, I. Teil. Jena.
12) Jacoby, M., Immunität und Disposition und ihre experimentellen Grundlagen. Wiesbaden 1906.
13) Levaditi, C., La nutrition dans ses rapports avec l'immunité. Paris 1904.
14) London, E. S., Der gegenwärtige Stand der Lehre von den Cytolysinen und die cytolytische Theorie der Immunität. Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII, 1. Abteil. Originalbd.
15) Lüdke, H., Über Cytotoxine mit besonderer Berücksichtigung der Ovariotoxine und Thyreotoxine. Münchener med. Wochenschr. 1905.
16) Metschnikoff, E., Les toxines des cellules (Cytotoxines). Archives russes de Pathol. 1899.
17) Ders., Les cytotoxines. Revue générale des sciences 1901.
18) Ders., L'Immunité dans les maladies infectieuses. Paris 1901. Masson & Cie. Deutsche Übersetzung: G. Fischer, Jena 1902.
19) Michaelis, L., Die Bedeutung der Präzipitine, Hämolysine und Cytotoxine für die Klinik. Die deutsche Klinik am Eingange des 20. Jahrhunderts, 1905, Bd. XI.
20) Müller, P. Th., Vorlesungen über Infektion und Immunität. Jena 1904.
21) Ricketts, H. T., Infection, Immunity and Serumtherapy. Chicago 1906.
22) Römer, P., Die Ehrlichsche Seitenkettentheorie und ihre Bedeutung für die medizinischen Wissenschaften. Wien 1904.
23) Sachs, H., Die Hämolysine und ihre Bedeutung für die Immunitätslehre. Lubarsch-Ostertags Ergebnisse der pathol. Anat. 7. Jahrg., auch separat erschienen. Wiesbaden 1902. J. F. Bergmann.
24) Ders., Die Cytotoxine des Blutserums. Biochemisches Centralbl. 1903, Bd. I.
25) Ders., Die Hämolysine und die cytotoxischen Sera. Lubarsch-Ostertags Ergebnisse der pathol. Anat., 11. Jahrg., auch separat erschienen, Wiesbaden 1907. J. F. Bergmann.
26) Schöne, G., Die Beziehungen der Immunitäsforschung zur Lehre von den Geschwülsten. Weichardts Jahresbericht über d. Ergebn. d. Immunitätsforschung 1908, Bd. II.
27) Sobernheim, G., Die Lehre von der Immunität und von den natürlichen Schutzvorrichtungen des Organismus. Krehl-Marchands Handb. d. allgem. Pathol. 1908, Bd. I.
28) Vaughan, V. C. und Novy, F. G., Cellular toxins or the chemical factors in the causation of disease. Philadelphia und New York 1902.
29) Wassermann, A., Hämolysine, Cytotoxine und Präzipitine. Volkmanns Sammlung klin. Vorträge 1902, Serie 12, Nr. 331.

II. Originalarbeiten*).

30) Abbot, A. C., und Bergey, Der Einfluß der Alkoholvergiftung auf die bei der Hämolyse beteiligten Faktoren. Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. 32.
31) Arrhenius, S., Die Anwendung der physikalischen Chemie auf die Serumtherapie. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1904, Bd. XX.
32) Ders., Die Anwendung der physikalischen Chemie auf die serotherapeutischen Fragen. Boltzmann-Festschrift 1904.
33) Ders., Die Serumtherapie vom physikalisch-chemischen Standpunkt. Zeitschr. für Elektrochemie 1904, 10. Jahrg.
34) Ders., La Chimie physique dans ses rapports avec la sérothérapie. Bulletin de l'Institut Pasteur 1904, Tome II.
35) Ders., Versuche über Hämolyse. Meddelanden fran K. Vetenskapskademiens Nobelinstitut 1908, Bd. I, Nr. 10 und Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. 11.

---

*) Die in den Jahren 1899—1903 erschienenen Arbeiten der Ehrlichschen Schule sind auch gesammelt erschienen: P. Ehrlich, Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung. Berlin 1904. A. Hirschwald. Ins Englische übersetzt von Ch. Bolduan: Collected Studies on Immunity 1906, New York.

36) Arrhenius, S. und Madsen, Th., Anwendung der physikalischen Chemie auf auf das Studium der Toxine und Antitoxine. Zeitschr. für physikal. Chemie 1903, Bd. XLIV.
37) Ascoli, G., Über hämolytisches Blutplasma. Deutsche med. Wochenschr. 1902, Nr. XLI.
38) Ascoli, M., Isoagglutinine und Isolysine menschlicher Blutsera. Münchener med. Wochenschr. 1901.
39) Ascoli, M. und Riva, A., Über die Bildungsstätte der Lysine. Ebenda 1901.
40) Bail, O., Versuche über Typhusagglutinine und Präzipitine. Arch. für Hygiene 1902, Bd. XLII.
41) Bang, J. und Forssmann, J., Untersuchungen über die Hämolysinbildung. Vorläufige Mitteilung. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XL.
42) Dies., Untersuchungen über die Hämolysinbildung. Hofmeisters Beiträge zur chemischen Phys. und Path. 1906, Bd. VIII.
43) Battelli, F., l'Hémolysine in vivo chez les animaux normaux. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1904, Tome LVI.
44) Bauer, J., Über den Nachweis der präzipitablen Substanz der Kuhmilch im Blute eines atrophischen Säuglings. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 22.
45) Ders., Über die Spezifität der biologischen Eiweißdifferenzierung. Arbeiten aus dem Kgl. Institut für exper. Therapie zu Frankfurt a. M., Heft 3. Jena 1907.
46) Ders., Über biologische Milchdifferenzierung. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 16.
47) Ders., Über die bei der Wassermannschen Luesreaktion wirksamen Körper und über die hämolytischen Eigenschaften der Organextrakte. Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. X.
48) Baumgarten, P. v., Mikroskopische Untersuchungen über Hämolyse in heterogenem Serum. Berliner klin. Wochenschr. 1901.
49) Ders., Weitere Untersuchungen über Hämolyse in heterogenem Serum. Ebenda 1902.
50) Ders., Ergebnisse der osmologischen Forschung über Hämolyse. Zikels osmologische Pathol. und Ther. 1905.
51) Ders., Mikroskopische Präparate zur osmologischen Forschung über Hämolyse. Ebenda 1905.
52) Ders., Die Hämolyse im heterogenen bzw. Immunserum. Arbeiten aus dem pathol. Institut zu Tübingen 1905, Bd. V, Heft 2.
53) Ders., Die osmologische Auffassung der Hämo- und Bakteriolyse. Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. XI.
54) Bayer, G., Zur Technik der Cytotoxinuntersuchung. Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLV, 1. Abteil. Originalbd.
55) Belfantie, S. und Carbone, T., Produzione di sostanze tossische nel siere di animali inoculati con sangue eterogeneo. Giornale della R. Acad. di Med. di Torino 1898.
56) Bellei, G., Hämolyse durch Blutplasma und Blutserum. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 4.
57) Bentivenga, e, Carini, Lo Sperimentale 1900, Bd. LIV.
58) Bergel, S., Über hämolytische Wirkungen des Fibrins. Deutsche med. Wochenschrift 1908, Nr. 9.
59) Bergmann, G. v. und Keuthe, W., Die Hemmung der Hämolyse durch inaktivierte menschliche Sera. Zeitschr. für experim. Pathol. und Ther. 1906, Bd. III.
60) Bergmann, G. v. und Savini, E., Das hämolytische Hemmungsphänomen bei Phosphorvergiftung und anderen pathologischen Prozessen. Zeitschr. für experim. Pathol. und Ther. 1907, Bd. IV.
61) Bertarelli, E., Über aktive und passive Immunisation der Neugeborenen und Säuglinge auf dem Wege der Verdauungsorgane. Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXIX.
62) Besredka, Les antihémolysines naturelles. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV.
63) Blank, D., Zur Frage der Agglutination der menschlichen roten Blutkörperchen. Inaug.-Diss. Zürich 1907.
64) Bordet, J., Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le sérum d'animaux injectés de sang défibriné. Ann. de l'Inst. Pasteur 1898, Tome XII.
65) Ders., Le mécanisme de l'agglutination. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII.
66) Ders., Agglutination et dissolution des globules rouges par le sérum. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII.
67) Ders., Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. Ebenda 1900, Tome XIV.
68) Ders., Sur le mode d'action des sérums cytolytiques et sur l'unité de l'alexine dans un même sérum. Ebenda 1901, Tome XV.

69) Bordet, J., Mode d'action et origine des substances actives des sérums préventifs et des sérums antitoxiques. Compt. rend. du 13. Congrès international d'Hyg. et de démographie. Brüssel 1903.
70) Ders., Les propriétés des antisensibilisatrices et les théories chimiques de l'immunité. Ann. de l'Inst. Pasteur 1904, Tome XVIII.
71) Ders., Bemerkungen über die Antikomplemente. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 1.
72) Bordet, J. und Gay, F. P., Sur les relations des sensibilisatrices avec l'alexine. Ann. de l'Inst. Pasteur 1906, Tome XX.
73) Dies., L'absorption de l'alexine et le pouvoir antagoniste des sérums normaux. Ann. de l'Inst. Pasteur 1908, Tome XXII, Nr. 8.
74) Bordet, J. und Gengou, O., Sur l'existence des substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV.
75) Brand, E., Über das Verhalten der Komplemente bei der Dialyse. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 34.
76) Brezina, Zur Frage der Bildungsstätte der Antikörper. Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 35.
77) Ders., Über Konkurrenz der Antikörper. Münch. med. Wochenschr. 1907. Nr. 28.
78) Browning, C. H., Agglutination und Komplementschwund. Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 15.
79) Browning, C. H., und Sachs, H., Über Antiamozeptoren. Berliner klin. Wochenschrift 1906, Nr. 20 und 21.
80) Bruck, C., Die biologische Differenzierung von Affenarten und menschlichen Rassen durch spezifische Blutreaktion. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 26.
81) Ders., Zur forensischen Verwertbarkeit und Kenntnis des Wesens der Komplementbindung. Ebenda 1907, Nr. 47.
82) Buchner, H., Untersuchungen über die bakterienfeindlichen Wirkungen des Blutes und Blutserums. Arch. für Hyg. 1890, Bd. X.
83) Ders., Weitere Untersuchungen über die bakterienfeindlichen und globuliziden Wirkungen des Blutserums. Ebenda 1893, Bd. XVII.
84) Ders., Zur Kenntnis der Alexine, sowie der spezifisch bakteriziden und spezifisch hämolytischen Wirkungen. Münchener med. Wochenschr. 1900.
85) Ders., Sind die Alexine einfache oder komplexe Körper? Berliner klin. Wochenschrift 1901, Nr. 33.
86) Bulloch, W., Über die Beziehung zwischen Hämolysis und Bakteriolysis. Centralbl. für Bakt. 1. Abteilung, 1901, Bd. XXIX.
87) Busse, W., Über die Beeinflussung des hämolytischen Komplements durch Injektion leukozytoseerregender Mittel (Hetol und Hefe-Nukleinsäure). Centralbl. für Bakt. 1. Abt. Org. 1908, Bd. XLVII, Heft 3.
88) Buxton, B. H., Bacteriolytic power of immune serum and the theory of complement diversion. The Journal of Medical Research 1905, Vol. 13.
89) Camus, J. und Pagniez, P., Variabilité de l'alexine dans les sérums pathologiques. Existence d'une substances antihémolysante dans le sérum humain. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1901.
90) Dies., Action glubulicide des urines. Journ. de Physiol. et de pathol. générale 1901, Tome III.
91) Dies., Untersuchungen über die hämolisierende und agglutinierende Eigenschaft des menschlichen Serums Arch. internat. de Pharmaco-dynamie et de Thérapie 1903, Bd. X.
92) Camus, L. und Gley, E., Recherches sur l'action physiologique du sérum d'anguille. Arch. internat. de Pharmaco-dynamie 1898, Bd. V.
93) Dies., Nouvelles recherches sur l'immunité contre le sérum d'anguille. Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII.
94) Dies., A propos de l'existance dans un sérum sanguin d'une action antagoniste de l'action hémolytique. Compt. rendus de la Soc. de Biol. 1901, Tome LIII.
95) Cantacuzène, J., Sur les variatons quantitatives et qualitalites des globules rouges. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XIV.
96) Cernovodeanu, P., Etudes de l'hémolyse produite par des mélanges des sérums normaux. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1907, Tome LXI.
97) Dies., Etudes quantitatives de l'action hémolytique des mélanges des sérums. Comparaison avec l'action de l'antitoxine sur la toxine. Ebenda 1907, Tome LXI.
98) Cernovodeanu, P. und Henri, V., Etudes de l'hémolyse des hématies de poule par le sérum de chien. Influence de la dilution et du mode d'addition des globules. Ebenda 1905, Tome LVIII.
99) Dies., Etudes de l'hémolyse produite par des mélanges des sérums. Ebenda 1905, Tome LVIII.

100) Cernovodeanu, P. und Henri, V., Etudes de l'hémolyse des globules de cheval par les sérums de chien et de poule. Ebenda 1905, Tome LVIII.
101) Dies., Etudes de l'absorption de l'hemolysine du sérum die chien par les hématies de poule. Ebenda 1905, Tome LVIII.
102) Dies., Différence entre le sérum chauffé à 56° et le serum normal; critique des théories qui admettent l'existence des alexines. Ebenda 1905, Tome LVIII.
103) Dies., Activation du pouvoir hémolytique des certains sérums par les sels de magnésium. Ebenda 1906, Tome LX.
104) Citron, J., Über Komplementbindungsversuche bei infektiösen und postinfektiösen Erkrankungen (Tabes dorsalis usw.), sowie bei Nährstoffen. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 29.
105) Ders., Demonstration einer neuen Methode zur Serodiagnostik der Lues. Berliner klin. Wochenschr. 1908, pag. 469.
106) Cler, E. und Defalle, W., Recherches sur la pluralité des alexines. Giorn. d. R. Accad. de Med. di Torino 1904, Fol. LXVII.
107) Creite, Versuche über die Wirkung des Serumeiweißes nach Injektion in das Blut. Zeitschr. für ration. Med. 1869. Bd. XXXVI.
108) Daremberg, De l'action destructive du sérum du sang. Arch. de Méd. experiment. et d'anatomie-pathologique 1891.
109) Dautwitz, F., und Landsteiner, K., Über Beziehungen der Lipoide zur Serumhämolyse. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiologie u. Pathologie 1907, Bd. IX.
110) Delezenne, C., Contribution a l'etude des sérums antileucocytaires. Compt. rend. de l'Académie des Sciences 1900, Tome CXXX.
111) Ders., Action du suc pancréatique et du suc intestinal sur les hématies Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1903, Tome LV.
112) Deutsch, L., Die forensische Serumdiagnose des Blutes. Centralbl. für Bakt. 1. Abt. 1901, Bd. XXIX.
113) Dieudonné, A., Über das Verhalten des Bacterium coli zu nativem und denaturiertem Eiweiß. Hygien. Rundschau 1902, Nr. 18.
114) Dömeny, P., Stammt die wirksame Substanz der hämolytischen Blutflüssigkeiten aus dem mononukleären Leukocyten? Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 40.
115) Donath, J., Zur Kenntnis der agglutinierenden Fähigkeiten des menschlichen Blutserums. Wiener klin. Wochenschr. 1900.
116) Donath, J. und Landsteiner, K., Zur Frage der Makrocytase. Wiener klin. Rundschau 1902, Nr. 40.
117) Dies., Über antilytische Sera und die Entstehung der Lysine. Zeitschr. für Hygiene 1903, Bd. XLIII.
118) Dies., Über paroxysmale Hämoglubinurie. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 36.
119) Dies., Über paroxysmale Hämoglobinurie. Zeitschr. für klin. Med. 1905, Bd. LVIII.
120) Dies., Weitere Beobachtungen über paroxysmale Hämoglobinurie. Centralbl. für Bakt. 1907, 1. Abt. Orig.-Bd. XLV.
121) Dorner, G., Experimentelle Beiträge zur Kenntnis der Hämolysine. Inaug.-Diss. Königsberg 1905.
122) Dungern, E. v., Globulizide Wirkungen des tierischen Organismus. Münchener med. Wochenschr. 1899.
123) Ders., Spezifisches Immunserum gegen Epithel. Ebenda 1899.
124) Ders., Beiträge zur Immunitätslehre. Ebenda 1900, Nr. 20.
125) Ders., Beiträge zur Immunitätslehre. II. Ebenda 1900, Nr. 28.
126) Dungern, E. v. und Coca, Spezifische Hämolyse der durch Osmium fixierten Blutkörperchen. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. XLVI.
127) Dies., Über Hämolyse durch Kombinationen von ölsaurem Natrium, Ölsäure, Kieselsäure und Serum. Ebenda 1908, Nr. 7.
128) Dies., Über Hämolyse durch Schlangengift. II. Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. XII, Heft 5 u. 6.
129) Eason, J., Paroxysmal Haemoglobinuria; the production of an antitoxin. Journ. of Path. and Bact. 1906, Vol. XI.
130) Ehrlich, P., Die Seitenkettentheorie und ihre Gegner. Vortrag im Verein für innere Medizin, 16. Dez. 1901. Ref. in Münchener med. Wochenschrift 1901, Nr. 52.
131) Ders., Betrachtungen über den Mechanismus der Ambozeptorwirkung und seine teleologische Bedeutung. Koch-Festschrift, Jena 1903.
132) Ehrlich, P., und Marshall, H. T., Über die komplementophilen Gruppen der Ambozeptoren. Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 25.

133) EHRLICH, P. und MORGENROTH, J., Zur Theorie der Lysinwirkung. Ebenda 1899, Nr. 1.
134) Dies., Über Hämolysine. 2. Mitteilung. Ebenda 1899, Nr. 22.
135) Dies., Über Hämolysine. 3. Mitteilung. Ebenda 1900, Nr. 21.
136) Dies., Über Hämolysine. 4. Mitteilung. Ebenda 1900, Nr. 31.
137) Dies., Über Hämolysine. 5. Mitteilung. Ebenda 1901, Nr. 10.
138) Dies., Über Hämolysine. 6. Mitteilung. Ebenda 1901, Nr. 21/22.
139) EHRLICH, P., und SACHS, H., Über die Vielheit der Komplemente des Serums. Ebenda 1902, Nr. 14 u. 15.
140) Dies., Über den Mechanismus der Ampozeptorenwirkung. Ebenda 1902, Nr. 21.
141) Dies., Über den Mechanismus der Antiambozeptorwirkung. Ebd. 1905, Nr. 19 u. 20.
142) EHRNROOTH, E., Über die praktische Bedeutung der Alexinfixation (Komplementablenkung) für die forensische Blutdifferenzierung. Vierteljahrsschr. für gerichtl. Med. u. öffentl. Sanitätswesen, 3. Folge, 1906, Bd. XXXII.
143) EISENBERG, PH., Über Isoagglutinine und Isolysine in menschlichen Seris. Wiener klin. Wochenschr. 1901, Nr. 42.
144) EISENBERG, PH. und VOLK, R., Untersuchungen über die Agglutination. Ebenda 1901, Nr. 50 und Zeitschr. für Hygiene 1902, Bd. XXXIV.
145) EISLER, M. v., Ist die Hämagglutination und Hämolyse, durch Rizin und Hämolysin hervorgerufen, eine Säurewirkung? Centralbl. für Bakt. 1908, 1. Abt. Orig.-Bd. XLVI, Heft 4.
146) FALLOISE, A., Sur l'existence de l'alexine hémolytique dans le plasma sanguin. Bull. de l'Académie Royale de Belgique (Classe de Sciences) 1903, Nr. 6.
147) Ders., Sur l'existence de l'alexine hémolytique dans le plasma sanguin. II. Ebenda 1905, Nr. 5.
148) FALLOISE, A. und DUBOIS, A., Hyperleucocytose et pouvoir cytotoxique du sérum sanguin. Arch. intern. de physiol. 1904, Tome II.
149) FAMULENER, L. W. und MADSEN, TH., Die Abschwächung der Antigene durch Erwärmung. Biochemische Zeitschr. 1908, Bd. XI, Heft 1—3.
150) FAUST und TALLQUIST, Über die Ursache der Bothriocephalusanämie. Arch. für exper. Path. 1907, Bd. LVII.
151) FERRATA, A., Die Unwirksamkeit der komplexen Hämolysine in salzfeien Lösungen und ihre Ursache. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 13.
152) FLEISCHMANN, P. Über die präzipitinogene Eigenschaft trypsinverdauten Rinderserums. Zeitschr. für klin. Med. 1906, Bd. LIX.
152a) FLEISCMANN, P. und DAVIDSOHN, H., Über Cytotoxine. Folia Serologica 1908, Bd. I.
153) FLEISCHMANN, P. und MICHAELIS, L., Über experimentell in vivo erzeugten Komplementschwund. Medizinsche Klinik, 1906, Nr. 1.
154) FLEXNER, S. und NOGUCHI, H., Snake venom in relation to häemolysis, bacteriolysis and Toxicity. The Journ of Exper. Med. 1903, Vol. VI, Nr. 3.
155) Dies., The constitution of snake venom and snake sera. University of Penna. Med. Bulletin 1902, November.
156) Dies., On the plurality of cytolysins in snake venom. Ebenda 1903, Juli-August.
157) Dies., On the plurality of cytolysins in normal blood serum. Ebenda 1903, Juli/August.
158) FORD, W. W., Beitrag zur Lehre von den Hämagglutininen. Zeitschr. für Hygiene 1902, Bd. XL.
159) FORSSMANN, J., Sind das Antigen und die ambozeptorfixierende Substanz der Blutkörperchen identisch oder verschieden? Biochemische Zeitschr. 1908, Bd. IX, Heft 3 u. 4.
160) FREI, W., Zur Theorie der Hämolyse. Inaug.-Diss., Zürich, Berlin 1907 Richard Schötz.
161) FRIEDBERGER, E., Über den Übergang von Blutkörperchen agglutinierenden Substanzen in den Urin. Berliner klin. Wochenschr. 1900.
162) Ders., Ein Beitrag zur Wirkungsweise lytischer Immunkörper. (Ambozeptoren.) Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVII.
163) Ders., Der Einfluß der Verankerung des lytischen Ambozeptors auf die Zelle. Arch. für Hygiene 1906, Bd. LV.
164) Ders., Zur forensischen Eiweißdifferenzierung auf Grund der hämolytischen Methode mittels Komplementablenkung, nebst Bemerkungen über die Bedeutung des Präzipitates für dieses Phänomen. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 15.
165) Ders., Über Haltbarmachung der Komplemente. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. XLI.
166) Ders., Über das Verhalten der Komplemente in hypertonischen Salzlösungen. Centralbl. für Bakt. 1908, 1. Abt. Orig.-Bd. XLVI, Heft 5.

167) Friedberger, E. und Bezzola, C., Über cytolyseverstärkende Wirkung präzipitierender Sera. Centralbl. für Bakt. 1908, Bd. XLVI, Heft 5.
168) Friedberger, E. und Dorner, Über die Hämolysinbildung durch Injektion kleinster Mengen von Blutkörperchen und über den Einfluß des Aderlasses auf die Bildung hämolytischer Ambozeptoren beim Kaninchen. Ebenda 1905, Bd. XXXVIII, H. 5.
169) Friedberger, E. und Moreschi, C., Über die Antiambozeptoren gegen die komplementophile Gruppe des Ambozeptors. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 31.
170) Dies., Über hämolysebeschleunigende Immunsubstanzen. Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLV, H. 4.
171) Friedberger, E. und Seelig, A., Zur Hämolyse bei den Kaltblütern. Ebenda 1908, Bd. XLVI, H. 5.
172) Friedemann, M. und Sachs, F., Untersuchungen über die Seifenhämolyse unter besonderer Berücksichtigung der Beziehungen zwischen den Seifen und den komplexen Hämolysinen des Blutserums. Biochemische Zeitschr. 1908, Bd. XII.
173) Friedemann, U., Über ein komplexes Hämolysin der Bauchspeicheldrüse. Deutsche med. Wochenschrift 1907, Nr. 15.
174) Friedenthal, H., Über einen experimentellen Nachweis von Blutsverwandtschaft. Arch. für Anat. u. Physiol., physiol. Abt. 1900.
175) Frouin, A., Action antihémolytique des émulsions d'huile. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908, Tome LXIV, Nr. 21.
176) Fuhrmann, F., Über die Abnahme der Lysinwirkung alter Lysinsera. Sitzungsberichte der K. Akademie der Wissenschaften in Wien, Mathematisch-naturwissenschaftl. Klasse, 1903. Bd. CXII, Abt. 3, Okt.
177) Ders., Über Präzipitine und Lysine. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 1903, Bd. III.
178) Fukuhara, Y., Über die toxischen und hämolytischen Wirkungen der Organautolysate. Zeitschr. für exper. Pathol. u. Therap. 1907, Bd. IV.
179) Fuld, E., Zur Theorie und Technik des sogenannten Morgenroth-Versuches. Biochemische Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 60.
180) Ganghofner und Langer, Über die Verwertbarkeit des Phänomens der Komplementablenkung zum Nachweis von artfremdem Eiweiß im Blute. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 47.
181) Gareis, H., Über die Bildung von Hämolysinen im Serum mit Blut gefütterter Tiere. Inaug.-Diss. Königsberg 1902.
182) Gay, F. P., Observations on the single nature of haemolytic immune bodies and on the existence of so-called „complementoids". Centralbl. für Bakt. 1. Abt. Orig. 1905, Bd. XXXIX.
183) Ders., The fixation of alexines by spezific serum precipitates. Ebenda 1905, Bd. XXXIX.
184) Ders., La déviation de l'alexine dans l'hémolyse. Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, Tome XXII.
185) Ders., So-called „Complementoids". Centralbl. für Bakt. 1906, 1. Abt. Orig.-Bd. XL.
186) Ders., Alexic activity of the blood serum of cadavers. The Journ. of Med. research 1907, Vol. XVII; New Series, Vol. XII, Nr. 3.
187) Gay, F. P. und Ayer, J. B., The demonstration of the alexic activity of human blood serum. Ebenda 1907.
188) Gengou, O., Sur les sensibilisatrices des sérums actifs contre les substances albuminoides. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Tome XVI.
189) Ders., Recherches sur l'agglutination des globules rouges par les précipités chimiques et sur la suspension de ces précipités dans les milieux colloidaux. Ebenda 1904, Tome XVIII.
190) Ders., De l'action empêchante du citrate de soude sur l'hémolyse par le sérum d'anguille. Compt. rend. de la Soc. de Biol 1907, Tome LXII.
191) Ghedini, G., Anticorpi elmintiasi nel siero di sangue di individui affetti da elmintiasi. Anticorpi anchylostomiaci e ascaridei. Nota III, Gaz. d. Osp. 1907.
192) Girard-Mangin und Henri, V., Etude du phénomène d'agglutination. I—X. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1904, Tome LVI u. LVII.
193) Gonssef, G., Du dosage des alexines dans les sérums des personnes saines et malades Thèse de Kasan 1902. Russisch. Ref. im Bull. de l'Inst. Pasteur 1903, Tome I.
194) Grixoni, L'agglutinazione del sangue malarico. Gazz. d. Osp. 1901, Nr. 57. Ref. in Centralbl. für innere Med. 1901, Nr. 38.

195) Gruber, M., Zur Theorie der Antikörper. II. Über Bakteriolyse und Hämolyse. Münchener med. Wochenschr. 1901, Nr. 48 u. 49.
196) Ders., Protokoll der k. k. Gesellschaft der Ärzte in Wien. Sitzung vom 6. Dez. 1901. Wiener klin. Wochenschr. 1901, Nr. 50.
197) Ders., Wirkungsweise und Ursprung der aktiven Stoffe in den präventiven und antitoxischen Seris. Ebenda 1903, Nr. 40. Vergl. auch Bericht des Internationalen Kongresses für Hygiene in Brüssel 1903.
198) Ders., Über die Wirkung bakterizider Immunsera. Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 15.
199) Ders., Die Ambozeptorentheorie und der Kälteveruch von Ehrlich und Morgenroth. Ebenda 1904, Nr. 2.
200) Grünbaum, Agglutination of red corpuscles. The Brit. Med. Journ. 1900.
201) Haendel, Über Komplementbindung durch hämolytische Ambozeptoren bei 0°. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1908, Bd. XXVIII, H. 3.
202) Ders., Über Komplementablenkung durch Antivibrionen- und Antierythrocytensera. Ebenda 1908, Bd. XXVIII, H. 3.
202a) Hahn, M. und Trommsdorff, R., Zur hämolytischen Wirkung des normalen Menschenserums. Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 35.
203) Halban, J., Agglutinationsversuche mit mütterlichem und kindlichem Blute. Wiener klin. Wochenschr. 1900.
204) Halban, J. und Landsteiner, K., Über Unterschiede des fötalen und mütterlichen Blutserums und über eine agglutinations- und fällungshemmende Wirkung des Normalserums. Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 12.
205) Halpern, M., Zur Frage über die Hämolysine im menschlichen Serum. Münchener med. Wochenschr. 1902.
206) Hecker, R., Beiträge zur Kenntnis der hämolytischen Komplemente. Arbeiten aus dem Institut für exper. Ther. zu Frankfurt a. M., H. 3., Jena 1907.
207) Hedinger, E., Klinische Beiträge zur Frage der Hämolyse. Deutsches Archiv für klin. Med. 1902, Bd. LXXIV.
208) Hektoen, L., The action of certain ions upon the lysins in human serum. Transactions of the Chicago pathol. Soc. 1903.
209) Ders., Phagocytosis of red corpuscles. The Journ. of Infectious diseases 1906, Vol. III.
210) Ders., Iso-agglutination of human corpuscles. The Journ. of Infectious diseases 1907, Vol. IV.
211) Hektoen, L. und Ruediger, G. F., The antilytic action of salt solutions and other substances. Ebenda 1904, Vol. I.
212) Henri, V., Influence de la quantité des globules et de la durée de réaction sur les résultats d'hémolyse. Réponse à M. Mioni. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1905, Tome LVIII.
213) Ders., Influence de la quantité des sérums de chien sur l'hémolyse de globules rouges du poulet. Ebenda 1905, Tome LVIII.
214) Ders., Etudes de la loi de la vitesse d'hémolyse des hématies de poulet par le sérum de chien. Ebenda 1905, Tome LVIII.
215) Ders., Etude de l'hémolyse des globules rouges de poulet par le sérum de chien. Influence de la quantité des globules. Ebenda 1905, Tome LVIII.
216) Herman, M., Sur l'orgine des alexines. Bull. de l'Acad. Roy. Méd. du Belgique 1904, Tome XVIII, Nr. 2.
217) Hess, C. und Römer, P., Experimentelle Untersuchungen über Antikörper gegen Netzhautelemente. Arch. für Augenheilkunde 1906, Bd. LIV.
218) Hewlett, A. W., Über die Einwirkung des Peptonblutes auf Hämolyse und Bakterizidie. Bemerkungen über die Gerinnung des Blutes. Arch. für exper. Pathol. 1903, Bd. XLIX.
219) Heymann, F., Neuere Arbeiten über die physiologische Blutbeschaffenheit der Schwangeren und Neugeborenen und über die Beziehungen zwischen mütterlichem und fötalem Blut. Folia haematologica 1906, Nr. 1 u. 2.
220) Hirschfeld, L., Untersuchungen über die Hämaglutination und ihre physikalischen Grundlagen. Arch. für Hyg. 1908, Bd. LXIII.
221) Hoffmann, E., Experimentelle Untersuchungen über die hemmende Wirkung inaktivierter Sera. Zeitschr. für exper. Path. u. Therap. 1907, Bd. IV.
222) Hoke, E., Über Komplementbindung durch Organzellen. Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV.
223) Howard, W. T., A study of the agglutinating, haemolytic and endotheliolytic action of the blood serum in variola. The Journal of Med. Research 1903, Vol. XI.
224) Hulot, J. und Ramond, F., Anémie posthémorrhagique. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1901.

225) Iscovesco, H., Les lipoides. La presse méd. 1908, Nr. 58, 67, 70.
226) Jakuschewitsch, G., Über Hämolysine bei entmilzten Tieren. Zeitschr. für Hyg. 1904, Bd. XL.
227) Kelling, G., Über eine neue hämolytische Reaktion des Blutserums bei malignen Geschwülsten (und bei malignen Blutkrankheiten) und über ihre diagnostische und statistische Verwendung in der Chirurgie. Arch. für. klin. Chir. 1906, Bd. LXXX.
228) Kenztler, J., Der Komplementgehalt des Blutes bei verschiedenen Formen der Lungentuberkulose. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 11.
229) Klein, A., Über den Einfluß von Organextrakten auf rote Blutkörperchen, sowie auf die Erscheinung der Agglutination und Hämolyse. Protokoll der k. k. Gesellschaft der Ärzte in Wien. Wiener klin. Wochenschr. 1901, Nr. LII.
230) Ders., Beiträge zur Kenntnis der Agglutination roter Blutkörperchen. Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 6.
231) Ders., Zur Kenntnis der Agglutinine und gewisser Präzipitine des Blutes. Ebenda 1903, Nr. 5 u. 6.
232) Ders., Über die Beeinflussung der hämolytischen Komplemente durch Agglutination und Präzipitation. Ebenda 1905, Nr. 48.
233) Kober, K., Hämoglobinurie bei Stieltorsin einer Ovarialcyste. Centralbl. für Gynäkol. 1901.
234) Korányi, A. v., Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Seifen und Komplementen. Biochemische Zeitschr. 1908, Bd. XI.
235) Korschun, S. und Morgenroth, J., Über die hämolytischen Eigenschaften von Organextrakten. Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 37.
236) Kossel, H., Zur Kenntnis der Antitoxinwirkung. Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 7.
237) Kraus, R., Über das Vorkommen der Immunagglutinine und Immunhämolysine in der Milch. Wiener klin. Wochenschr. 1901.
238) Kraus, R. und Ludwig, St., Über Bakteriohämolysine und Antihämolysine. Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 15.
239) Kreidl, A. und Mandl, L., Über den Übergang der Immunhämolysine von der Frucht auf die Mutter. Ebenda 1904, Nr. 22.
240) Kretz, R., Zur Theorie der paroxysmalen Hämoglobinurie. Ebenda 1903, Nr. 18.
241) Krompecher, E., Erythrocytenkerne lösendes Serum. Centralbl. für Bakt. 1900, 1. Abt. Bd. XXVIII.
242) Kullmann, Über Hämolyse durch Organextrakte. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 8 und Zeitschr. für klin Medizin 1904, Bd. LIII.
243) Kyes, P., und Sachs, H., Zur Kenntnis der Kobragift aktivierenden Substanzen. Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 2—4.
244) Lambotte, U. und Stiennon, T., Alexine et leucocytes. Centralbl. für Bakt. 1905/06, 1. Abt. Bd. XL.
245) Landau, H., Etudes sur l'hémolyse. Annales de l'Inst. Pasteur, 1903, T. 17.
246) Landois, L., Die Transfusion des Blutes. Leipzig 1875.
247) Landsteiner, K., Zur Kenntnis der spezifisch auf Blutkörperchen wirkenden Sera. Centralbl. für Bakt. 1899, 1. Ab. Bd. XXV.
248) Ders., Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkung des Blutserums und der Lymphe. Ebenda 1900, Bd. XXVII.
249) Ders., Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. Wiener klin. Wochenschr. 1901.
250) Ders., Beobachtungen über Hämagglutination. Wiener klin. Rundschau 1902, Nr. 40.
251) Ders., Über Beziehungen zwischen dem Blutserum und den Körperzellen. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 42.
252) Ders., Serumagglutinine. Ebenda 1903.
253) Landsteiner, K. und Donath, J., Über antilytische Sera. Wiener klin-Wochenschr. 1901.
254) Landsteiner, K. und Ehrlich H., Über bakt. Wirkung von Lipoiden und ihre Beziehung zur Komplementwirkung. Centralbl. für Bakt. 1907, 1. Abt., Orig.-Bd. XLV.
255) Landsteiner, K. und Eisler, M. v., Über die Wirkungsweise hämolytischer Sera. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 24.
256) Dies., Über Agglutinin- und Lysinwirkung. Centralbl. für Bakt. 1905, 1. Abt. Bd. XXXIX.
257) Landsteiner, K. und Jagič N. v., Über die Verbindungen und die Entstehung von Immunkörpern. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 18.
258) Dies., Über Analogien der Wirkung kolloidaler Kieselsäure mit den Reaktionen der Immunkörper und verwandter Stoffe. Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 3.

259) Dies., Über Reaktionen anorganischer Kolloide und Immunkörperreaktionen. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 27.
260) Landsteiner, K. und Leiner K., Über Isolysine und Isoagglutinine im menschlichen Blut. Centralbl. für Bakt. 1905, 1. Abt. Bd. XXXVIII.
261) Landsteiner, K. und Raubitschek, H., Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination. Ebenda 1907, Bd. XLV.
262) Landsteiner, K. und Reich M., Über die Verbindungen der Immunkörper. Ebenda 1905, Bd. XXXIX.
263) Dies., Über Unterschiede zwischen normalen und durch Immunisierung entstandenen Stoffen des Blutserums. Ebenda 1905, Bd. XXXIX.
264) Dies., Über den Immunisierungsprozeß. Zeitschr. für Hygiene 1907, Bd. LVIII.
265) Landsteiner, K. und Richter, Über die Verwertbarkeit individueller Blutdifferenzen für die forensische Praxis. Zeitschr. für Medizinalbeamte 1903, Nr. 3.
266) Landsteiner, K. und Stankovič, R., Über die Adsorption von Eiweißkörpern und über Agglutininverbindungen. Centralbl. für Bakt., 1906, 1. Abt., Orig.-Bd. XLI.
267) Dies., Über die Bindung von Komplement durch suspendierte und kolloidal gelöste Substanzen. Ebenda 1906, Bd. XLII.
268) Landsteiner, K. und Sturli, A., Über die Hämagglutinine normaler Sera. Wiener klin. Wochenschr. 1902, Nr. 2.
269) Landsteiner, K. und Uhlirz, R., Über die Adsorption von Eiweißkörpern. Centralbl. für Bakt. 1906, 1. Abt. Orig.-Bd. XL.
270) Langer, J., Über Isoagglutinine bei Menschen mit besonderer Berücksichtigung des Kindesalters. Zeitschr. für Heilkunde 1903, Heft 5.
271) Langstein, L., Paroxysmale Hämoglobinurie und Hämaturie im Kindesalter. Med. Klinik 1905, Nr. 45.
272) Laqueur, A., Zur Kenntnis urämischer Zustände. Deutsche med. Wochenschr. 1901.
273) Ders., Zur Frage der Veränderung hämolytischer Eigenschaften im Blutserum Urämischer. Arb. aus dem path. Inst. zu Berlin 1905.
274) Lazar, E., Über hämolytische Wirkung des Froschserums. Wiener klin. Wochenschr. 1904.
275) Ders., Über die Bedeutung der lipoiden Stoffe der roten Blutkörperchen für den Mechanismus der Agglutination. Ebenda 1905, Nr. 39.
276) Ders., Weitere Studien über lipoide Substanzen als Schutzkörper. Ebenda 1906, Nr. 19.
277) Lefmann, G., Über den Komplementverbrauch bei der Hämolyse artfremden Blutes im Tierkörper. Hofmeisters Beiträge zur chem. Phys. u. Path. 1906, Bd. IX.
278) Levaditi, C., Sur l'état de la cytase dans le plasma des animaux normaux et des organismes, vaccinés contre le vibrion cholérique. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV.
279) Ders., Contribution à l'étude des l'anémie expérimentale, état de la cytase hémolytique dans le plasma des animaux normaux. Ebenda 1903, Tome XVI.
280) Ders., Mécanisme de l'anémie expérimentale produite par l'introduction d'hémolysines spécifiques. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1902.
281) Ders., L'influence de l'anticytase sur le sort des animaux qui reçoivent des hémolysines spécifiques. Ebenda 1902.
282) Ders., L'action bactéricide optima des sérums antimicrobiens, est-elle due à l'intervention de l'anticomplément ou a une déviation du complément? Ebenda 1902.
283) Ders., Mécanisme du phénomène de Neisser et Wechsberg. Ebenda 1902.
284) Ders., Contribution à l'étude de la spirillose des poules. Ann. de l'Inst. Pasteur 1904.
285) Ders., Les anticorps contre les spirilles de la septicémie des poules. Ebenda 1904, August.
286) Ders., Sur les hémolysines cellulaires. Ebenda 1903.
287) Ders., Sur les hémolysines thermostabiles du sérum sanguin. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1905, Tome LVIII.
288) Ders., Le sort des hématies nucléees introduites dans la circulation générale des animaux neufs ou immunisés à l'aide de ces hématies. Bukarest 1905.
289) Levaditi und Manouelian, Nouvelles recherches sur la spirillose des poules. Ann. de l'Inst. Pasteur 1906.
290) Levaditi, C. und Yamanouchi, T., Le sérodiagnostic de la syphilis. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1907. Tome LXIII.

291) LEVENE, P. A. und BALDWIN, E. R., On the antihaemolytic action of cell and tissue constituents. The Journ. of med. res. 1904, Vol. XII.
292) LICHTWITZ, L., Über Immunisierung mit Corpus luteum. Allg. med. Centralztg. 1904, Nr. 12.
293) Ders., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe (des Eosins) auf normale und hämolytische Sera. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 36.
294) LIEBERMANN, L. v., Sind die hämmolytischen Immunkörper oder die Komplemente Katalysatoren, also Fermente? Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 7.
295) Ders., Über Hämagglutination und Hämatolyse. Biochemische Zeitschr. 1907, Bd. IV.
296) Ders. (zum Teil in Gemeinschaft mit P. v. LIEBERMANN und B. v. FENYVESSY), Über Hämagglutination und Hämatolyse. Archr. für Hyg. 1907, Bd. LXII.
297) Ders., Können Antigene Ambozeptoren binden? Biochemische Zeitschr. 1908, Bd. XI, H. 5 u. 6.
298) Ders., Hämagglutination und Hämolyse. Centralbl. für Bakt. 1908, 1. Abt. Orig.-Bd. XLVII, H. 3.
299) LIEBERMANN, L. v. und FENYVESSY, B. v., Über die Wirkung der Verdünnung auf Normalserum und auf inaktiviertes hämolytisches Immunserum. Pester med.-chir. Presse 1907.
300) Dies., Über die Wirkung der Verdünnung auf natürliches und künstliches Normal- und Immunserum. Biochemische Zeitschr. 1907, Bd. V.
301) Dies., Isolierung und Reinigung der Immunkörper hämolytischer Immunsera. Centralbl. für Bakt. 1908, 1. Abt. Orig.-Bd. XLVII, H. 2.
302) Dies., Über seifenartige Verbindungen als Komplemente. Berliner klin. Wochenschrift 1908, Nr. 27.
303) LIEFMANN, H., Über die Komplementablenkung bei Präzipitationsvorgängen. Ebenda 1906, Nr. 15.
304) LINGELSHEIM, L. v., Ausfällung bakterizider und globulizider Blutfermente durch Pflanzenschleim. Zeitschr. für Hyg. 1902, Bd. XLII.
305) LISSAUER, M., Untersuchungen über die hämolytischen Eigenschaften des Blutserums abgekühlter und erwärmter Tiere. Arch. für Hyg. 1907, Bd. LXIII.
306) LONDON, E. S., Contribution a l'étude des hémolysines. I. u. II. Arch. des Sciences biol. (Inst. Impérial de méd. exper.) St. Pétersbourg 1901, Tome VIII.
307) LONGCOPE, W. T., A study of bacteryolytic serum complements in disease: a contributiou to our knowledge of terminal and other infections. Med. Bull. of the University of Pennsylvania 1902.
308) LÜDKE, H., Beiträge zur Hämolyse. Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXVII.
309) Ders., Zur Spezifität der Antikörper. Ebenda 1905, Bd. XXXVIII.
310) Ders., Beiträge zum Studium der Komplemente. Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 43 und 44.
311) Ders., Weitere Beiträge zur Hämolyse II. Centralbl. für Bakt. 1906, 1. Abt. Orig.-Bd. XL.
312) Ders., Beiträge zur Kenntnis der Hämagglutinine. Ebenda 1906, Bd. XLII.
313) Ders., Über den Nachweis von Antituberkulin. Beiträge zur Klinik der Tuberkulose. 1906, Bd. VII.
314) Ders., Über Hämolysine und Antihämolysine in menschlichen Transudaten und Exsudaten. Centralbl. für Bakt. 1907, 1. Abt. Orig.-Bd. XLIV.
315) Ders., Zur Kenntnis der Komplemente. Habilitationschrift. Verhandlungen der physikaisch-med. Gesellsch. zu Würzburg, Neue Folge, 1908, Bd. XXXIX.
316) MADSEN, TH., Über Tetanolysin. Zeitschr. für. Hyg. 1899, Bd. XXXII.
317) MALKOFF, M. G., Beitrag zur Frage der Agglutination der roten Blutkörpchen. Deutsche med. Wochenschr. 1900.
318) MANWARING, H. W., The action of certain salts on the cemplement in immune serum. The Journal of Infectious diseases 1904, Vol. 1.
319) Ders., A quantitative study of hemolytic complement. Ebenda 1905, Bd. II.
320) Ders., The absorption of hemolytic serum. Ebenda 1905, Bd. II.
321) Ders., The analytic methods of serum pathology. The Journ. of biological Chemistry, 1906, Vol. 1.
322) Ders., Hemolytic curves. Centralbl. für Bakt. 1906, 1. Abt. Bd. XL.
323) Ders., The absorption of hemolytic amboceptors. Ebenda 1906, Bd. XL.
324) Ders., Qualitative changes in hemolytic amboceptor. Ebenda 1906, Bd. 40.
325) Ders., On hemolytic complementoid. Transactions of the Chicago pathological Society 1905, Nr. 10.
326) Ders., On the so-called complementoid of hemolytic serum. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLI.
327) Ders., Auxilytic serum. Ebenda 1906, Bd. XLII.

328) Manwaring, H. W., Quantitative methods with hemolytic serum. The Journ. of biological Chemistry 1907, Vol. 3.
329) Ders., On auxilytic and antilytic components. Centralbl. für Bakt. 1907, 1. Abt. Orig.-Bd. XLIII.
330) Ders., On the application of physical chemistry to hemolytic serum. Ebenda 1907, Bd. XLIII.
331) Ders., On the thermolability of complements. Ebenda 1907, Bd. XLIV.
332) Ders., Changes on the third serum component, due to exposure to corpuscles. Ebenda 1907, Bd. XLV.
333) Maragliano, D., Beitrag zur Pathologie des Blutes. Berliner klin. Wochenschrift 1892.
334) Markl, Die Hemmung der Hämolyse durch Salze. Zeitschr. für Hyg. 1902, Bd. XXXIX.
335) Marshall, H. T., Studies on hemolysis with special reference to the properties of the blood and body fluids of human beings. The Journal of experimental medicine 1905, Vol. 6.
336) Marshall, T. H. und Morgenroth, J., Über Differenzierung von Komplementen durch ein Partialantikomplement. Centralbl. fur Bakt. 1902, 1. Abt. Orig.-Bd. XXXI.
337) Dies., Über Antikomplemente und Antiambozeptoren normaler Sera und pathologischer Exsudate. Zeitschr. für klin. Med. 1902, Bd. XLVII.
338) Martin, E., Isoagglutination beim Menschen nebst einer Bemerkung zur Marx-Ehrnroothschen Blutdifferenzierungsmethode. Centralbl. für Bakt. 1905, 1. Abt. Orig.-Bd. XXXIX.
339) Marx, H., Die Bedeutung der Hämagglutinine und Hämolysine der Normalsera für den forensischen Blutnachweis. Ärztliche Sachverständigenzeitung 1904, Nr. 21.
340) Marx, H., und Ehrnrooth, Eine einfache Methode zur forensischen Unterscheidung von Menschen- und Säugetierblut. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 7.
341) Dies., Eine einfache Methode zur forensischen Unterscheidung von Menschen- und Säugetierblut. 2. Mitteilung. Ebenda 1904, Nr. 16.
342) Mattirolo e Tedeschi, E., Ricerche sperimentale e cliniche sopra due casi di emoglobinuria. Academia di medicin di Torino 1903.
343) Meltzer, S. J., Hämolysis. Medical Record 1901.
344) Ders., Über den Einfluß der Peritonealhöhle auf das hämolytische Vermögen des fremden Serums. Centralbl. für Bakt. 1901, 1. Abt. Bd. XXX.
345) Meltzer, S. J., und Salant, W., Antihaemolytic properties of the serum of nephrectomised rabbits. Proceedings of the Society for experimental biology and medicine 1904.
346) Métalnikoff, S., Etudes sur la spermotoxine. Annales de l'Institut Pasteur 1900, T. 14.
347) Ders., Über hämolytitisches Serum durch Blutfütterung. Centralbl. für Bakt. 1901, 1. Abt. Bd. XXIX.
348) Metschnikoff, E., Etudes sur la résorption des cellules. Annales de l'Inst. Pasteur 1899, T. XIII.
349) Ders., Sur la spermotoxine et l'antispermotoxine. Ebenda 1900, T. XIV.
350) Ders., Sur lés cytotoxines. Ebenda 1900, Tome XIV.
351) Metschnikoff, E. und Besredka, Recherches sur l'action de l'hémotoxine sur l'homme. Ebenda 1900, Tome XIV.
352) Meyer, K., Über den Einfluß einiger Eiweißkörper und anderer Kolloide auf die Hämolyse. Arch. für. Hyg. 1908, Bd. LXV.
353) Ders., Versuche über die chemische Natur der hämolytischen Immunkörper. Ebenda 1908, Bd. LXVII, H. 2.
354) Ders.. Über die Säurenatur der hämolytischen Immunkörper. Centralbl. für Bakt. 1908, 1. Abt. Orig.-Bd. XLVI, H. 4.
355) Michaelis, L., Über eine neue Form der Hämoglobinurie. Deutsche med. Wochenschr. 1901.
356) Michaelis, L. und Fleischmann, P., Über die Erzeugung von Antikörpern durch Injektion artfremder Leberzellen. Zeitschr. für klin. Med. 1906, Bd. XLVIII.
357) Michaelis, L. und Steindorff, Über die Wirkung des Rizins auf Serum und Organzellen in vitro. Biochem. Zeitschr. 1906, Bd. II.
358) Micheli, F., Potere litico ed antiemolitico del siero di sangue umano. Giorn. della Acad. med. di Torino 1903.
359) Ders., Su alcune reazioni emolitiche nel siero de sangue dei nefritici. Gazz. degli Osp. e. clin. 1904, Nr. 7.

360) Micheli, F. und Donati, M., Sulla proprietà emolitiche degli estratti di organi e di tumori maligni. Rif. med. 1903, Nr. 38.
361) Miller, J. W., Über Komplementbindung bei Immunisierung mit Corpus luteum. Centralbl. für Bakt. 1908, 1. Abt. Orig.-Bd. XLVII.
362) Mioni, G., Le développement de l'hémolysine dans le sang sorti des vaissaux. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1903, Tome LV.
363) Ders., Influence de la qualité des globules et de la durée de la réaction sur les résultats de l'hémolyse. Ebenda 1904, Tome LIX.
364) Ders., Contribution a l'étude des hémolysines naturelles. Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, Tome XIX.
365) Moll, L., Über künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin. Hofmeisters Beiträge zur chem. Phys. u. Path. 1904, Bd. IV.
366) Monaco, D. Lo und Panichi, L., Sul fenomeno del agglutinazione nel sangue dei malarici. Atti del Ac. dei Lincei 1900.
367) Moreschi, C., Über die Natur der Isohämolysine der Menschenblutsera. Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 43 u. 44.
368) Ders., Zur Lehre von den Antikomplementen Ebenda 1905, Nr. 37.
369) Ders., Zur Lehre von den Antikomplementen. 2. Mitteilung. Ebenda 1906, Nr. 4.
370) Ders., Zur Abwehr. Ebenda 1906, Nr. 4.
371) Ders., Weiteres über Antikomplemente. Centralbl. für Bakt. 1906, 1. Abt. Ref. Bd. XXXVIII.
372) Ders., Über den Wert des Komplementablenkungsverfahrens in der bakteriologischen Diagnostik. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 38, u. 1907, Nr. 38.
373) Ders., Neue Tatsachen über die Blutkörperchenagglutination. Centralbl. für Bakt. 1908, 1. Abg. Orig.-Bd. XLVI, H. 1.
374) Ders., Beschleunigung und Verstärkung der Bakterienagglutination durch Antieiweißsera. Ebenda 1908, Bd. XLVI, H. 5.
375) Morgenroth, J., Über die Erzeugung hämolytischer Ambozeptoren durch Seruminjektion. Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 25.
376) Ders., Über die Bindung hämolytischer Ambozeptoren. Ebenda 1903, Nr. 2.
377) Ders., Über Grubers Kälteeinwand gegen die Ambozeptortheorie. Wiener klin. Wochenschr. 1903, Nr. 43.
378) Ders., Ambozeptortheorie und Kälteversuch. Ebenda 1904, Nr. 5.
379) Ders., Methodik der Hämolysinuntersuchung. Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung, herausgegeben von P. Ehrlich. Berlin 1904.
380) Ders., Komplementablenkung durch hämolytische Ambozeptoren. Centralbl. für Bakt. 1904, Bd. XXXV.
381) Ders., Untersuchungen über die Bindung von Diphtherietoxin und Antitoxin, zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Konstitution des Diphtheriegiftes. Zeitschrift für Hyg. 1904, Bd. XLVIII (s. auch Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 20.
382) Morgenroth J. und Kaya, R., Über eine komplementzerstörende Wirkung des Kobragiftes. Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. VIII.
383) Morgenroth, J. und Sachs, H., Über die Kompletierbarkeit der Ambozeptoren. Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 27.
384) Dies., Über die quantitativen Beziehungen von Ambozeptor, Komplement und Antikomplement. Ebenda 1902, Nr. 35.
385) Moro, E., Die klinische Alexinprobe. Münchener med. Wochenschr. 1907.
386) Ders., Zur klinischen Alexinprobe. 2. Mitteilung. Ebenda, 1907, Nr. 31.
387) Ders., Über das Verhalten hämolytischer Serumstoffe beim gesunden und kranken Kind. J. F. Bergmann, Wiesbaden 1908.
388) Moxter, Über ein spezifisches Immunserum gegen Spermatozoen. Deutsche med. Wochenschr. 1900.
389) Müller, P. Th., Über Antihämolisine. Centralbl. für Bakt. 1901, 1. Abt. Bd. XXIX.
390) Ders., Über die Antihämolysine normaler Sera. 2. Mitteilung. Ebenda 1901, Bd. XXIX.
391) Ders., Über die Erzeugung hämolytischer Ambozeptoren durch Seruminjektion. Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 32.
392) Ders., Aviditätsstudien an Hämolysinen und Aglutininen. Arch. für Hyg. 1907, Bd. LIV.
393) Muir, R., On the action of haemolytic sera. The Lancet 1903.
394) Ders., Discussion on immunity. The British Med. Journal 1904.

395) Muir, R. und Browning, C. H., On the combining properties of serum complement and on complementoids. Proc. of the Royal Society 1904, Vol. LXXIV.
396) Dies., On chemical combination and toxic action as exemplified in haemolytic sera. Ebenda 1904, Vol. LXXIV.
397) Dies., On the properties of anti-immune bodies and complementoids. The Journ. of Hygiene 1906, Vol. VI.
398) Dies., On the action of complement as agglutinin. Ebenda 1906, Vol. VI.
339) Muir, R. und Fergusson, A. R., On the hemolytic receptors of the red corpuscles. The Journ. of Path. and Bact. 1906.
400) Muir, R. und Martin, W. B. M., On the deviation of complement by a serum and its antiserum, and its relations to the precipitin test. The Journal of Hygiene 1906, Vol. VI.
401) Nagelschmidt, F., Was ist Erkältung? Beiträge zur klinischen Medizin (Senator-Festschrift). Berlin 1906.
402) Neisser, E. und Döring, H., Zur Kenntnis der hämolytischen Eigenschaften des menschlichen Serums. Berliner klin. Wochenschr. 1901.
403) Neisser, E. und Friedemann, U., Über Ambozeptoroidbildung in einem menschlichen Serum. Ebenda 1902, Nr. 29.
404) Neisser, M., Über die Vielheit der im normalen Serum vorkommenden Antikörper. Deutsche med. Wochenschr. 1900.
405) Neisser, M. und Friedemann, U., Studien über Ausflockungserscheinungen. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 11.
406) Dies., Studien über Ausflockungserscheinungen. II. Ebenda 1904, Nr. 19.
407) Neisser, M. und Sachs, H., Ein Verfahren zum forensischen Nachweis der Herkunft des Blutes. Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 44.
408) Dies., Die forensische Blutdifferenzierung durch antihämolytische Wirkung. 2. Mitteilung. Ebenda 1906, Nr. 3.
409) Dies., Bermerkungen zu der Arbeit von Prof. Uhlenhuth über Komplementablenkung und Bluteiweißdifferenzierung. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 39.
410) Dies., Untersuchungen über das Verfahren von M. Neisser und H. Sachs, zur forensischen Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Klin. Jahrb. 1908, Bd. XIX.
411) Neisser, M. und Wechsberg, F., Über die Wirkungsart bakterizider Sera. Münchener med. Wochenschr. 1901.
412) Neuberg, C. und Rosenberg, E., Lipolyse, Agglutination und Hämolyse. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 2.
413) Neuberg, C. und Reicher, K., Lipolyse, Agglutination und Hämolyse. 2. Mitteilung. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV.
414) Dies., Lipolyse, Agglutination und Hämolyse. 3. Mitteilung. Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 35.
415) Neuberg, C., Lipolyse, Agglutination und Hämolyse. 4. Mitteilung. Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. XI.
416) Neufeld, F., Beitrag zur Kenntnis der Phagocytose und der Herkunft des Komplements. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1908, Bd. XXVIII, Heft 1.
417) Neufeld, F. und Händel, Über Komplementbindung und Komplementablenkung bei 0° und 37°. Ebenda 1908, Bd. XXVIII, Heft 1.
418) Dies., Beiträge zur Kenntnis der Wirkung verschiedener blutlösender Gifte, insbesondere des taurocholsauren Natriums und der Seife. Ebenda 1908, Bd. XXVIII, Heft 3.
419) Nicolle, M., (zum teil in Gemeinschaft mit E. Pozerski und G. Abt), Une conception générale des anticorps et de leurs effets. Annales de l'Inst. Pasteur, Tome XXII, Januar und März 1908.
420) Noc, F., Propriétés bacteriolytiques et anticytasiques du venin du cobra. Annales de l'Inst. Pasteur, Tome XIX, 1905.
421) Noguchi, H., The interaction of the blood of cold-blooded animals, with reference to hemolysis, agglutination and precipitation. Bulletin from the University of Pennsylvania 1902.
422) Ders., A study of immunisation hemolysins, agglutinins, precipitins and coagulins in cold-blooded animals. Ebenda 1902.
423) Ders., The multiplicity of the hemagglutinins and the heat lability of the complements of cold-blooded animals. Ebenda 1903.
424) Ders., On the heat lability of the complements of cold-blooded animals. Centralbl. für Bakt. 1903, 1. Abt., Bd. XXXIV.
425) Ders., The thermostabile anticomplementary constituents of the blood. The Journal of experimental medicine, 1906, Vol. 8, Nr. 6.

426) Noguchi, H., On certain complementary substances. Proceedings of the Society for experimental biology and medicine 1907, Vol. 4, Nr. 3.
427) Ders., Über die chemische Inaktivierung und Regeneration der Komplemente. Biochemische Zeitschr. 1907, Bd. VI.
428) Ders., Über gewisse chemische Komplementsubstanzen. Ebenda 1907, Bd. VI.
429) Ders., Über eine lipolytische Form der Hämolyse. Ebenda 1907, Bd. VI.
430) Nolf, P., Contribution à l'étude des sérums antihématiques. Annales de l'Inst. Pasteur 1900, Tome XIV.
431) Ders., Le mécanisme de la glubulolyse. Ebenda 1900, Tome XIV.
432) Oppenheimer, C., Fermente und Toxine. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 42.
433) Ottolenghi, D., Über das Vorhandensein von Komplement im Fibrin. Centralbl. für Bakt. 1904, 1. Abt. Orig.-Bd. XXXVII.
434) Ottolenghi, D. und Mori, Die Wirkung des Äthyläthers auf die hämolytischen und bakteriziden Sera. Ebenda 1905, Bd. XXXVIII.
435) Petrie, G. E., On the relationship of the leucocytes and certain organ extracts to the bactericidal power of the blood. The Journ. of Path. and Bact. 1903, Vol. IX.
436) Pfaundler, M. und Moro, E., Über hämolytische Substanzen der Milch. Zeitschr. für exper. Path. u. Ther. 1907, Bd. IV.
437) Dies., Über hämolytisches Komplement der Frauenmilch. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 20.
438) Pfeiffer, H., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe (Eosin) auf normales Serum und rote Blutkörperchen. Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 13.
439) Ders., Experimentelle Beiträge zur Lehre von den Autointoxikationen. Zeitschr. für Hyg. u. Infektionskrkh. 1906, Bd. LIV.
440) Pfeiffer, R., Ein neues Grundgesetz der Immunität. Deutsche med. Wochenschr. 1896.
441) Pfeiffer, R. und Friedberger, E., Über Antikörper gegen die bakteriolytischen Immunkörper der Cholera. Berliner klin. Wochenschr. 1902.
442) Dies., Weitere Beiträge zur bakteriolytischen Immunität. Centralbl. für Bakt. 1903, 1. Abt. Orig.-Bd. XXXIV.
443) Dies., Über den Verbleib der bakteriolytischen Immunkörper im tierischen Organismus nach der passiven Immunisierung. Ebenda 1904, Bd. XXXIV.
444) Dies., Weitere Beiträge zur Frage der Antisera und deren Beziehungen zu den bakteriolytischen Ambozoptoren. Ebenda 1904, Bd. XXXVII.
445) Dies., Über antibakteriolytische (antagonistische) Substanzen normaler Sera. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 1.
446) Dies., Weitere Untersuchungen über die antagonistische Wirkung normaler Sera. Ebenda 1905, Nr. 29.
447) Dies., Beitrag zur Lehre von den antagonistischen Serumfunktionen. Centralbl. für Bakt. 1906, 1. Abteil. Orig.-Bd. XLI, Heft 2.
448) Pfeiffer, R. und Moreschi, C., Über scheinbar antikomplementäre und Antiambozeptorwirkung präzipitierender Sera im Tierkörper. Berliner klin. Wochenschrift 1906, Nr. 2.
449) Pfeiffer, W., Weitere Beobachtungen über die hämolytischen Fähigkeiten des des Peptonblutes. Arch. für exper. Path. und Pharm. 1904, Bd. L.
450) Pick, E. P., Zur Kenntnis der Immunkörper. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiologie und Pathologie 1901 und 1902, Bd. I.
451) Pick, E. P. und Pribram, E., Beiträge zur Kenntnis ätherempfindlicher und ätherlöslicher Substanzen, des Blutserums und ihr Einfluß auf einige Immunitätsreaktionen. Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. XI, Heft 5 und 6.
452) Polano, O., Experimentelle Beiträge zur Biologie der Schwangerschaft. Habilitationsschrift. Würzburg 1904.
453) Polk, M. J., A clinical study of hemolytic action of human blood serum. The Journal of med. research 1904, Vol. XII.
454) Pugnat, A., Action de l'urine sur les globules rouges dans la pneumonie. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1901.
455) Quinan, Cl., Über spezifische Erythrolyse. Hofmeisters Beiträge zur chem. Phys. und Path. 1904, Bd. V.
456) Ranzi, E., Über Komplementablenkung durch Serum und Organe. Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 51.
457) Ders., Untersuchungen über antigene Eigenschaften der Tumoren. Arch. für klin. Chir. 1907, Bd. LXXXIV.
458) Rehns, J., Contribution à l'étude de l'immunité acquise. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1900, S. 1058.

459) Rhens, J., Démonstration de l'éxistence des hémolysines composées spécialement des alexines, à l'état libre et actif dans le sang circulant. Ebenda 1901, Tome LIII.
460) Ders., Sur une immuncytolysine atoxique. Ebenda 1904, Tome LVI.
461) Rémy, L., Contribution à l'étude des substances des sérums normaux. Annales de l'Inst. Pasteur 1903, Tome XVII.
462) Ders., Contribution à l'étude des substances actives des sérums. Sur la pluralité des alexines. Bulletin de l'Acad. de Méd. du Belgique 1903.
463) Ders., Contribution à l'étude des sérums hémolytiques. Annales de l'Inst. Pasteur 1905, Tome XIX.
464) Ders., Contribution à l'étude des sérums hémolytiques. Le dosage des substances actives dans le sérum hémolytique. Ebenda 1906, Tome XX.
465) Resinelli, G., Ferrara 1901.
466) Rickmann, W., Beitrag zur biologischen Eiweißdifferenzierung. Zeitschr. für Fleisch- und Milchhygiene, 17. Jahrg. und Arbeiten aus dem Institut für exper. Ther. zu Frankfurt a. M., Jena 1907, Heft 3.
467) Römer, P., Demonstrationen und Mitteilungen aus der Immunität und Ophthalmologie. Sitzungsberichte aus der physik.-med. Gesellsch. Würzburg 1904.
468) Ders., Die Pathogenese der Cataracta senilis vom Standpunkte der Serumforschung. Gräfes Archiv für Ophthalmologie 1905, Bd. LX.
469) Ders., Arbeiten aus dem Gebiet der sympathischen Ophthalmie. Arch. für Augenheilkunde 1906, Bd. LIV.
470) Ders., Stoffwechsel der Linse und Giftwirkungen auf dieselbe. 33. Versammlung der ophthalmologischen Gesellsch. Wiesbaden 1907.
471) Ders., Die Pathogenese der Cataracta senilis vom Standpunkte der Serumforschung III—V. Arch. für Augenheilkunde, Ergänzungsheft 1907, Bd. LVI.
472) Rössle, Veränderungen der roten Blutkörperchen durch inaktiviertes spezifisch lytisches Serum. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 42.
473) Rose, E., Beiträge zur Lehre von der Komplementablenkung. Inaug.-Diss. Würzburg 1907.
474) Ruffer, A. et Crendiropoulo, Sur le pouvoir hémozosique du chlorure de sodium et son mode d'action. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1906, Tome LX.
475) Rywosch, M., Über Hämolyse und Baktericidie des embryonalen Hühnerblutes. Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLIV, 1. Abt. Originalbd.
476) Sabrazès et Fauquet, Action de l'urine sur les globules rouges. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1901.
477) Dies., Propriétés hématolytiques de la première urine du nouveau-né. Ebenda 1901.
478) Sachs, F., Weitere Beiträge zur Kenntnis der Seifenhämolyse. Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. XII.
479) Sachs, H., Immunisierungsversuche mit immunkörperbeladenen Erythrozyten. Centralbl. für Bakt. 1901, 1. Abt Bd. XXX.
480) Ders., Gibt es einheitliche Alexinwirkungen? Berliner klin. Wochenschr. 1902. Nr. 9 und 10.
481) Ders., Über die Vorgänge im Organismus bei der Transfusion fremdartigen Blutes. Arch. für Anat. und Physiol. 1903.
482) Ders., Über Differenzen der Blutbeschaffenheit in verschiedenen Lebensaltern. Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV, 1. Abt. Originalbd.
483) Ders., Über die Hämolysine des normalen Blutserums. Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 7.
484) Ders., Über das Zusammenwirken normaler und immunisatorisch erzeugter Ambozeptoren bei der Hämolyse. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 18.
485) Ders., Über Komplementoide. Centralbl. für Bakt. 1905, 1. Abt. Orig.-Bd. XL.
486) Ders., Über die komplementablenkenden Funktionen des normalen Serums. Ebenda 1906, Bd. XL.
487) Ders., Über die Beziehungen des Kobragiftes zu den roten Blutzellen. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 9.
488) Ders., Bemerkungen über die „Inaktivierung" von Lipoiden in eiweißhaltigen Lösungen. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10.
489) Ders., Des modifications du sérum sanguin par le chauffage. La semaine méd. Nr. 24. Juni 1908.
490) Sachs, H. und Altmann, K., Diskussionsbemerkungen. Ärztl. Verein Frankfurt 17. Febr. 1908 und Berliner med. Gesellsch. Berliner klin. Wochenschr. 1908, pag. 522.
491) Dies., Über die Wirkung des oleinsauren Natrons bei der Wassermannschen Reaktion auf Syphilis. Berliner klin. Woehenschr. 1908, Nr. 10.
492) Dies., Über den Einfluß der Reaktion auf das Zustandekommen der Wassermannschen Komplementbindung bei Syphilis. Ebenda 1908, Nr. 14.

493) SACHS, H. und BAUER, J., Über das Zusammenwirken mehrerer Ambozeptoren bei der Hämolyse und ihre Beziehungen zu den Komplementen. Arbeiten aus dem Kgl. Inst. für exper. Ther. zu Frankfurt a. M., Heft 3. Jena 1907.
494) Dies., Über die Differenzierung des Eiweißes in Gemischen verschiedener Eiweißarten. Ebenda 1907, Heft 3.
495) SACHS, H. und TERUUCHI, Y., Die Inaktivierung der Komplemente im salzfreien Medium. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 16, 17 u. 19.
496) SATA, A., Über die Wirkung und die Spezifizität der Cytotoxine im Organismus. Zieglers Beiträge zur path. Anat. 1906, Bd. XXXIX.
497) SAVTCHENKO, J. G., Du rôle des immunisines (fixateurs) dans la phagocytose. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Tome XVI.
498) SAVTCHENKO und BERDNIKOFF, Arch. russes de Path. 1902.
499) SCHATILOFF, P., Die EHRLICHsche Seitenkettentheorie. Jena 1908. G. Fischer.
500) SCHNEIDER, R., Über die Präexistenz des Alexins im zirkulierenden Blute. Arch. für Hyg. 1908, Bd. LXV, Heft 4.
501) SCHÜTZE, A., Beiträge zur Kenntnis der zellenlösenden Sera. Deutsche med. Wochenschr. 1900.
502) Ders., Über das Verschwinden verschiedenartiger Immunsera aus dem tierischen Organismus. (Koch-Festschrift). Jena 1903.
503) Ders., Über die Anwendung der Ablenkung hämolytischer Komplemente zum Nachweis von Pferdefleisch. Med. Klinik 1906, Nr. 18.
504) Ders., Über den forensischen Wert des NEISSER-SACHSschen Verfahrens der Komplementablenkung. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 52.
505) Ders., Zur Frage der Spezifizität der Organantigene. Zeitschr. für klinische Med. 1908, Bd. LXV, Heft 5 und 6.
506) SCHÜTZE, A. und SCHELLER, R., Experimentelle Beiträge zur Kenntnis der im normalen Serum vorkommenden globuliziden Substanzen. Zeitschr. für Hyg. 1901, Bd. XXXVI.
507) SCHULZ und MARX, Untersuchungen über das Verfahren von M. NEISSER und H. SACHS zur forensischen Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Klin. Jahrbuch 1908, Bd. XIX.
508) SCHUHMACHER, H., Beitrag zur Frage des Überganges der im Serum gesunder und typhuskranker Wöchnerinnen enthaltenen Agglutinine auf den kindlichen Organismus. Zeitschr. für Hyg. 1901, Bd. XXXVII.
509) SCLAVO, A., Contributo allo studio del potere tossico del siero di sangue. Riv. d'igiene e sanità publica 1903.
510) SELIGMANN, E., Beiträge zur Frage der sogenannten „Komplementbindung". Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 32.
511) Ders., Zur Kenntnis der Seruminaktivierung. Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. X Heft 4—6.
512) SENATOR, H., Über die hämolytische Eigenschaft des Blutserums bei Urämie. Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 8.
513) SHATTOCK, S. G., Chromocyte clumping in acute pneumonia and certain other diseases and the significance of the buffy coat in the shed blood. The Journ. of Path. and Bact. 1900, Vol VI.
514) SHIBAYAMA, A., Einige Experimente über Hämolysine. Centralbl. für Bakt. 1901, I. Abt. Bd. XXX.
515) Ders., Über die Wirkung der bakteriologischen Heilsera bei wiederholten Injektionen. Ebenda 1906, Bd. XLI.
516) SICK, K., Über Herkunft und Wirkungsweise der Hämagglutinine. Deutsches Archiv für klin. Med. 1904, Bd. LXXX.
517) SIMNITZKY, S., Einige Komplementfragen. Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 50.
518) STRAUSS, H., Zur Entstehung und Beschaffenheit milchähnlicher pseudochylöser Ergüsse. Charité-Annalen 1902.
519) STRAUSS, H. und WOLFF, W., Über das hämolytische Verhalten seröser Flüssigkeiten. Fortschritte der Medizin 1902, Nr. 1 u. 7.
520) SWEET, J. E., A study of a hemolytic complement found in the serum of the rabbit. Bull. from the University of Pennsylvania 1902.
521) Ders., The reactions of the blood in experimental diabetes melitus. A contribution to our knowledge of the thermolabile complement. I. Contribution. Centralbl. für Bakt. 1903, 1. Abt. Bd. XXXV.
522) SZCZAWINSKA, Sérum cytotoxique pour les globules du sang d'un invertebré. Compt rend. de la Soc. de Biol. 1902, Tome LIV.
523) TAKAKI, K., Zur Kenntnis des Lysinogens der Blutscheiben. Hofmeisters Beiträge zur chemischen Phys. u. Path. 1908, Bd. XI.

524) Tallquist, Zur Pathogenese der perniziösen Anämie, mit besonderer Berücksichtigung der Bothriocephalusanämie. Zeitschr. für klin. Med. 1907, Bd. LXI.
525) Tarassévitch, L., Sur les cytases. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, Tome XVI.
526) Tauber, Extrauterine Gravidität und Hämoglobinurie. Prager med. Wochenschr. 1902.
527) Théohari und Babes, Über ein gastrotoxisches Serum, mit einem Studium des Chemismus des Magens und der von diesem Gastrotoxin veranlaßten histologischen Veränderungen. Centralbl. für Bakt. 1905, 1. Abt. Orig. Bd XXXVIII. u. XXXIX.
528) Toyosumi, H., Über den Mechanismus der Lecithiuausflockung durch Rinderserum. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 17.
529) Traube, J., Zur Komplementfrage. Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. X, H. 4—6.
530) Trommsdorff, R., Über den Alexingehalt normaler und pathologischer menschlicher Blutsera. Centralbl. für Bakt. 1. Abt. 1902, Bd. XXXII.
531) Ders., Experimentelle Studien über die Ursachen der durch verschiedene Schädlichkeiten bedingten Herabsetzung der natürlichen Widerstandsfähigkeit gegen Infektionen (Resistenz); ein Beitrag zur Immunitätslehre. Arch. für Hyg. 1906, Bd. LIX.
532) Tsuda, K., Über die hämolytische Wirkung des normalen Rinderserums bei vermindertem Salzgehalt. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 8.
533) Tsurusaki, H., Zur Kenntnis der komplexen Hämolysine. Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. X, Heft 4—6.
534) Uhlenhuth, Komplementablenkung und Bluteiweißdifferenzierung. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 31 u. 51.
535) Ders., Über die Verwertbarkeit der Komplementablenkung für die forensische Praxis und die Differenzierung verwandter Blut- und Eiweißarten. Centralbl. für Bakt. 1906, 1. Abt. Ref. Bd. XXXVIII.
536) Ders., Nachprüfung des von Neisser und Sachs angegebenen Verfahrens zur forensischen Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Klin. Jahrb. 1908, Bd. XIX.
537) Uhlenhuth, Weidanz, O. und Angeloff, Über den biologischen Nachweis der Herkunft von Blut in blutsaugenden Insekten. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1908, Bd. XXVIII, H. 3.
538) Verdier, L., Contribution à l'être de la differentiation individuelle du sang humain. Thèse de Toulouse 1906.
539) Wassermann, A., Über die Ursachen der natürlichen Widerstandsfähigkeit gegenüber gewissen Infektionen. Deutsche med. Wochenschr. 1901.
540) Ders., Experimentelle Beiträge zur Kenntnis der natürlichen und künstlichen Immunität. Zeitschr. für Hyg. 1901, Bd. XXXVII.
541) Ders., Über Agglutinine und Präzipitine. Ebenda 1903, Bd. XLII.
542) Ders., Über die praktische Bedeutung der Komplementbindung. Zeitschr. für Infektionskrankh. d. Haustiere 1906, Bd. I.
543) Ders., Untersuchungen über das Verfahren von M. Neisser und H. Sachs zur forensischen Unterscheidung von Menschen- und Tierblut. Klin. Jahrb. 1908, Bd. XIX.
544) Wassermann, A. und Bruck, C., Über den Einfluß der Bildung von Eiweißpräzipitinen auf die Dauer der passiven Immunität. Zeitschr. für Hyg. 1905, Bd. L.
544) Dies., Ist die Komplementbindung beim Entstehen spezifischer Niederschläge eine mit der Präzipitierung zusammenhängende Erscheinung oder Ambozeptorwirkung? Med. Klinik 1905, Nr. 55.
546) Wassermann, A. und Citron, J., Über die Beziehungen des Serums zu gewissen Nährstoffen (Glykogen, Albumosen, Pepton). Zeitschr. für exper. Path. u. Ther. 1907, Bd. IV.
547) Wechsberg, F., Diskussionsbemerkungen in der k. k. Gesellschaft der Ärzte in Wien. Wiener klin. Wochenschr. 1901, Nr. 48.
548) Ders., Zur Lehre von der natürlichen Immunität und über bakterizide Heilsera. Zeitschr. für Hyg. 1902, Bd. XXXIX.
549) Ders., Über die Wirkung bakterizider Immunsera. Wiener klin. Wochenschrift 1902, Nr. 13 und 28.
550) Weidanz, O. und Borchmann, K., Vergleichende Untersuchungen über die praktische Verwertbarkeit der Präzipitinreaktion und der Komplementbindungsmethode zum Nachweis von Pferdefleisch. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1908, Bd. XXVIII, Heft 3.
551) Wendelstadt, H., Über die Vielheit der Ambozeptoren und Komplemente bei der Hämolyse. Centralbl. für Bakt. 1902, 1. Abteil. Orig.-Bd. XXXI.

552) Wendelstadt, H., Über die Wirkung von Glykogen auf hämolytische Vorgänge. Ebenda 1903, Bd. XXXIV.
553) Wessely, K., Auge und Immunität. Berliner Klinik 1903, Heft 182.
554) Widal, F. und Rostaine, P., Insuffisance d'antisensibilisatrice dans le sang des hémoglobinuriques. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1905, Tome LVIII.
555) Dies., Sérothérapie préventive de l'attaque d'hémoglobinurie paroxystique. Ibid. 1905.
556) Dies., Sérothérapie préventive de l'attaque d'hémoglobinurie paroxystique. Différence des qualités du plasma dans l'hémoglobinurie paroxystique et dans certains cas d'hémoglubinurie paludéenne. Ebenda 1906.
557) Wilde, M., Über die Absorption der Alexine durch abgetötete Bakterien. Berliner klin. Wochenschr. 1901.
558) Woelfel, A., Identification of alcohol soluble hemolysin in blood serum. The Journ. of infectious diseases 1905.
559) Wohlgemuth, J., Untersuchungen über den Pankreassaft des Menschen. 4. Mitteilung: Über ein in ihm enthaltenes komplexes Hämolysin und über die Darstellung des Lecithids. Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV.
560) Ders., Zur Kenntnis des im Pankreassaft enthaltenen Hämolysins. 2. Mitteilung. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 28.
561) Wolff, A., Beiträge zur Morphologie der Infektion und Immunität. Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 17—19.
562) Ders., Untersuchungen über einige Immunitätsfragen. Ebenda 1904, Nr. 42—44.
563) Wolze, E., Zur Hemmung der Hämolyse bei urämischen Zuständen. Centralbl. für Bakt. 1903, Nr. 27.
564) Zangger, H., Deutung der Eigenschaften und Wirkungsweisen der Immunkörper. Korrespondenzbl. für Schweizer Ärzte, 1904, Nr. 3.
565) Ders., Über die Funktionen des Kolloidalzustandes bei den Immunkörperreaktionen. 1. u. 2. Teil. Centralbl. für Bakt. 1905. 1. Abt. Ref. Bd. XXXVI.
566) Zebrowski, B., Comparaison entre les deux méthodes de détermination de la nature du sang par les précipitines et la fixation de l'alexine. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1907, Tome LXII, und Centralbl. für Bakt. 1907, 1. Abt. Orig.-Bd. XLIV.
567) Ders., Sur les rapports entre la sensibilisatrice hémolytique et le précipitinogène. Centralbl. für Bakt. 1907, 1. Abt. Orig.-Bd. XLV.

XXXVI.

Die Technik der Bordet-Gengouschen Komplementbindungsmethode in ihrer Verwendung zur Serodiagnostik der Infektionskrankheiten, speziell der Syphilis, sowie zur Eiweißdifferenzierung.

(Mit einem Anhang über die Technik der sog. Luespraezipitation).

Von

Julius Citron

in Berlin.

I. Das Wesen der Komplementbindungsreaktion.

Die von Bordet und Gengou[20]) im Jahre 1901 angegebene Komplementbindungsreaktion (Komplementfixation, Komplementablenkung, Fixation d'alexine) dient in praxi zum Nachweis von Antigenen, d. h. solchen Substanzen, welche Antikörper erzeugen können, und einer bestimmten Gruppe von Serumsubstanzen, deren Natur noch Gegenstand der Diskussion ist, die aber z. T. ziemlich sicher zu den Ambozeptoren gehören. Die Reaktion besteht darin, daß bei dem Mischen eines Antigens mit seinem homologen inaktiven Immunserum und mit Komplement, das letztere gebunden wird. Die Komplementbindung weisen Bordet und Gengou dadurch nach, daß sie nach einem gewissen Zeitintervall serumfreie Erythrocyten und eine bestimmte Menge eines durch Immunisieren gewonnenen spezifischen hämolytischen Serums zusetzen, das durch Erhitzen auf 56° inaktiviert, d. h. seines Komplementes beraubt wird. Ist eine Komplementbindung erfolgt, so kann eine Hämolyse nicht eintreten, weil dem Hämolysin kein freies Komplement mehr zur Verfügung steht; umgekehrt tritt die Hämolyse ein, wenn die Komplementbindung ausgeblieben war. Voraussetzung ist hierbei, daß das hämolytische Komplement auch zu der komplementophilen Gruppe des Bakterien- oder Eiweiß-Ambozeptors einpaßt, d. h. daß die Bordet-Gengousche Annahme, daß das Komplement eines jeden Serums einheitlich ist, zu Recht besteht.

An Stelle des Hämolysins und der Erythrocyten kann man auch, wie BORDET und GENGOU zeigten, zum Nachweis der Komplementbindung sensibilisierte Bakterien benutzen. Das Ausbleiben der Bakteriolyse ist dann der Indikator der Komplementbindung.

Mit Hilfe dieser Methode kann man bei Verwendung eines bekannten Antigens herausfinden, ob in einem zu untersuchenden Serum ein dazu passender Ambozeptor*) vorhanden ist und umgekehrt kann man mit Hilfe eines bekannten Serums von einer zweifelhaften Substanz feststellen, ob sie das entsprechende Antigen enthält. Es handelt sich um ganz analoge Dinge, wie sie seit langem bei der diagnostischen Agglutination und Bakteriolyse bekannt sind. So wie man mit Hilfe eines sicheren Typhusserums zweifelhafte, typhusverdächtige Bakterien und umgekehrt mit Hilfe von sicheren Typhusbazillen ein zweifelhaftes Krankenserum als Typhusserum identifizieren kann, genau so gelingt dies mit Hilfe der BORDET-GENGOUschen Komplementfixationsreaktion. Nehmen wir an, wir hätten das Serum eines typhusverdächtigen Kranken zu untersuchen, so verfährt man in folgender Weise:

Man mischt in einem Reagenzglas das Antigen, also sichere Typhusbazillen, mit dem durch Erhitzen komplementfrei gemachten Serum des Kranken und fügt hierzu etwas normales Meerschweinchenserum als Komplement. Hierauf setzt man das betreffende Reagenzglas für eine Stunde in den Brutschrank. Jetzt bestehen zwei Möglichkeiten:

Fall I. Entweder unser Verdacht auf Typhus ist begründet, dann enthält das Serum Typhusambozeptoren, die sich mit dem Typhusantigen verbinden können und nun fixiert der neugebildete Komplex Typhusantigen + Typhusambozeptor das Komplement. Hierbei wird zugleich auch eine Bakteriolyse auftreten. Jedoch ist dies unwesentlich, denn auch solche Bakterien, bei denen durch die kombinierte Wirkung von Ambozeptor und Komplement eine Bakteriolyse nicht auftritt, zeigen in vollkommen gleicher Weise das BORDET-GENGOUsche Phänomen. Nach Ablauf der Stunde setzt man Hammelerythrocyten und ein durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Hammelblut gewonnenes und durch Inaktivieren komplementfrei gemachtes hämolytisches Serum zu.

Fall I.

Typhusbazillen (Antigen)
|
Inakt. Typhusserum (Typhusambozeptor)
|
Komplement
|
Hämolysin (Hämolyt.-Ambozeptor)
|
Hammelblutkörperchen (2. Antigen).

Resultat: Infolge der Bindung des Komplementes an den Komplex Typh-Baz. + Typh.-Amboz. Ausbleiben der Hämolyse.

*) Der Kürze halber wird in folgendem vielfach die die Reaktion bewirkende Serumsubstanz (der BORDETsche Antikörper [HÄNDEL[90]], das Reagin [CITRON[146]]) als Ambozeptor bezeichnet werden.

Wenn nun, wie Bordet und Gengou annehmen, im Meerschweinchenserum nur ein einheitliches Komplement vorhanden ist, so kann die Hämolyse der Hammelerythrocyten nicht erfolgen, da das Komplement bereits durch das Typhusantigen und seinen Ambozeptor gebunden ist, für den hämolytischen Ambozeptor also kein Komplement mehr vorhanden ist. Das Ausbleiben der Hämolyse beweist uns also, daß in dem typhusverdächtigen Krankenserum Typhusambozeptoren vorhanden waren, daß also unser Verdacht begründet war.

Fall II. Die zweite Möglichkeit ist die, daß wir uns in unserer Diagnose getäuscht haben, und daß der Kranke nicht an Typhus, sondern an einer anderen Krankheit z. B. an Cholera leidet. In diesem Falle können sich die Cholera-Ambozeptoren mit dem Typhusantigen nicht verbinden, das Komplement bleibt demnach zunächst frei und wird dann bei Zusatz des Hämolysins und der Erythrocyten für die Hämolyse benutzt. Der Eintritt der Hämolyse beweist also das Fehlen der Typhusambozeptoren. Wir können demnach schließen, daß hier kein Typhus vorliegt. Um aber die Diagnose Cholera zu stellen, müssen wir erst den Versuch mit Choleraantigen wiederholen. In diesem Falle wird die Komplementbindung erfolgen.

Fall II.

Typhusbazillen (Antigen)
|
Inakt. Choleraserum (Choleraambozeptor)
|
Komplement
|
Hämolysin
|
Hammelblutkörperchen

Resultat: Das Komplement bindet sich an das Hämolysin und die Hammelblutkörperchen, es tritt folglich Hämolyse ein.

In vollkommen analoger Weise, wie wir hier durch den Nachweis von Ambozeptoren die Diagnose gestellt haben, kann dies umgekehrt auch durch die Identifizierung des Antigens erfolgen.

Nehmen wir an, wir hätten aus dem Kot eines typhusverdächtigen Kranken Bakterien isoliert, deren Natur wir durch den Komplementbindungsversuch sichern wollten. Wir würden dann eine Suspension dieser Bakterien in einem Reagenzglase mit inaktivem Typhusserum und frischem Meerschweinchenkomplement mischen und zur Kontrolle den Versuch mit Paratyphusserum, Choleraserum sowie normalem Serum wiederholen. Sind die isolierten Bakterien nun wirkliche, echte Typhusbazillen, so werden sie nur mit dem Typhusserum eine Komplementbindung ergeben, die sich nach Zusatz des Hämolysins und der Erythrocyten in dem Ausbleiben der Hämolyse äußern wird, während in allen Kontrollröhrchen die Hämolyse eintreten muß.

Ebenso, wie man durch Komplementfixation Bakterien und bakterielle Immunsera identifizieren kann, gelingt dies auch mit geformten und gelösten Eiweiß-Substanzen und den mit solchen erzeugten Immunseris. Gengou[85]) wies bereits im Jahre 1902 nach, daß solche Eiweißimmunsera bei dem Zusammenbringen mit ihren homologen Eiweißsubstanzen

nicht nur Präzipitation, sondern auch Komplementbindung geben, was darauf zurückzuführen sei, daß in solchen Seris sich neben den Präzipitinen auch Eiweißambozeptoren finden. MORESCHI[156, 157]), GAY[83, 84]) und KLEIN[102]) bestätigten später die Angaben GENGOUS, neigten aber zunächst zu der Auffassung, daß der Vorgang der Präzipitation selbst die Ursache der Komplementfixation sei. NEISSER und SACHS[173–174]) schlugen dann als erste vor, die BORDET-GENGOUsche Reaktion praktisch für die forensische Eiweißdifferenzierung als Ergänzung der Präzipitationsmethode zu verwenden.

Bei der vollkommenen biologischen Analogie zwischen tierischem und bakteriellem Eiweiß war zu vermuten, daß ebenso wie ungeformtes Eiweiß auch gelöste Bakteriensubstanzen zusammen mit ihrem Immunserum Komplementbindung ergeben würden, daß also durch die BORDET-GENGOUsche Reaktion sich gelöstes Bakterienantigen und mit Hilfe eines solchen homologe Ambozeptoren nachweisen lassen würden. WASSERMANN und BRUCK[214]), sowie CITRON[33]) führten hierfür den experimentellen Nachweis. WASSERMANN und BRUCK erzielten eine positive BORDET-GENGOUsche Reaktion bei dem Zusammenbringen von Bakterienextrakten mit Immunserum, während CITRON zeigte, daß bei der Vorbehandlung von Tieren mit natürlichen und künstlichen Aggressinen d. h. gelösten Bakteriensubstanzen Ambozeptoren gebildet werden, mit denen man ebenso wie mit gewöhnlichem Immunserum in den sterilen Exsudaten von an experimenteller Schweineseuche gestorbenen Versuchstieren ein gelöstes bakterielles Antigen feststellen kann.

WASSERMANN und BRUCK[217, 221]) wiesen dann weiterhin nach, daß man mit dieser Methode in Extrakten tuberkulöser Organe Tuberkulin und vielleicht auch Antituberkulin findet, und endlich stellten WASSERMANN, NEISSER und BRUCK[218]) fest, daß im Serum von Affen, die mit Extrakten syphilitischer Organe vorbehandelt wurden, Substanzen auftraten, welche mit syphilitischen Extrakten Komplementbindung ergaben. DETRE[54]), sowie WASSERMANN, NEISSER, BRUCK und SCHUCHT[219]) fanden dann auch im Serum von syphilitischen Menschen die gleichen Substanzen, allein ihre Untersuchungen ergaben nur höchst unkonstante Befunde (etwa 19% der Syphilisfälle zeigten eine positive Reaktion). Erst CITRON[36, 37, 40, 46]) zeigte, daß es sich hier nicht um ein regelloses, sondern um ein durchaus konstantes Phänomen handelt, das nur bei einem Teil der frisch infizierten Luetiker, sowie bei alten, symptomlosen, meist spezifisch behandelten Fällen fehlt. Die Mißerfolge der auf WASSERMANNS Veranlassung in der NEISSERschen Klinik ausgeführten Untersuchungen erklärte CITRON[37]) daraus, daß die verwendeten Mengen Antigen und Serum zu gering waren (0,1 ccm anstatt 0,2 ccm) und daß der Einfluß der spezifischen Hg-Therapie auf die Reaktion den ersten Autoren noch unbekannt war. Auf Grund seiner in der KRAUSschen Klinik angestellten Versuche empfahl CITRON[36, 37, 40]) zuerst die Komplementbindungsmethode zur klinischen Serodiagnostik bei allen Formen der Syphilis.

Für das theoretische Verständnis des Wesens der Seroreaktion der Syphilis und darüber hinaus vielleicht der ganzen Komplementbindungsreaktion wichtig war der von PORGES und MEIER[189–191]), von LANDSTEINER, MÜLLER und POETZL[110, 111]), sowie wenig später von LEVADITI und YAMANOUCHI[125, 126]) unabhängig voneinander geführte Nachweis, daß sich aus syphilitischen und normalen menschlichen und tierischen Lebern und anderen Organen eine alkohollösliche Substanz gewinnen läßt, die

bei der Mischung mit Syphilitikerserum eine Komplementbindung gibt, somit, wenn auch nur bis zu einem gewissen Grade, das Syphilisantigen ersetzen kann. Porges und Meier, sowie Landsteiner sehen in der alkohollöslichen Substanz Lipoide, die dem Lecithin nahe stehen, während Levaditi und Yamanouchi dem Lecithin eine geringere Bedeutung beimessen und die gallensauren Salze als die wirksamen Substanzen ansprechen. Levaditi und Yamanouchi[127]) zeigten dann weiter, daß auch die in der Lumbalflüssigkeit der Paralytiker von Wassermann und Plaut entdeckten sogenannten „Luesantikörper" alkohollöslich, also vermutlich lipoid sind. Da nun nach Untersuchungen von Wassermann und Citron[222]) das Lecithin im Tierversuch wenigstens kein Antigen ist, so dürfte, falls sich die zitierten Angaben über den Lecithincharakter der wirksamen Substanzen des Syphilisextraktes bestätigen sollten, die Auffassung, daß es bei dem Zustandekommen des Komplementbindungsphänomens sich stets um eine Antigen-Antikörperreaktion handele, möglicherweise nicht für alle Fälle aufrecht zu erhalten sein (siehe pag. 1094 u. folgende).

Auf Grund von Komplementbindungsversuchen, die Wassermann und Citron[222]) mit verschiedenen kolloidalen Substanzen (Glykogen, Albumosen, Pepton, Lecithin, Öl, Gelatine usw.) anstellten, und die durch Versuche von Landsteiner und Stankovic[108]) mit anderen Kolloiden gestützt werden, sehen Wassermann und Citron[222]) als Ursache der Komplementbindung die Veränderung der physikalisch-chemischen Beschaffenheit eines Moleküls durch den Eintritt einer anderen Substanz an, eine Auffassung, welche im Einklang mit den Ansichten von Bordet und F. Gay[21]) über das Wesen der Komplementfixation bei dem Phänomen der Hämolyse steht. In vielen Fällen ist mit der molekularen Zustandsänderung eine Änderung des physikalischen Aggregatzustandes verbunden, die sich in einer Zusammenballung (Präzipitation) oder in einer Auflösung (Lysis) äußert. Jedoch kann man nach den Versuchen von Wassermann und Bruck[214]), Wassermann und Citron[222]), Moreschi[158]) jetzt mit Sicherheit sagen, daß eine Präzipitation ebensowenig Voraussetzung der Komplementfixation ist als die Cytolyse, für welche Bordet und Gengou[20]) dies bewiesen haben.

Sieht man in der Komplementbindungsreaktion nichts weiter als den Ausdruck einer physikalisch-chemischen Zustandsänderung eines kolloidalen Moleküls, welche durch das Zusammentreffen mit einer bestimmten anderen Substanz, dem „Reagin" (Citron[46])), bewirkt wird, so erklären sich auch die interessanten Befunde Seligmanns[206]) leicht, daß Mastixemulsionen gemischt mit Schellack, Gelatine oder Salzlösungen das Komplementbindungsphänomen erzeugen.

Seligmann zeigte weiter, daß man ebenso wie bei der spezifischen Präzipitation (Gay[83, 84]), Moreschi[156, 157])), auch bei indifferenten chemischen Niederschlägen, z. B. beim Einbringen von kolloidaler Eisenhydroxydlösung in wässerige Lösungen oder bei der Mischung von Kalziumchlorid- und Sodalösung Komplementbindung erzielt.

Die Versuche Seligmanns beweisen also ebenso wie die der vorher genannten Autoren, daß bei kolloidalen Reaktionen mit und ohne Niederschlagsbildung Komplement absorbiert werden kann. Nicht ein molekularer Zustand als solcher verursacht nach Seligmann das Verschwinden des Komplements, sondern die Änderung dieses Zustandes der betreffenden Kolloide. Mit Recht weist Seligmann

darauf hin, daß hiermit noch keine Erklärung der spezifischen Immunitätsreaktion gegeben sei, bewiesen sei nur, daß es neben den Immunitätsreaktionen noch andere, chemisch definierbare Reaktionsvorgänge gibt, bei denen Komplement verschwindet.

Der hohe Wert der Komplementbindungsmethode für die biologische Diagnostik der Infektionskrankheiten, sowie für den Nachweis von Spuren eines Eiweißes wird hierdurch keineswegs erschüttert, denn es ist eben eine spezielle Eigenschaft der Immunsera, daß sie in besonders hohem Maße jenes Kolloid, das ihr Antigen ist, beeinflussen können, ohne daß wir bisher eine befriedigende Erklärung für diese experimentell gesicherte Tatsache geben könnten.

II. Die Methodik.

Die Komplementbindungsmethode dient, wie wir sahen, folgenden Zwecken:

1. Der Diagnostik der spontan auftretenden oder experimentell erzeugten Infektionskrankheiten und zwar:
   a) solcher mit bekannten Erregern, und
   b) solcher mit unbekannten, respektive nicht züchtbaren Erregern (Serodiagnostik der Syphilis).
2. Der Differenzierung von Eiweißsubstanzen, sowie zum Nachweis von Antikörpern gegen solche.

Die Methodik ist in ihrem Prinzip stets gleich, variiert aber je nach dem Zweck der Versuche in gewissen Einzelheiten. Auch zeigt die Arbeitstechnik in den verschiedenen Laboratorien, die sich mit der BORDET-GENGOUschen Reaktion eingehender befaßt haben, einige Differenzen.

1. Die Diagnostik der spontan auftretenden oder experimentell erzeugten Infektionskrankheiten mit bekannten Erregern.

Hier kommen zwei verschiedene technische Methoden in Frage, von denen die eine die des BORDETschen Laboratoriums, die andere die WASSERMANNs und seiner Schüler ist. Beide Methoden unterscheiden sich hauptsächlich dadurch, daß BORDET ganze Bakterien, WASSERMANN's Schule Bakterienextrakte, also gelöste Bakteriensubstanzen, als Antigen anwendet. Die übrigen Abweichungen sind nebensächlicher Art.

a) Die BORDET-GENGOUsche Methodik.

1. Antigen. Vierundzwanzigstündige Agarkulturen werden je nach dem Wachstum der Bakterien mit einer verschiedenen Menge physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, derart, daß eine ziemlich konzentrierte Bakterienemulsion entsteht. Bei einer gut gewachsenen Typhuskultur z. B. verwenden BORDET und GENGOU 5 ccm Kochsalzlösung zur Aufschwemmung. Tuberkelbazillensuspensionen werden in der Weise hergestellt, daß immer auf 1 ccm physiologische Kochsalzlösung 80 mg Bazillen, die von einer frischen Kultur stammen, kommen.

2. Das Antikörper enthaltende Serum wird durch Erhitzen auf 56° C während einer halben Stunde komplementfrei gemacht.

Der Grund, aus dem dies geschieht, ist der, daß verschiedene native Sera einen ganz verschiedenen Gehalt an Komplement haben.

Würde man die Sera aktiv für die Bordet-Gengousche Reaktion benutzen, so wäre ein Vergleich mehrerer Sera unter einander nur dann zulässig, wenn der Komplementgehalt gleich wäre. Hierzu kommt, daß bei den höheren Serumverdünnungen das Serum zu wenig Komplement für die Hämolyse haben würde. Man schaltet deshalb durch die Inaktivierung das Komplement des zu untersuchenden Serums ganz aus und gibt dann ein und dasselbe Komplement in bestimmter Verdünnung, die zur Hämolyse sicher genügt, zu allen zu untersuchenden Seren. (Siehe auch pag. 1104.)

3. Als Komplement dient das Serum eines normalen Versuchstieres oder des Menschen.

4. Als Hämolysin wird das inaktivierte Serum eines Tieres a benutzt, welches mit 3—4 Einspritzungen von defibriniertem Blut eines Tieres b vorbehandelt worden war, also z. B. das Serum eines Meerschweinchens, das mit Kaninchenblut oder das eines Kaninchens, das mit Ziegenblut immunisiert worden.

5. Die Erythrozyten werden von der Tierart b in der Weise gewonnen, daß man defibriniertes Blut wäscht. Zu diesem Zwecke füllt man 1—2 ccm defibriniertes Blut in ein Zentrifugenglas und markiert sich mit einem Fettstift die Niveauhöhe des Bluts. Hierauf zentrifugiert man, bis die Blutkörperchen sich vollständig zu Boden gesetzt haben. Das oben stehende klare Serum wird abpipettiert und physiologische Kochsalzlösung in entsprechender Menge dafür eingefüllt.

Das Waschen der Blutkörperchen ist notwendig, um sie von dem komplementhaltigen Serum zu befreien. Unterbleibt das Waschen so kann sich das den Erythrozyten anhaftende Komplement mit dem inaktiven Hämolysin verbinden und die Blutkörperchen auch in den Fällen auflösen, in denen eine Komplementfixation erfolgt war.

Der Komplementbindungsversuch selbst gestaltet sich nun so, daß man eine bestimmte Menge Antigen mit wechselnden Mengen Immunserum und einer bestimmten Quantität Komplement in einem Reagenzglas zusammenbringt, die drei Substanzen gut durcheinander mischt und 4—5 Stunden bei Zimmertemperatur stehen läßt. Hierauf erfolgt der Zusatz des Hämolysins und der Erythrocyten in folgender Form. Man mischt zwei Teile des inaktiven Hämolysins mit einem Teil des gewaschenen Bluts und läßt die Mischung einige Zeit stehen, damit die Blutkörperchen sensibilisiert werden, d. h. sich mit dem hämolytischen Ambozeptor beladen können. Von dieser Mischung setzt man dann 0,1 bis 0,2 ccm zu. Die Hämolyse tritt, wenn die Komplementfixation ausgeblieben war, in wenigen Minuten ein, während im Falle der erfolgten Komplementbindung die Erythrocyten intakt bleiben und sich, meist agglutiniert, zu Boden senken.

Als Kontrollen erachten Bordet und Gengou[20]) folgende für notwendig.

1. An Stelle des Immunserums ist ein inaktives Normalserum der gleichen Tierart zu prüfen. Also Antigen + inaktiviertes Normal-Serum + Komplement (5 Std.) + Hämolysin und Blut. Hier muß die Bindung des Komplements ausbleiben, weil die Ambozeptoren fehlen, folglich muß Hämolyse eintreten.

2. Inakt. Immunserum + Komplement (5 Std.) + Hämolysin und Blut. Da das Antigen fehlt, tritt Hämolyse ein.

3. Inakt. Normalserum + Komplement (5 Std.) + Hämolysin + Blut: Hämolyse, da das Antigen fehlt.

4. Antigen + inakt. Immunserum (5 Stund.) + Hämolysin + Blut: Keine Hämolyse, da kein Komplement darin ist.

5. Antigen + inakt. Normalserum (5 Std.) + Hämolysin + Blut: Keine Hämolyse, da kein Komplement darin ist.

Aus den Resultaten der angeführten Kontrollen ergibt sich nach BORDET und GAY[21]), daß weder das Antigen allein, noch der Ambozeptor allein Komplement zu binden vermag, sondern, daß nur der Komplex Antigen + Ambozeptor dies kann. BORDET erklärt dies bekanntlich damit, daß der Ambozeptor, die Substance sensibilisatrice, das Antigen gewissermaßen beize und es hiermit erst für das Komplement, das eine Art verdauendes Ferment darstellt, empfänglich macht. Bei sehr labilen Bakterien, wie es die Choleravibrionen, die Typhusbazillen und andere sind, erfolgt durch das Komplement nach seiner Fixation die Auflösung des Bakteriums, die Bakteriolyse. Je resistenter das Bakterium ist, desto weniger tritt die Lyse in Erscheinung, ja sie kann bei vielen Bakterien ganz fehlen. Dagegen ist die Komplementfixation, gleichviel ob mit oder ohne Bakteriolyse, eine ganz konstante Erscheinung fast aller Bakterien bei ihrem Zusammentreffen mit ihrem spezifischen Antiserum.

Mit Hilfe der BORDET-GENGOUschen Methodik wurden positive Resultate bei folgenden Kombinationen beschrieben:

1. Pestbazillen + Pestpferdeserum + Meerschweinchenkomplement + Meerschwein.-Hämolysin + Kaninchenblut (BORDET und GENGOU[20])).
2. Milzbrandvaccin + Meerschw.-Immunser. + Meerschw.-Kompl. + Meerschw.-Hämolysin + Kaninchenblut (BORDET und GENGOU[20])).
3. Rotlaufbaz. + Pferde - Immunser. + Meerschw.-Kompl. + Meerschw. - Hämolysin + Kaninchenblut (BORDET und GENGOU[20])).
4. Typhusbaz. + Meerschw.-Immunser. + Meerschw.-Kompl. + Meerschw.-Hämolysin + Kaninchenblut (BORDET und GENGOU[20])).
5. Colibaz. + Meerschw. - Immunser. + Meerschw.-Kompl. + Meerschw. - Hämolysin + Kaninchenblut (BORDET und GENGOU[20])).
6. Typhusbaz. + Menschen - Rekonvaleszentenser. + Menschen - Kompl. + Meerschw. Hämolysin + Kaninchenblut (BORDET und GENGOU[20])).
7. Proteus vulgaris + Meerschw.-Immunser. + Meerschw.-Kompl. + Meerschw.-Hämolysin + Kaninchenblut (BORDET und GENGOU[20])).
8. Abgetötete Tuberkelbaz. + Meerschw.-Immunser. + Meerschw.-Kompl. + Kaninch.-Hämolysin + Ziegen- oder Hammelblut (BORDET und GENGOU[20])).
9. Säurefeste Baz. + Meerschw.-Immunser. + Meerschw.-Kompl. + Kaninchen-Hämolysin + Ziegen- oder Hammelblut (BORDET und GENGOU[20]).
10. Keuchhustenbaz. + Menschenser. + Meerschw.-Immunser. + Meerschw.-Kompl. + Kaninchen-Hämolysin + Ziegen- oder Hammelblut (BORDET und GENGOU[22])).
11. Meningokokken + Menschen-Rekonvaleszentenser. + Menschenkompl. + Meerschw.-Hämolysin + Kaninchenblut (COHEN[49—51])).

Zur klinischen Diagnostik von Infektionskrankheiten wurde die BORDET - GENGOUsche Methodik von WIDAL und LESOURD[242, 118]) bei Typhus, von COHEN[49—51]) bei Cerebrospinalmeningitis, von BORDET und GENGOU[22]) bei Keuchhusten und von BESREDKA und DOPTER[15]), sowie FOIX und MALLEIN[69]) bei Scharlach verwendet.

LESOURD untersuchte unter WIDALS Leitung das Blutserum von 61 Typhösen. 58 mal war die Reaktion positiv, nur 3 mal negativ, und in diesen Fällen war aus äußeren Gründen eine zweite Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt unterblieben. Im Gegensatz zu diesem Autor, dessen Untersuchungen MORESCHI[159]) unbekannt waren, hatte MORESCHI bei seinen Untersuchungen, die mit einem Kaninchentyphusimmunserum, sowie einem von einem künstlich immunisierten Menschen

stammenden Immunserum angestellt wurden, ungünstige Ergebnisse. Er fand, daß die Methode zur Titrierung von Immunseris wenig geeignet und für den Nachweis kleiner Bakterienmengen nicht zuverlässig sei.

Cohen stellte im Serum von meningitiskranken Kindern Ambozeptoren für den Meningococcus intracellularis Weichselbaum fest.

Bordet und Gengou zeigten, daß bei an Keuchhusten leidenden Kindern das Serum mit den von ihnen entdeckten Keuchhustenbazillen Komplementbindung bewirkte. Hierin sehen sie eine der wichtigsten Stützen für die ätiologische Bedeutung ihres Bazillus.

Besredka[14]) wies im Serum von Tieren, die gegen Streptokokken immunisiert wurden, komplementbindende Antikörper nach. Es zeigte sich jedoch bei dem Vergleich der Schutzwirkung der Sera, daß die Komplementbindungsreaktion als Wertbemessungsmethode für die Schutzkraft ungeeignet sei. Besredka und Dopter sowie Foix und Mallein untersuchten das Serum von Scharlachkranken auf Antikörper gegen Streptokokken. Während Besredka und Dopter hierbei nur negative Resulate hatten, erzielten Foix und Mallein in 12 untersuchten Fällen 10 mal ein positives Resultat, wenn sie als Antigen einen aus einer Scharlachangina gezüchteten Streptokokkus benutzten. Schon am 4. Krankheitstage waren die Antikörper nachweisbar. Bei anderen Streptokokkenerkrankungen, die gegen den gleichen Streptokokkus auf Antikörper untersucht wurden, fand sich ein negatives Resultat.

b) Die Wassermann-Bruck sche Methodik.

1. Das Antigen ist stets ein Bakterienextrakt. Die Herstellung desselben ist bei den verschiedenen Bakterien nicht ganz gleichmäßig. Die ersten grundlegenden Untersuchungen stellten Wassermann und Bruck[214]) mit den wässerigen, künstlichen Aggressinen von Wassermann und Citron[32, 213]) an.

Eine Kollesche Schale (= 10—12 Agarkulturen) wird mit dem entsprechenden Stamm beimpft und nach 24 Stunden mit 5—10 ccm sterilisiertem, destilliertem Wasser abgeschwemmt. Die Bakteriensuspension wird 24 Stunden bei Zimmertemperatur im Schüttelapparat geschüttelt. Hierauf erfolgt ein Zusatz von 5 %iger Karbolsäure, bis der Gesamtgehalt 0,5 % Phenol beträgt (also z. B. auf 10 ccm Bakteriensuspension 1 ccm 5 % Karbolsäure). Dann wird in einer elektrischen oder Wasserzentrifuge klar zentrifugiert. Handelt es sich um sehr labile Bakterien wie Meningokokken, so ist das Zentrifugat direkt zu gebrauchen. Bei anderen Bakterien, wie Schweineseuche, Hühnercholera, Schweinepest empfiehlt es sich, noch ein dreistündiges Erhitzen auf 44° C anzuschließen.

Leuchs[131]) modifizierte dieses Verfahren für Typhusbazillen dahin, daß er die Bakterienaufschwemmung zunächst 24 Stunden bei 60° C abtötet und dann 2 Tage schüttelt.

Für Tuberkuloseversuche kann man die im Handel käuflichen Alt- und Neutuberkuline verwenden (Wassermann und Bruck[217, 221]), aber auch wässerige Bakterienextrakte (Citron[38])).

Die Antigene sind unmittelbar nach ihrer Herstellung sehr reich an Präzipitinogen. Schon nach sehr kurzer Zeit geht jedoch das Vermögen, mit Immunserum Präzipitate zu bilden, verloren. Die Komplementbindung ist dagegen, wie Wassermann und Bruck[214]) zuerst zeigten, in gleicher Weise mit frischen, wie mit alten Antigenen zu erreichen. Es

ist jedoch hierzu zu bemerken, daß meist die Antigene sich in den ersten acht Tagen etwas abschwächen und dann erst konstant werden. Die Aufbewahrung von Extrakten hat in braunen Flaschen im Eisschrank zu erfolgen. Beim Abstehen bildet sich meist ein Bodensatz. Man vermeide es, beim Herausnehmen eines Extrakts, ihn aufzuschütteln, entnehme vielmehr für den Gebrauch mit einer sterilen Pipette vorsichtig von der obenstehenden Flüssigkeit oder, was noch mehr zu empfehlen ist, gieße vorsichtig von der oben stehenden Flüssigkeit ab. Die Zeit, die ein Extrakt außerhalb des Eisschranks und am Tageslicht verweilt, ist auf das unbedingte Minimum zu begrenzen.

2. Das Antiserum wird stets durch halbstündiges Erhitzen auf 56° C inaktiviert, auch wenn es sich um ein altes Serum handelt, das kein freies Komplement mehr enthält. Alte komplementfreie Sera hemmen oft selbst die Hämolyse. Bei der Erhitzung verschwindet dieses spontane Komplementbindungsvermögen meist. Man hüte sich vor Temperaturen über 60°, sowie vor zu langem Erhitzen der Sera, weil auch hierdurch das Serum die Hämolyse hemmende Eigenschaften gewinnen kann. Sehr wichtig ist, daß zum Inaktivieren nur ganz klare Sera genommen werden. Inaktiviert man Sera, die noch Erythrocyten enthalten, so hemmen solche Sera oft allein die Hämolyse. Chylöse Sera, wie man sie während der Verdauung findet, sowie die milchigen Sera säugender Frauen verhalten sich wie normale. Ebenso wie Serum sind Exsudate und Transsudate zu behandeln. Manche Exsudate sind jedoch so eiweißreich, daß sich beim Inaktivieren starke Ausfällungen ergeben, wobei die Antistoffe mitgerissen werden können. Hier versuche man eventuell durch vorheriges Verdünnen der Exsudate mit physiologischer Kochsalzlösung der Schwierigkeit Herr zu werden. Lumbalflüssigkeiten sind meist sehr komplement- und zugleich eiweißarm und können deshalb oft ohne Inaktivierung benutzt werden.

3. Als Komplement wird ausschließlich Meerschweinchenserum benutzt.

Zu diesem Zwecke entblutet man ein normales Meerschweinchen aus der Halsvene und läßt das Blut direkt in ein Zentrifugenglas laufen und dort gerinnen. Hierauf löst man den Blutkuchen mit einem Glasstab vom Rand ab und zentrifugiert, bis das obenstehende Serum klar ist. Das Meerschweinchenserum ist meist dunkelrot. Chylöse Sera sind meist ebenso gut zu verwenden. Die Sera können auch 24 Stunden im Eisschrank aufgehoben werden. Längeres Aufbewahren im Eisschrank vermindert den Komplementsgehalt sehr schnell. Will man Komplement konservieren, so empfiehlt es sich, die Sera in dem von MORGENROTH konstruierten Gefrierapparat „Frigo" (Firma F. & M. Lautenschläger, Berlin) einfrieren zu lassen. FRIEDBERGER[80, 81]) hat neuerdings angegeben, daß man durch Salzzusatz Komplemente haltbar machen kann, jedoch liegen über die Verwendbarkeit solcher Komplemente für die BORDET-GENGOUsche Reaktion noch keine Erfahrungen vor.

4. Als Hämolysin empfiehlt sich die Verwendung des Serums eines Kaninchens, das in Intervallen von 5 Tagen 3—4 intravenöse Injektionen von 0,5—1,5 ccm gewaschenen Hammel-, Rinder- oder Ziegenblutkörperchen, in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt, erhalten hat. Es empfiehlt sich, die Blutkörperchen ganz langsam einzuspritzen. Die meisten Kaninchen bekommen so einen sehr hohen hämolytischen Titer. Man verwende nur solche Sera, deren Titer annähernd 1:1000 ist.

5. Die Erythrocyten werden von dem Tier genommen, dessen Blut zur Immunisierung des Kaninchens gedient hat.

Das Blut wird in der bereits oben beschriebenen Weise gewaschen. Diese Prozedur wird 2 bis 3 mal wiederholt, um jede Spur von Komplement zu beseitigen. Hierauf stellt man sich aus dem beim Zentrifugieren entstandenen Bodensatz eine 5%ige Aufschwemmung her, indem man mit einer geschlossenen Pipette bis auf den Grund geht, so die Erythrocyten herausnimmt und dann auf 1 ccm Blutkörperchen 19 ccm 0,85% NaCl-Lösung gibt.

Die 5 Substanzen werden in der Weise zu einander zugesetzt, daß man das Antigen, das inaktive Antiserum und das Komplement miteinander mischt und auf 1 Stunde in den Brutschrank zur Bindung bringt. Hierauf setzt man das hämolytische Serum und die gewaschenen Erythrocyten zu, schüttelt das Ganze und bringt es wieder in den Brutschrank für 2 Stunden, sodann gelangen die Versuchsröhrchen in den Eisschrank bis zum nächsten Tage. Dort setzen sich in den Röhrchen, in denen die Bordet-Gengousche Reaktion eingetreten, also keine Hämolyse erfolgt ist, die Blutkörperchen agglutiniert zu Boden, während in den anderen Reagenzgläsern, in denen die Komplementfixation ausgeblieben war, die Hämolyse eintritt

Bei der Anstellung von Komplementbindungsversuchen spielen wie bei allen Immunitätsreaktionen quantitative Verhältnisse eine sehr große Rolle. Nur, wenn die nötigen Mengenverhältnisse eingehalten werden, erhält man Resultate, die zu verwenden sind. Wichtig ist besonders die Tatsache, daß die als Antigen sowie als Antiserum zur Verwendung gelangenden Substanzen in gewissen Mengenverhältnissen allein bereits Komplement binden können. Sie teilen diese Fähigkeit mit zahlreichen Substanzen der verschiedensten Art, so haben Wilde[243, 244]) für erhitzte Bakterienemulsionen und Aleuronat, v. Dungern[55]) für Hefe, v. Lingelsheim[134]) für Karrageenschleim, Wendelstadt[234]) für Glykogen, Inulin, Wittepepton, Wassermann und Bruck[217]) für Tuberkulin, Citron[33]) für natürliche und künstliche Aggressine, Landsteiner und Stankowic[108]) für Kolloide, Wassermann und Citron[222]) für Öl, Lecithin, Albumosen und verschiedene Peptone und Uhlenhuth[211]), sowie andere Autoren für zahlreiche weitere Subtanzen das Komplementbindungsvermögen bewiesen.

Diese Erscheinung hat zu einer gewissen Verwirrung und Unsicherheit geführt, weshalb wir hier kurz auf diesen Punkt eingehen müssen. Zunächst ist zu bemerken, daß nicht alle oben erwähnten Substanzen in gleicher Weise auf das Komplement wirken. Während wir bei einigen dieser Substanzen eine rein physikalische Absorption annehmen müssen, handelt es sich bei anderen um eine echte biologische Komplementbindung, die nur scheinbar ohne Vermittlung eines Ambozeptors durch das Antigen selbst erfolgt. Es wird hierbei oft übersehen, daß wir garnicht in der Lage sind, Antigen und Komplement allein mit einander zu mischen, weil in dem komplementhaltigen Normalserum stets außer dem Komplement auch Normalambozeptor vorhanden ist. Es entsteht nun die Frage, ob und wie die rein physikalische Absorption von der biologischen Bindung zu unterscheiden ist. Der Weg, den Wassermann und Citron[222]) zur Entscheidung dieser Frage einschlugen, war folgender: Da die Komplementbindung proportional der Menge der bindenden resp. absorbierenden Substanz zu sein pflegt, so stellten sie diejenige Menge der zu untersuchenden Substanz fest,

die nicht mehr ausreicht, um für sich allein Komplemente zu fixieren. Es ist dies die „unterbindende“ Dosis. Hierauf setzten sie inaktives Normalserum und Komplement zu der unterbindenden Dosis zu, d. h. sie wiederholten den Versuch mit der Abänderung, daß sie die Zahl der Normalambozeptoren vermehrten. In den Fällen nun, in denen unter dem Einfluß der vermehrten Normalambozeptoren die unterbindende Dosis der untersuchten Substanz deutlich Komplement zu binden vermag, liegt der Gedanke nahe, daß es sich um einen biologischen Vorgang handelt, während man beim Ausbleiben der Komplementbindung annehmen darf, daß die bei höherer Dosis der untersuchten Substanz auftretende Komplementfixation keine biologische Reaktion ist.

Es ergibt sich hieraus als selbstverständliche Konsequenz, daß man von jeder Substanz sich zunächst überzeugt, ob und in welchem Grade sie ohne Zusatz eines inaktiven Normal- oder Immunserums Komplement zu binden vermag. Es genügt jedoch keineswegs eine derartige Bestimmung einmal zu machen und das so gewonnene Resultat dann als feststehende Norm anzusehen. Es liegt vielmehr in dem Wesen der Methodik begründet, daß die unterbindende Dosis schwankt, selbst wenn es sich um Substanzen handelt, die nicht in sich selbst die Ursache zu Veränderungen tragen, oder unter dem Einfluß der Atmosphäre, von Licht und Temperatur solche eingehen. Alle mit der Komplementbindungsmethode möglichen Resultate sind nur relative Werte, sie drücken das Verhältnis der Bindungsaffinität zwischen dem Komplex von Antigen + Ambozeptor und dem Komplex Hämolysin + Blut zum Komplement aus. Da nun von den fünf in Betracht kommenden Faktoren (Antigen, Ambozeptor, Komplement, Hämolysin und Blut) selbst bei genauester Arbeitstechnik einige Schwankungen unterliegen, so ergibt sich daraus die Unmöglichkeit, Werte, die an einem Tage gefunden werden, ohne weiteres auf einen andern Tag zu übertragen.

Hat man die unterbindende Dosis des Antigens festgestellt, so muß man in gleicher Weise sich überzeugen, daß das Antiserum nicht Komplement bindet, resp. feststellen, welches die unterbindende Dosis desselben ist. Die meisten inaktiven Menschen-, Kaninchen- und Pferdesera binden, wenn sie richtig (s. o.) inaktiviert sind, in den am häufigsten gebrauchten Dosen von 0,2 ccm und 0,1 ccm kein Komplement. Jedoch gibt es auch unter gewissen pathologischen Bedingungen antikomplementäre Sera. Ich habe solche Sera bei Menschen am häufigsten bei sekundärer Lues, Tabes, Lebererkrankungen und Typhus, andere Autoren namentlich auch bei Urämie gefunden. v. BERGMANN und SAVINI[13]) fanden, daß man bei der experimentellen Phosphorvergiftung, im Hungerzustand und unter verschiedenen anderen pathologischen Bedingungen antikomplementär wirkende Sera antrifft. Ob es sich hier um besondere Antikomplemente oder um Vermehrung resp. um Verminderung bestimmter normaler Serumsubstanzen handelt, ist zurzeit völlig unaufgeklärt. Es ist auch die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß es sich hierbei um Sera handelt, in denen Antigen und Antikörper gleichzeitig kreisen. Hierfür könnte man folgende Beobachtungen von CITRON[34]) anführen. Versetzt man ein Hogcholeraserum, welches kein Komplement bindet, mit Hogcholerabazillen und läßt diese Mischung 2 resp. 48 Stunden auf Eis stehen, zentrifugiert dann die Bazillen ab und prüft das klare, bakterienfreie Serum auf Komplementbindung, so zeigt sich, daß das Serum, das nur 2 Stunden sich mit den Bakterien binden konnte, die Hämolyse nicht zu hemmen vermag, während das zweite

Serum, das 48 Stunden mit den Bakterien zusammen war, stark antikomplementär geworden ist. Citron deutete dieses Phänomen so, daß ebenso wie Serumsubstanzen sich mit dem Antigen verbinden können (Sensibilisierung des Antigens), daß ebenso, wenn auch langsamer der umgekehrte Vorgang erfolgen kann, daß Bakteriensubstanz sich mit dem Serum verbindet, wodurch dieses antikomplementär wird, d. h. Komplement bindet.

Ist vom Antigen, sowie vom Antiserum, die unterbindende Dosis festgestellt, so mischt man diese nur in solchen Mengen, daß die Summe beider immer noch eine unterbindende Dosis ist, also z. B. folgendermaßen. Findet man, daß 0,2 ccm Tuberkulin 0,1 ccm Komplement bindet, 0,15 ccm Tuberkulin dagegen es nicht mehr tut, und stellt man andererseits fest, daß 0,5 ccm eines Tuberkuloseserums 0,1 ccm Komplement bindet, 0,4 ccm Serum dagegen es nicht mehr tut, so darf man nicht etwa 0,15 ccm Tuberkulin und 0,4 Tuberkuloseserum mit einander mischen. Denn es bestände die Möglichkeit, daß im Tuberkuloseserum freies Tuberkulin kreiste, das sich zu den 0,15 ccm Tuberkulin zuaddieren könnte, so daß dieses nun zur hemmenden Dosis würde. Ein solcher Einwand ist in der Tat gegen Versuche von Wassermann und Bruck[217]) über das Vorhandensein von Antituberkulin in tuberkulösen Organen von Weil und Nakayama[230]) erhoben worden. Man vermeidet diesen „Summierungseinwand" in der Art, daß man nur solche Mengen Antigen und Antiserum verwendet, daß selbst das zweifache der gebrauchten Dosis noch unterhalb der hemmenden Menge liegt. Wir würden also in unserem Beispiel 0,075 ccm Tuberkulin und 0,2 ccm Tuberkuloseserum verwenden. Nehmen wir jetzt selbst den ungünstigsten denkbaren Fall an, daß in unserem Tuberkuloseserum ungeheure Mengen Tuberkulin wären, so können wir doch rein logisch folgenden Schluß machen. Da 0,4 ccm Antiserum und 0,15 ccm Tuberkulin die gerade unterhemmenden Dosen sind, so kann höchstens 0,15 ccm Tuberkulin in 0,4 ccm Serum enthalten sein, sonst müßte dieses Serum allein schon Komplement binden. Ist aber in 0,4 ccm Serum 0,15 ccm Tuberkulin, dann ist in 0,2 ccm Serum 0,075 ccm Tuberkulin, mischt man also 0,075 ccm Tuberkulin mit 0,2 ccm Serum, dann hat man 0,15 ccm Tuberkulin bei der Addition, dieses ist aber noch eine unterbindende Dosis, es müßte also Hämolyse eintreten. Erfolgt diese nun doch nicht, dann ist bewiesen, daß der Summierungseinwand nichtig ist, daß vielmehr eine durch das Zusammentreffen von Antigen + Ambozeptor erfolgte biologische Komplementbindung erfolgt ist

Das Komplement verwendet die Wassermannsche Schule stets in der Menge von 0,1 ccm.

Bezüglich des Hämolysins sind folgende Regeln wichtig. Gleich nach der Entnahme fülle man das Serum zu je 1—2 ccm in Reagenzgläschen ab und inaktiviere es so. Hierauf versieht man die Gläschen mit einer Gummikappe und bewahrt sie im Eisschrank auf.

Der Titer wird gleich am Entnahmetage bestimmt. Dies geschieht nach folgendem Schema:

(Siehe Tabelle pag. 1089.)

Der Titer ist also in diesem Falle zwischen 1:2000 und 1:2500 gelegen.

Man verwende nun zu den Komplementsbindungsversuchen stets die doppelte Titerdosis, das würde also bei diesem Serum die Verdünnung 1:1000 sein. Meier[141]) und Michaelis[148]) empfehlen die dreifache Titerdosis zu nehmen.

Beispiel einer Bestimmung des hämolytischen Titers.

5 % Hammelblutkörper	Inakt. hämol. Serum	Komplement 1:10	0,85 % NaCl-Lösung	Resultat nach 2 St. Brutschrank
1 ccm	1 ccm 1 : 100	1 ccm	2 ccm	kompl. Hämolyse
do.	desgl. 1 : 500	do.	do.	do.
do.	desgl. 1 : 1000	do.	do.	do.
do.	desgl. 1 : 2000	do.	do.	do.
do.	desgl. 1 : 2500	do.	do.	inkompl. Hämolyse

Bei der Aufbewahrung des hämolytischen Serums schwächt sich der Titer meist schon in den ersten vier Tagen etwas ab, bleibt dann aber einige Wochen konstant. Man wiederhole deswegen nach Ablauf von vier Tagen noch einmal die Titration des Hämolysins.

Die verschiedenen hämolytischen Sera zeigen nun, abgesehen von der Differenz im Titer, auch noch einen zweiten Unterschied, dessen Kenntnis wichtig ist, da der Ausfall der BORDET-GENGOUschen Reaktion sehr wesentlich dadurch beeinflußt werden kann, nämlich einen Unterschied bezüglich ihrer Avidität zum Komplement. Es gibt z. B. hämolytische Sera vom Titer 1:1000, bei denen die Hämolyse in wenigen Minuten erfolgt, während ein anderes Serum vom gleichen Titer zwei Stunden hierzu nötig hat. Die Aviditätsdifferenzen zeigen sich noch deutlicher in dem Auftreten von Hemmungen respektive deren Ausbleiben bei Zusatz von anderen Komplement bindenden Substanzen. So kann unter Umständen die gleiche Menge 0,1 ccm einer Probe Tuberkulin die Hämolyse in einem Fall stark hemmen, während bei der Verwendung eines anderen hämolytischen Serums von anscheinend gleichem Titer die Hämolyse nicht beeinflußt wird. Die Komplementbindungsmethode gibt uns, wie bereits oben auseinandergesetzt, eben nur an, ob die Avidität des Komplements zu dem Komplex Antigen-Ambozeptor oder zu dem Komplex Hämolysin-Erythrozyten größer ist. Wichtig ist nun, daß je länger ein Antigen mit seinem Ambozeptor sich binden kann, desto stärker seine Affinität für das Komplement wird. Demnach kann man also auch bei einem hämolytischen Serum seine Affinität zum Komplement erhöhen, indem man die Erythrozyten und das Hämolysin bereits vorher auf einander einwirken läßt. Diesen Vorgang bezeichnet man nach BORDET als Sensibilisierung der Erythrozyten.

Von den fünf Substanzen, die zur BORDET-GENGOUschen Reaktion nötig sind, nehme man stets gleiche Volumina. Man bringe deshalb jede von ihnen auf 1 ccm. Das Gesamtvolumen in jedem Röhrchen muß demnach 5 ccm sein.

Wenn man also in einem Röhrchen 0,1 ccm Antigen, 0,2 ccm Antiserum, 0,1 ccm Komplement, 0,001 ccm Hämolysin und 5 % Blut mischen will, so mache man dies folgendermaßen:

1 ccm Antigenverdünnung 1:10, 1 ccm Antiserumverdünnung 1:5, 1 ccm Komplementverdünnung 1:10, 1 ccm Hämolysinverdünnung 1:1000 und 1 ccm 5 % Blut. Alle Verdünnungen werden mit 0,85 %iger NaCl-Lösung gemacht. Fallen, wie bei den Kontrollen, eine oder mehrere der

fünf Substanzen aus, so muß man an deren Stelle je 1 ccm 0,85 %ige Kochsalzlösung setzen. Nachdem man Antigen, Antiserum und Komplement gemischt hat, muß man den 3 Substanzen Zeit geben, sich zu binden. Man stellt deshalb die Röhrchen auf eine Stunde in den Brutschrank. Hierauf setzt man das Hämolysin und das gewaschene Indikatorblut zu, schüttelt gut durch und stellt das ganze wieder in den Brutschrank, bis die Reaktion abgelaufen ist. Wassermann und Bruck[214]) geben hier die bestimmte Zeit von zwei Stunden an und bringen dann den Versuch in den Eisschrank bis zum nächsten Tag. Diese Angabe ist jedoch willkürlich. Allgemein gesprochen, kann man sagen, die Reaktion ist dann abgelaufen, wenn alle Kontrollen, in denen eine Lösung erfolgen muß, gelöst sind, die Röhrchen dagegen, in denen Komplementbindung zu erwarten war, keine Hämolyse oder eine unvollkommene Hämolyse, die nicht oder nur sehr langsam weiter geht, zeigen. Der Zeitpunkt, in dem dies erfolgt, ist sehr verschieden und muß für jedes Hämolysin erprobt werden. Man kann die Schnelligkeit und Intensität der Reaktion dadurch beeinflussen, daß man die Erythrozyten mehr oder weniger lang sensibilisiert oder aber, daß man an Stelle der doppelt lösenden Dosis Hämolysin die $2^1/_2$—3fache Dosis nimmt. Bei sehr hoher Avidität eines hämolytischen Serums ist es oft ratsam, nur die $1^1/_2$fache Dosis zu wählen.

Für die Beurteilung der Versuchsresultate sind die Kontrollen von entscheidender Wichtigkeit. Die Kontrollen müssen den Nachweis erbringen, daß weder das Antigen noch das Antiserum allein, noch die Kombination des Antigens mit normalem Serum der gleichen Tierart oder die Kombination des Antiserums mit einem heterologen Antigen Komplement in nennenswertem Masse binden, daß dagegen eine starke Komplementbindung erfolgt, wenn das Antigen mit einem sicheren homologen Antiserum zusammentritt. Ferner muß durch Kontrollen die Güte des hämolytischen Systems, sowie die Isotonie der Kochsalzlösung festgestellt werden. Endlich müssen durch Kontrollen bestimmte Fehlerquellen ausgeschaltet oder in ihrem Werte erkannt werden, die durch besondere Eigenschaften des Antigens und des Antiserums bedingt sein können. Hier kommt insbesondere die hämolytische Wirksamkeit mancher Antigene und Sera in Betracht.

Hieraus ergibt sich für einen vollständigen Komplementbindungsversuch mit allen Kontrollen folgendes Schema.

(Siehe Tabelle pag. 1091.)

Die Kontrollen 12—14 sind besonders bei Kaninchenserum wichtig, weil dieses bisweilen sehr stark hämolytisch auf Hammelblut wirken kann. In solchem Fall kann dann eine schwache Komplementbindung gelegentlich nicht zum Ausdruck gelangen, weil sich das Normalhämolysin zum Immunhämolysin summiert, wodurch die Affinität des hämolytischen Komplexes zum Komplement gesteigert wird.

(Siehe Tabelle pag. 1091.)

Im übrigen bleibt das obige Schema in Geltung. Nur Nr. 11 erhält eine Ergänzung durch 11a, indem verdächtiges und sicheres Antigen auf eventuell vorhandenes hämolytisches Vermögen geprüft werden.

1. Untersuchung eines einer Infektionskrankheit verdächtigen Serums, bei dem die BORDET-GENGOUsche Reaktion positiv ausfällt.

	Resultat der Hämolyse
1. Antigen + inakt. verdächt. Serum + Kompl. (1 Std. bei 37° C) + Hämolysin + Blut	0 oder inkomplett
a) abfallende Mengen Antigen und konstante Mengen Serum	
b) konstante Mengen Antigen und abfallende Mengen Serum	
2. Antigen + inakt. sicheres Immunser. + Kompl. (1 Std. bei 37° C) + Hämolysin + Blut	0 oder inkomplett
a) und b) wie oben.	
3. Antigen + inakt. Normalser. + Kompl. (1 Std. bei 37° C) + Hämolysin + Blut	fast komplett oder komplett
a) und b) wie oben.	
4. Doppelte Menge Antigen*) + Kompl. (1 Std. bei 37° C) + Hämolysin + Blut	komplett
5. Doppelte Menge verdächt. Serum*) + Kompl. (1 Std. bei 37° C) + Hämolysin + Blut	komplett
6. Doppelte Menge Immunser.*) + Kompl. (1 Std. bei 37° C) + Hämolysin + Blut	komplett
7. Doppelte Menge Normalser.*) + Kompl. (1 Std. bei 37° C) + Hämolysin + Blut.	komplett
8. Komplement + Hämolysin + Blut	komplett
9. Komplement + Blut	0
10. Kochsalzlösung + Blut	0
11. Antigen + Blut	0 od. schwache Hämolyse
12. Inakt. verdächt. Serum + Komplement + Blut	0 od. schwache Hämolyse
13. Inakt. Immunser. + Komplement + Blut	0 od. schwache Hämolyse
14. Inakt. Normalser. + Komplement + Blut	0 od. schwache Hämolyse

2. Untersuchung eines verdächtigen Antigens, bei dem die Reaktion den Verdacht bestätigt.

	Resultat der Hämolyse
1. Verdächt. Antigen + sicher. Immunserum + Komplement + Hämolysin + Blut. a) und b) wie oben . . .	0
2. Verdächt. Antigen + inakt. Normalser. + Komplement + Hämolysin + Blut. a) und b) wie oben . . .	komplett
3. Sicheres Antigen + sicheres Immunser. + Komplement + Hämolysin + Blut. a) und b) wie oben	0
3a. Sicheres Antigen + inakt. Normalser. + Komplement + Hämolysin + Blut	komplett

*) Anmerkung. Es empfiehlt sich, außer der doppelten Menge Serum resp. Antigen auch die einfache Menge als Kontrolle zu nehmen, weil in seltenen Fällen die doppelte Menge auf Grund ihrer eigenen hämolytischen Fähigkeiten komplette Hämolyse geben kann, während die einfache Menge die Hämolyse hemmt.

Ergebnisse der Wassermann-Bruckschen Methodik.

Ebenso wie die ursprüngliche Methodik von Bordet und Gengou mannigfache praktische Anwendung (s. o. pag. 1083) gefunden hat, so ist dies in noch höherem Maße auch bei der Wassermann-Bruckschen Modifikation der Fall. Die Ergebnisse der meisten Autoren sind günstig und sprechen dafür, daß die Reaktion in hohem Maße spezifisch ist und daß besonders der Antikörpernachweis leicht gelingt. Es fehlt jedoch auch nicht an vereinzelten absprechenden Urteilen. Untersucht wurden nachstehende Infektionserreger resp. die durch diese Bakterien erregten Erkrankungen.

Meningitis cerebrospinalis epidemica. Bruck[26]) und Citron[36]) fanden in der Lumbalflüssigkeit von Meningitikern Meningokokkenantigen respektive Antikörper. Es handelt sich nicht um ein regelmäßiges Vorkommen, jedoch gelang es einige Male auf diesem Wege die Diagnose zu sichern.

Für den Nachweis des Antigens in vivo nehme man Dosen von 0,5 ccm; 0,4 ccm; 0,3 ccm; 0,2 ccm aktive Lumbalflüssigkeit, die nicht vorher zentrifugiert werden darf; je + 0,1 ccm hochwertiges inaktives Meningokokkenserum vom Pferde. Unbedingt notwendig sind Kontrollversuche mit mindestens 3 Lumbalflüssigkeiten von Nichtmeningitikern + Meningokokkenserum; ferner die Prüfung der auf Meningitis verdächtigen Lumbalflüssigkeit mit einem heterologen Pferdeimmunserum (Typhus-, Cholera-serum) und mit einem normalen Pferdeserum.

Kutscher[107]) versuchte ohne Erfolg die Differenzierung von Meningokokken und Pseudomeningokokken mit künstlichem Immunserum.

Tuberkulose. Wassermann und Bruck[217, 221]) fanden, daß Tuberkulöse, die längere Zeit mit Tuberkulin behandelt werden, vielfach Antituberkulin im Serum haben. Bei Tuberkulösen, die nicht mit Tuberkulin behandelt werden, ist meist kein Antituberkulin im Serum nachweisbar. Gelegentlich kann es sich jedoch auch bei solchen Kranken finden (Citron[38]), Lüdke[136, 137]). Auch in der Pleuraflüssigkeit kann Antituberkulin vorkommen (Citron). Morgenroth und Rabinowitsch[160]) hatten bei ihrer Nachprüfung der Wassermann-Bruckschen Arbeit nur negative Resultate. Bruck[26]) fand bei einem Falle von Miliaturberkulose abwechselnd erst Tuberkulin, dann Antituberkulin im Serum. Dagegen konnte K. Meyer[146]) in pleuritischen Flüssigkeiten kein Tuberkuloseantigen nachweisen.

Gonokokkenallgemeinerkrankungen. Müller und Oppenheim[165]), Bruck[27]), Albarran und Jungano[1]) wiesen bei gonorrhoischer Arthritis, Iridocylitis usw. Gonokokkenantikörper im Blutserum nach. Bruck und Vannod[212]) machten den gleichen Befund bei Tieren, die mit Gonokokken respektive Gonokokkennukleoproteid behandelt wurden. Nach Bruck kann man mit der Bordet-Gengouschen Reaktion Gonokokken und Meningokokken von einander differenzieren.

Typhus. H. Hirschfeld[93]) untersuchte 15 Typhusfälle und fand regelmäßig Antikörper im Blut. Der früheste Krankheitstag, an dem die Reaktion positiv ausfiel, war der 6.—8. Bei zwei Fällen, in denen die Agglutination nach Widal negativ war, ergab die Komplementbindungsmethode ein positives Resultat (vgl. Widal und Lesourd, pag. 1083). Leuchs und Schöne[132]) bestätigen diese Angaben. Bei Tieren, die mit Typhus immunisiert wurden, erzielten positive Resultate Wassermann und

BRUCK[214]), LEUCHS[131]) und MORESCHI[159]). Dagegen gibt MORESCHI an, daß er ebenso wie mit Typhusbakterien auch mit Typhusbakterienextrakten bei Typhösen keine positive Komplementbindungsreaktion erzielen konnte.

Schweinepest- und Paratyphusbazillen. Positive Versuche von CITRON[33]) und LEUCHS[131]) mit Serum von experimentell infizierten Tieren und Bakterienextrakten.

Schweineseuchebazillen: CITRON[33]), positive Resultate.

Kapselbakterien versuchten BALLNER und RAIBMEYER[7, 8]).

Cholera- und choleraähnliche Vibrionen versuchte SCHÜTZE[203]) ohne Erfolg zu differenzieren.

Die Austitrierung von Seren.

Die Komplementbindungsmethode dient nicht nur dazu, die Diagnosenstellung zu sichern, sondern man kann sie auch benutzen, um quantitative Untersuchungen über die Mengen von Antigen und Antikörper anzustellen. Die quantitative Diagnostik ist um so wichtiger, weil gegen die meisten Infektionsstoffe sich schon im normalen Serum Antikörper finden, die sich nur durch ihre geringere Menge (und eventuell auch geringere Avidität) von den im Immunserum vorkommenden unterscheiden lassen. Man kann sich demnach nicht begnügen, eine einzige Dosis Antigen und Antikörper zu mischen, sondern man muß Serien anlegen, indem man entweder eine konstante Serummenge wählt und das Antigen in fallenden Mengen zusetzt oder umgekehrt verfährt. Es ist nicht ganz gleichgültig, welche der beiden Substanzen man verdünnt. Nur die Erfahrung kann hier ausschlaggebend sein. Im allgemeinen scheint sich für die Serodiagnostik der Infektionskrankheiten die konstante Menge Antigen bei abfallenden Mengen Serum mehr zu bewähren. Bei der Eiweißdifferenzierung liegen die Verhältnisse dagegen umgekehrt. Die Frage, ob die Austitrierung an komplementbindenden Substanzen in einem Immunserum Rückschlüsse auf die Heilwirkung des Serums erlaubt, wie dies KOLLE und WASSERMANN[104]) für das Meningokokkenserum annehmen, ist zurzeit noch Gegenstand der Diskussion, wird jedoch von den meisten Autoren verneint. (BESREDKA[14]), NEDRIGAILOFF[168]), OTTO[179]), KRAUS[105a]), CITRON[40a]), FR. MEYER[145])).

2. Die Diagnostik der Infektionskrankheiten mit unbekannten, resp. nicht züchtbaren Erregern.

a) Die WASSERMANNsche Serodiagnostik der Syphilis (WASSERMANNsche Reaktion).

1. Das Wesen der Reaktion.

Die wichtigste Anwendung findet die Komplementbindungsmethode zur Serodiagnostik der Syphilis, die durch die Arbeiten von A. WASSERMANN, NEISSER und BRUCK[218, 219]) prinzipiell begründet und von CITRON[36, 37, 40, 41, 46, 48]) in ihrer Allgemeingültigkeit für alle Formen und Stadien der Syphilis bewiesen und daraufhin zur Erkennung von Krankheiten unklarer Ätiologie, sowie zur Unterscheidung der aktiven von der inaktiven Lues in die klinische Praxis eingeführt wurde, nachdem WASSERMANN und PLAUT[220, 185]), MARIE und LEVADITI[139, 122]), MORGENROTH und STERTZ[161]) bereits für einen Einzelfall, die Paralysis progressiva, das

konstante Vorkommen der komplementbindenden Substanzen in der Lumbalflüssigkeit festgestellt hatten.

Da der Syphiliserreger in Reinkultur nicht zu erlangen ist, so kann man als Antigen nicht das syphilitische Virus selbst verwenden. Wassermann, Neisser und Bruck nahmen deshalb dazu sicher syphilitische Organe (Primäraffekte, Papeln, Organe hereditär-syphilitischer Föten, sowie infizierter Affen), die sie in noch näher zu bezeichnender Weise extrahierten. Hierbei supponierten sie zunächst, daß sich in diesen Organen das Virus finde und daß der Extrakt außer den normalen Organsubstanzen spezifisch syphilitische Substanzen enthalte. Der weitere Schluß, der sich hieraus ergab, war der, daß auch die Substanzen, die sich im Blutserum der Syphilitiker finden und die mit den Extrakten syphilitischer Organe die Komplementbindung zeigen, Antikörper gegen ein für Syphilis charakteristisches Antigen darstellen, das in den syphilitischen Organen enthalten ist. Während nun einzelne Autoren wie vor allem Neisser, Bruck und Schucht[169, 170]), sowie Bab[4]) das in den Extrakten vorhandene Antigen als gelöste Spirochätensubstanz ansprachen und dementsprechend im Blutserum der Syphilitiker Spirochätenantikörper annahmen, drückten sich Wassermann und Plaut[220]), Marie und Levaditi[139]), Citron[36, 40]) Landsteiner[112]), und die meisten anderen Autoren von allem Anfang an zurückhaltend aus. Gewisse Beobachtungen über Komplementbindung zwischen Extrakten aus normalen Organen und Syphilitikerserum, die von Kraus und Volk[105]) und Marie und Levaditi[139]) mitgeteilt und allseits bestätigt wurden, legten zuerst den Gedanken nahe, daß es sich möglicher Weise bei dem „Luesantigen" nicht um den Erreger der Syphilis handelt, sondern, daß eine auch normal sich findende Substanz entweder selbst das Antigen ist (Weil[232], Bruck und Stern[30]) oder neben und mit einem unbekannten Antigen zusammen die Reaktion auslöst.

Auf die Anregung Wassermanns unternahmen Porges und Meier[189]), [190]), [191]) und gleichzeitig unabhängig von den genannten Autoren Landsteiner, Müller und Poetzl[110]), [111]) Versuche, um die chemische Natur der antigenen Substanz aufzuklären. Es ergab sich, daß man mit Alkohol aus luetischen und normalen Organen von Menschen und Tieren eine Substanz resp. ein Gemisch von Substanzen erhalten kann, welches mit luetischem Serum, aber nicht mit normalem Serum die Komplementbindungsreaktion gab. Die Alkohollöslichkeit veranlaßte die Autoren, an die Lipoide als die wirksame Substanz zu denken. In der Tat führten auch die Versuche von Porges und Meier zu dem Ergebnis, daß das Lecithin bis zu einem gewissen Grade das Luesantigen ersetzen kann.

Diese neuen Befunde seiner Mitarbeiter veranlaßten Wassermann[226]) die bisherige Anschauung, daß es sich bei der Seroreaktion der Syphilis um ein Zusammentreten von Antigen und Antikörper handle, ganz fallen zu lassen. Anknüpfend an die lange bekannten Beziehungen zwischen Lecithin und vielen Toxinen, besonders den tierischen Giften, sah Wassermann nun in den spezifischen Substanzen des Luetikerserums nicht mehr Antikörper, sondern ein Toxin, das sich mit dem Lecithin verbindet, wobei eine kolloidale Substanz entsteht, die Avidität für Komplement hat.

Diese geistreiche Hypothese Wassermanns fand die Zustimmung einiger Autoren (Peritz[180]) und andere), wird aber von der Mehrzahl der Forscher nicht geteilt, ja jetzt von Wassermann[223]) selbst anscheinend nicht mehr vertreten.

LEVADITI und YAMANOUCHI[125], [126]) fanden dann weiterhin, daß man das alkoholische Luesantigen mit Äther nicht extrahieren könne. WEIL und BRAUN[237]) bestätigten diesen Befund für Petroläther. Die Unlöslichkeit in Äther ließ LEVADITI und YAMANOUCHI an die gallensauren Salze denken. In der Tat gelang es ihnen auch, bei Verwendung von käuflichem Natrium taurocholicum und Natrium glycocholicum die gleiche Reaktion wie mit Luesantigen zu erzielen. An Zuverlässigkeit sollte diese Reaktion die mit Lecithin übertreffen. Jedoch haben Nachprüfungen gezeigt, daß die gallensauren Salze ebenso inkonstante Resultate liefern wie das Lecithin.

Um diese Versuche richtig zu bewerten, ist vor allem darauf hinzuweisen, daß weder das käufliche Lecithin noch die käuflichen gallensauren Salze der Autoren Anspruch auf chemische Reinheit erheben dürfen, vielmehr handelt es sich stets um ein Gemisch von Lipoiden und Salzen. Es dürfen deswegen keineswegs die Resultate, die mit diesen Präparaten erzielt worden sind, ohne weiteres auf reines Lecithin oder synthetisch gewonnene gallensauren Salze übertragen werden.

Im Anschluß an diese Befunde wurden von verschiedenen Autoren andere Lipoide (Cholestearin), Seifen (ölsaueres Natron) und andere Substanzen (Vaselin) darauf geprüft, ob sie mit luetischem Serum Komplementbindung geben. Es zeigte sich, daß eine ganze Reihe von Fetten und fettähnlichen Substanzen sich mehr oder weniger wie das Lecithin verhielten. Keine dieser Substanzen hat jedoch für die praktische Serodiagnostik der Lues Bedeutung und allgemeine Anerkennung gewinnen können.

Diese Befunde führten, wie erwähnt, viele Autoren, zuerst WASSERMANN[226]) dazu, die Antigenantikörperhypothese, die für alle Komplementbindungsversuche bei Infektionskrankheiten allgemeine Anerkennung genießt, bei der Lues auszuschließen, der WASSERMANNschen Reaktion also eine Sonderstellung einzuräumen. Der Hauptgrund hierfür war die Auffassung, daß alle Antigene Eiweißsubstanzen oder doch wenigstens Derivate von solchen sein müßten. Für das Lecithin und Öl hatten ganz speziell Versuche von WASSERMANN und CITRON[222]) bewiesen, daß es durch Vorbehandlung mit diesen Stoffen bei Kaninchen nicht gelingt, komplementbindende Antikörper (Reagine) zu erzeugen. Es muß jedoch sehr fraglich erscheinen, ob diese Versuche zu dem weiteren Schluß berechtigen, daß alle Lipoide und besonders auch die Lipoideiweißverbindungen keine Antigene sein können. Die bekannten Versuche von METALLNIKOFF über die Bienenmotte und die Nastinversuche DEYKE PASCHAS und RESCHAD-BAYS deuten darauf hin, daß es durch Injektion fettartiger Substanzen gelingt, den Organismus zur Bildung von Substanzen anzuregen, die nach Art von Antikörpern wirken. Endlich sind die sehr eingehend studierten Cobra-Lecithin- und ähnliche Giftverbindungen zu erwähnen. Gerade die Versuche, die mit tierischen und anderen Giften und Lecithin angestellt wurden, lassen es CITRON[46]) als möglich erscheinen, daß bei dem Zusammentreffen dieser Substanzen Toxolipoide entstehen, die als Antigene wirken, d. h. ihrerseits Antikörper erzeugen können. Es wäre nun nicht weiter wunderbar, wenn solche Antikörper gegen syphilitische Toxolecithide resp. Toxolipoide eine lipoidophile Gruppe besäßen, die sich auch bei der Mischung mit einfachem Lecithin oder anderen Lipoiden bemerkbar machen würde. Wir hätten also im Lecithin gewissermaßen ein Toxoid, dessen toxophore Gruppe das hypothetische

Syphilisgift darstellte. Aus Untersuchungen BRUCKS[25]) wissen wir, daß reine Toxoide keine Antigene sind, was mit den von WASSERMANN und CITRON beim Lecithin angestellten Versuchen übereinstimmen würde, wogegen das Erhaltensein der toxophoren Gruppe der Toxine i. e. in unserem Falle die Kuppelung von Syphilisvirus mit Lecithin die Antigeneigenschaft bedingt (s. Schema).

Lues-Antigen
Syphilisvirus
Lipoid (Lecithin)
lipoidophile Gruppe
Amboceptor
komplementophile Gruppe
Komplement

So ließe sich auch ungezwungen die von LANDSTEINER, MÜLLER und POETZL[109]) gefundene Komplementbindung zwischen alkoholischem Herzextrakt von Meerschweinchen mit Dourineserum, die von BLUMENTHAL[17]) und NEISSER beobachtete analoge Reaktion zwischen Syphilisextrakt mit Frambösieserum und die von LEVADITI beschriebene Reaktion zwischen Syphilisextrakt mit Schlafkrankheitslumbalflüssigkeit, sowie ähnliche Beobachtungen anderer Autoren verstehen, indem auch bei der Dourine, der Frambösie und der Schlafkrankheit Antikörper gegen toxische Lipoidverbindungen gebildet würden, die nun mit dem Lecithin und anderen Lipoiden des Luesantigens, besonders bei Gegenwart von gallensauren Salzen (LEVADITI und YAMANOUCHI), Komplementbindung ergeben.

Stellt diese Hypothese, der sich WASSERMANN[228]) neuerdings in seinen Anschauungen sehr genähert hat, indem er die Möglichkeit erörtert, daß das Antigen eine Lipoideiweißverbindung darstelle, einen Weg dar, die verschiedenen Befunde bei der WASSERMANNschen Reaktion auf relativ einfache Weise zu erklären, so bestehen doch noch eine Reihe andere Möglichkeiten, die hier gleichfalls wenigstens kurz besprochen werden müssen, da die theoretischen Anschauungen der Autoren auch für die Methodik maßgebend geworden sind.

Es besteht sehr wohl die Möglichkeit, daß bei der WASSERMANNschen Reaktion zwei Komplementbindungsreaktionen verschiedenen Charakters miteinander konkurrieren, von denen die mit dem wäßrigen Extrakt spezifisch, die mit dem alkoholischen Lues- oder Normalextrakt (resp. mit den Lipoiden und Seifen) unspezifisch ist. Um diese sehr verwickelten Verhältnisse zu verstehen, halte man sich folgendes vor Augen:

Extrahiert man nach der Vorschrift WASSERMANNS luetische und normale Organe mit Kochsalzlösung, so bekommt man fast regelmäßig Extrakte, die in der Dosis von 0,2 ccm und 0,1 ccm mit gleichen Mengen Luesserum nur dann eine Reaktion geben, wenn Luesextrakt + Luesserum zusammentreffen. Selten nur findet man bei der Mischung von Normalextrakten + Luesserum eine ganz schwache Andeutung der Reaktion. Verwendet man jedoch, wie dies WEIL[232]) u. a. getan haben, größere Dosen Normalextrakt, 0,6 ccm z. B., so bekommt man außerordentlich oft, wenngleich nicht regelmäßig, mit Luesserum eine positive Reaktion.

Die meisten Autoren haben daraus geschlossen, daß in beiden Fällen die gleiche Substanz wirksam ist, die nur bei den Luetikern vermehrt oder aber leichter extrahierbar ist. Es

ist jedoch auch eine andere Erklärung möglich. In den luetischen Organen findet sich eine spezifische, wasserlösliche resp. durch Wasser leicht zu extrahierende Substanz, die in den normalen Organen fehlt, das „Luesantigen". Diese Substanz ist charakteristisch für Lues, sei es, daß sie direkt von dem Virus stammt, oder daß sie ein Produkt des luetischen Organismus ist. Außerdem enthalten alle Organe, luetische wie normale, menschliche und tierische, eine normale Substanz, welche imstande ist, mit Luetikerserum Komplement zu binden und die in Wasser sehr schlecht löslich ist. Man bekommt sie deshalb nur bei Verwendung großer Dosen Extrakt in genügender Menge. Verwendet man aber ein anderes Lösungsmittel als Wasser, nämlich Alkohol, so erhält man diese normale Substanz, das Lipoid, sehr reichlich aus den Organen. Irgendwelche Unterschiede zwischen luetischen und normalen Organen offenbaren sich bei der Alkoholextraktion nicht mehr, wenn auch die Möglichkeit, daß auch bei der Alkoholextraktion eine spezifische Lueskomponente in Lösung gehen könnte (s. o.), nicht abzuweisen ist.

Wie erklärt sich nun aber, daß das Lipoid mit Syphilisserum eine Komplementbindungsreaktion gibt, obwohl hier für eine Antigen-Antikörperrelation, wenn man sich nicht auf den Boden der oben dargelegten Hypothese stellt, keine Anhaltspunkte vorliegen? Einige Tatsachen können hier zur Erklärung herangezogen werden.

Durch PORGES und MEIER[189—191]) und zahlreiche Nachuntersucher ist sichergestellt, daß das Syphilitikerserum das Lecithin ausflockt. Das gleiche gilt auch für die gallensauren Salze, Seifen usw. (SACHS und ALTMANN[195, 196]). SELIGMANN[206]) hat aber gezeigt, daß jede Ausfällungsreaktion zur Komplementbindung führen kann.

SACHS und ALTMANN[196]) fanden, daß eine verminderte Alkaleszenz der Komplementbindungsreaktion mit Lipoiden förderlich sei. Negativ reagierende Luessera konnten durch Zusatz geringer Säuremengen in positiv reagierende verwandelt werden. Nun enthalten aber, wie CITRON und REICHER[48b]) fanden, die Sera von Luetikern besonders reichlich Fermente, die gewisse Fette und Lipoide spalten können, wobei Fettsäuren gebildet werden. Beide hier zitierten Eigenschaften, die Fähigkeit, Niederschläge zu bilden und die Fähigkeit, Fette zu spalten, beschränken sich jedoch keineswegs auf luetische Sera. Vielmehr können auch bei anderen Infektionskrankheiten (Tuberkulose, Lepra, Scharlach usw.) und vielleicht auch bei anderen pathologischen Zuständen, Tumoren z. B., die gleichen Eigenschaften, wenn auch meist nur schwächer, im Serum sich finden. Dementsprechend können bei allen derartigen Zuständen auch mit alkoholischem Extrakt Komplementbindungen auftreten, ja auch mit wäßrigem Lues- oder Normalextrakt muß, wenngleich viel schwächer, eine analoge Reaktion möglich sein, da die Lipoidkomponente in geringem Maße auch in ihnen sich findet. So würden sich die Angaben von LANDSTEINER, MÜLLER und POETZL[109, 110]) über positive Reaktion mit Alkoholnormalextrakt bei Trypanosomen, von EITNER[58a]) bei Lepra, von SALOMON[198]) bei Karzinom und Sarkom usw. erklären. Sehr wichtig erscheinen in diesem Zusammenhang die Angaben von WEIL und BRAUN[236]), daß der alkoholische Extrakt mit den verschiedensten präzipitierenden Seren Komplementbindung gibt, während der wäßrige Luesextrakt streng spezifisch ist. Jedoch muß erwähnt werden, daß MICHELI und BORELLI[152]) in ihrer Nachprüfung dieser Versuche zu einem negativen Ergebnis kamen.

Aus diesen Erwägungen heraus, die sicher keineswegs den ganzen Komplex der Fragen über das Wesen der Serodiagnostik des Syphilis

erschöpfen, bei der es insbesondere noch auf den Globulingehalt der Seren, auf den Seifengehalt der Luesorgane (Beneke[12]) und auf andere noch nicht geklärte Punkte ankommt, vertreten Citron[46]) sowohl wie Wassermann[228]) den Standpunkt, daß für die klinische Anwendung der Wassermannschen Reaktion nur Luesextrakte als Antigene verwendet werden dürfen. Citron beschränkt sich hierbei ausschließlich auf die wäßrigen Extrakte, da bei der gegenwärtigen Unsicherheit über die Grundlagen der Reaktion, theoretisch a priori diese die größte Zuverlässigkeit beanspruchen dürfen und klinisch mit dieser Methode bei Innehaltung der quantitativen Normen, die später besprochen werden, Fehldiagnosen bisher fast nie gestellt wurden, wenn man von ganz vereinzelten Fällen einiger Autoren absieht, bei denen angesichts der großen Schwierigkeiten der exakten Durchführung der Versuche und der richtigen Deutung derselben, wohl nicht stets alle Fehlerquellen Berücksichtigung gefunden haben dürften.

Wenn Much und Eichelberg[162]) neuerdings angeben, mit wäßrigem Luesextrakt auch bei Scharlach in 50 % der Fälle Reaktionen erhalten zu haben, so ist darauf hinzuweisen, daß erstens aus den Protokollen dieser Autoren sich ergibt, daß die Reaktionen schwächer waren, als sie bei Lues zu sein pflegen. Much und Eichelberg verwendeten, um vollkommene Hemmung zu erhalten, 0,3 ccm Antigen, während die Maximaldosis bei Lues 0,2 ccm nicht überschreiten soll. Weiter haben aber die negativen Resultate von Boas und Hauge[18a]), Jochmann und Töpfer[96a]) und vielen anderen Autoren bewiesen, daß es sich nur um ein seltenes Vorkommnis handelt. Nach Seligmann und Klopstock[206a]) können verdorbene Antigene mit Scharlachserum positiv reagieren, während nach Halberstädter, Müller und Reiche[90b]), denen sich Händel[90a]) und Bruck und Cohn[30a]) anschließen, einzelne Luesextrakte die Fähigkeit haben, auch mit Scharlachserum zu reagieren, während die meisten Luesextrakte dies nicht tun. Über die Serumreaktion bei Lepra s. u. (pag. 1112).

Wassermann[228]) konzediert die alkoholisch luetischen Extrakte, wobei er annimmt, daß auch die spezifische Lueskomponente alkohollöslich sei, was zwar sicher möglich, aber doch noch unbewiesen ist.

Landsteiner und seine Mitarbeiter[109, 110]), Gross und Volk[88, 88a]), u. a. endlich halten die ganze Luesreaktion auch die mit wäßrigem Luesextrakt für eine unspezifische Lipoidreaktion. Jedoch geben die Arbeiten dieser Autoren keinen Aufschluß darüber, ob vergleichende Untersuchungen zwischen alkoholischem Normalextrakt und wäßrigem Extrakt aus der Leber hereditär-luetischer Foeten angestellt wurden. Die Angaben Landsteiners beziehen sich nur auf luetischen Lungenextrakt, der im allgemeinen sehr wenig empfehlenswert ist, da er sich von normalem Extrakt kaum unterscheidet.

Ebenso wie die Natur des Antigens strittig ist, so ist es auch das Wesen der Luesantikörper. Schon aus den zitierten Hypothesen über das Luesantigen ergibt sich, wie weit die Ansichten über die Luesantikörper differieren müssen.

Während man, wenn man auf dem Standpunkt der Hypothese von der Toxolipoidnatur des Antigens oder auf dem dualistischen Standpunkt von der Wesensdifferenz der wasserlöslichen und der alkohollöslichen Extraktkomponente steht, richtige Antikörper annehmen muß, fällt diese Annahme fort oder wird wenigstens sehr unwahrscheinlich, wenn man die wirksame Extraktsubstanz in einem unspezifischen Lipoid sieht. Eine scheinbare Komplizierung der Sachlage bringt noch die

Angabe Levaditis und Yamanouchis[125–127]), daß man auch die „Antikörper" mit Alkohol aus der Paralytikerlumbalflüssigkeit extrahieren könne, daß also auch die Antikörper „Lipoide" seien.

Levaditi und Yamanouchi sehen in der Wassermannschen Reaktion den Ausdruck einer Serumlipoid-Organlipoidreaktion, die bei Gegenwart bestimmter Salze eintritt.

Der Annahme, daß durch diesen Befund Levaditis und Yamanouchis die Antikörpernatur der wirksamen Serumsubstanzen widerlegt sei, ist Citron[46]) mit dem Einwand entgegengetreten, daß man die Ergebnisse bei der Alkoholbehandlung von Lumbalflüssigkeiten nicht ohne weiteres auf das Serum übertragen dürfe. Die Lumbalflüssigkeit sei sehr arm an durch Alkohol fällbaren Substanzen, während das Serum sehr reich an solchen sei. Versetzt man daher Serum mit Alkohol, so werden mit den ausfallenden Eiweißsubstanzen auch die Antikörper niedergerissen. Ob sich zweifelsfreie Antikörper in der Lumbalflüssigkeit etwa anders verhalten würden und gleichfalls alkohollöslich seien, ist überhaupt noch nicht untersucht worden und müßte erst an geeigneten Fällen etwa von Meningitis cerebrospinalis epidemica geprüft werden.

Es darf folglich aus der Alkohollöslichkeit der Luesantikörper in der Lumbalflüssigkeit nicht ohne weiteres der Schluß gezogen werden, daß es sich nicht um echte Antikörper handeln könne.

Trotzdem empfiehlt Citron den Ausdruck Luesantikörper zu vermeiden und dafür ein indifferentes Wort zu wählen. Er schlägt zu diesem Zwecke die Bezeichnung Luesreagine vor, welches nach Analogie der Bezeichnungen Bakteriolysine, Agglutinine, Präzipitine, Opsonine gebildet ist und nur zum Ausdruck bringt, daß diese unbekannten Substanzen eine Reaktion (i e. die Komplementbindung) auslösen. Es bleibt somit z. Z. noch unentschieden, ob die Luesreagine echte Antikörper (Ambozeptoren resp. Präzipitine) sind oder nicht, resp. ob sie einen Komplex verschiedener Stoffe darstellen.

2. Die Technik der WASSERMANNschen Reaktion.

I. Die Herstellung des Antigens.

a) Wäßrige Extrakte.

Für die Praxis bewährt haben sich nur Extrakte aus der Leber und aus der Milz hereditär-syphilitischer Föten. Die anderen Organe geben schlechte Resultate. Die Herstellung dieser Extrakte geschieht in folgender Weise:

a) Wassermannsche Methodik. Man wäge zunächst die Organe ab und zerschneide sie mit einer Schere möglichst fein. Hierauf bringt man die Organstückchen in eine dunkelfarbige Flasche und gebe auf 1 Teil Organsubstanz 4 Teile physiologische Kochsalzlösung, die durch Karbolzusatz auf 0,5 % Phenol gebracht wird.

Ein praktisches Beispiel diene zur Erläuterung:

100 g Lebersubstanz
+ 360 ccm physiol. Kochsalzlösung
+ 40 ccm 5 %ige Karbolsäure.

Diese Aufschwemmung gelangt in einen Schüttelapparat und wird dort 24 Stunden möglichst intensiv geschüttelt. Hierauf entfernt man die größeren Organstücke durch Zentrifugieren. Die rötlich braune, opaleszierende Flüssigkeit, welche über dem Zentrifugat zurückbleibt, stellt das „Syphilisantigen" dar. Zur Konservierung bringe man das Antigen in dunkler, mit einem Gummistopfen gut verschlossener Flasche

in den Eisschrank (nicht in den Frigo). Beim Stehen im Eisschrank bilden sich stets in den Extrakten Niederschläge. Man vermeide streng jedes Aufschütteln des Bodensatzes. Zum Gebrauche nehme man vorsichtig die Flasche aus dem Eisschrank, gieße von oben das Quantum für den betreffenden Tag ab und bringe sofort die Flasche in den Eisschrank zurück. Über die Haltbarkeit der Extrakte existieren widersprechende Angaben. Wassermann, Neisser, Bruck und Schucht[219]) halten die luetischen Extrakte für sehr labil und geben insbesondere an, daß solche Extrakte leicht dadurch unbrauchbar werden, daß sie anfangen, antikomplementär zu wirken. Diese Angaben stehen mit meinen Erfahrungen in Widerspruch. Es scheint, als ob die Art der Aufbewahrung für die Haltbarkeit der Extrakte von entscheidender Bedeutung ist. Bei Innehaltung der oben beschriebenen Konservierungsregeln habe ich meine Extrakte stets bis zum letzten Tropfen benutzen können. Als lehrreich möchte ich folgende Beobachtung anführen. Ein luetischer Extrakt, der sich für die Seroreaktion sehr bewährte, wurde von mir in 3 gleiche Teile geteilt. 1 Teil behielt ich für eigene Versuche, 2 Teile wurden zwei anderen Laboratorien zu ihren Versuchen überlassen. Bereits nach 8 Tagen wurde mir aus dem einen Laboratorium mitgeteilt, daß der Extrakt vollkommen wirkungslos geworden sei, nach 4 Wochen erhielt ich eine ähnliche Mitteilung aus dem zweiten Laboratorium, während bei mir der gleiche Extrakt sich nahezu 3 Monate gut hielt, trotzdem er täglich benutzt wurde. Daß hiermit die Grenze der Haltbarkeit keineswegs erreicht ist, bewies eine andere Beobachtung, daß ein eingeschmolzen im Eisschrank aufbewahrter Luesextrakt noch nach 11 Monaten sich ausgezeichnet bewährte.

In analoger Weise wie die syphilitischen Extrakte stellt man auch die zur Kontrolle gebrauchten normalen Extrakte her. Hierzu verwendet man gleichfalls am besten die Leber und Milz von Föten.

b) Marie und Levaditi[139]) verreiben die Leber hereditär syphilitischer Föten zu einem feinen Brei und trocknen diesen dann im Vacuum zu einem Pulver ein. Dieses Pulver ist sehr gut haltbar. Aus dem Pulver stellt man sich durch Zusatz von physiolog. NaCl-Lösung im Verhältnis 1:4 und durch 24stündiges Extrahieren das Antigen her, das durch Zentrifugieren geklärt wird.

c) Morgenroth und Stertz[161]) empfehlen folgendes Verfahren. Man bewahre die Organe, die zur Antigenherstellung benutzt werden sollen, im Frigo im gefrorenen Zustand auf. Für den jedesmaligen Bedarf schneide man sich ein kleines Stück ab, verreibe dieses in einem Mörser fein mit Seesand und schwemme dann die verriebene Masse in NaCl-Lösung im Verhältnis 1:4 auf. Hierauf filtriere man durch ein Papierfilter.

d) Da Neisser, Bruck und Schucht[170]) im Serum kein Antigen nachweisen konnten, verwandten sie zum Nachweis von Luesantigen im Blute einen Extrakt aus roten Blutkörperchen, den sie in der Weise herstellten, daß sie auf 1 Teil gewaschener luetischer resp. normaler Erythrocyten 4 Teile Karbolkochsalzlösung gaben. Diese Emulsion schüttelten sie 24 Stunden, zentrifugierten dann und benutzten das Zentrifugat. Neisser, Bruck und Schucht versuchten diese Blutextrakte zu diagnostischen Zwecken in der Weise zu verwenden, daß sie darauf Serum von Affen einwirken ließen, die längere Zeit mit syphilitischem Material von Menschen oder Affen vorbehandelt wurden. Die Resultate Neissers verhießen weit größere diagnostische Erfolge als das Wassermannsche Verfahren des Luesantikörpernachweises sind aber bisher unbestätigt

geblieben. Es scheint, als ob ein großer Teil der so erzielten Reaktionen auf die Lipoide der Blutkörperchen zurückzuführen sind, die mit Affenimmunserum eine positive Reaktion geben müssen. Die Einflußlosigkeit der Quecksilbertherapie auf dieses „Blutantigen", das nach NEISSER, BRUCK und SCHUCHT „auf noch bestehende Spirochätenanwesenheit im Körper" hinweisen sollte, erklärt sich so zur Genüge.

e) WEIL[232]) und LANDSTEINER[112]) verwenden als Ersatz der schwer zu beschaffenden fötal-luetischen Leberextrakte Extrakte aus malignen Tumoren, LANDSTEINER auch solche aus normaler Meerschweinchenleber, WEIL und BRAUN[234]) endlich solche aus normalen Menschenorganen in 2—3 mal größeren Dosen als Luesextrakt. Angeblich erhält man so gleich zuverlässige Reihen wie bei der Verwendung von syphilitischen Organextrakten. Jedoch fehlt es diesbezüglich noch an beweiskräftigen Bestätigungen, indem die genannten Autoren keine Parallelversuche mit luetischem Extrakt anstellten. CITRON und BLUMENTHAL[41]) konnten zwar in vielen Fällen bei vergleichenden Untersuchungen mit luetischem Extrakt einen Parallelismus konstatieren, der jedoch in manchen Fällen in eklatanter Weise fehlte. Diese Beobachtungen finden ihre einfache Erklärung durch den von PORGES und MEIER[191]) sowie LANDSTEINER, MÜLLER und POETZL[110]) geführten Nachweis, daß das Lecithin ähnlich, wie das Luesantigen wirkt.

Wichtig für den Ausgang der Seroreaktion der Lues ist vor allem die Verwendung der richtigen Mengen des Antigens. Bei dem nach der alten WASSERMANNschen Methode hergestellten Antigen sind die brauchbarsten Dosen fast stets 0,2 ccm und 0,1 ccm. Wenn auch naturgemäß die Stärke des Antigens schwankend ist, so sind doch die Differenzen meist nicht so groß, als man a priori vermuten sollte. Immerhin muß man wissen, daß es auch besonders stark und besonders schwach wirkende Extrakte gibt, von denen dementsprechend andere Dosen verwendet werden müssen. Es scheint, als ob solche fötale Syphilisleber, die vor ihrer Verarbeitung einige Zeit der Autolyse überlassen bleiben, besonders starke Extrakte liefern. Als allgemeine Regel gilt auch hier, daß man nur solche Mengen Antigen verwenden darf, deren doppelte Dosis noch kein Komplement bindet. Man wähle zur Serodiagnostik nur die Mengen Antigen, die mit dem Serum von sicher Syphilitischen starke Komplementbindung, mit normalem Kontrollserum keine Spur derselben zeigen.

b) Alkoholische Extrakte.

a) PORGES und MEIER[191]) zerkleinern fötale normale oder syphilitische Leber und extrahieren diese 24 Stunden mit der fünffachen Gewichtsmenge von absolutem Alkohol. Hierauf filtriert man durch ein grobes Papierfilter und destilliert den Alkohol im Vakuum bei niedriger Temperatur (40° C) ab, so daß eine syrupartige Substanz zurückbleibt, die nicht sauer reagieren darf. Dieser Syrup wird dann in physiologischer Kochsalzlösung, die 0,5 % Phenol enthält, aufgeschwemmt, zu einer homogenen Suspension zerschüttelt und dann durch ein dünnes Papierfilter geschickt. Die Stammsuspension macht man der Art, daß man auf einen Teil Syrup 100 Teile Kochsalzlösung nimmt. Man stellt dann die unterhemmende Dosis fest und verwendet für seine Versuche die Hälfte dieser Dosis. Als geeignetste Gebrauchsdosis erwies sich 0,2—0,3 ccm der 1 %igen Stammlösung. Jedoch gaben stark wirksame Sera auch schon mit erheblich geringeren Dosen (bis 0,025 ccm) komplette Reaktion.

An Stelle der alkoholischen Leberextrakte kann man nach Porges und Meier auch käufliches Lecithin (Kahlbaum) verwenden. Man stellt sich zu diesem Zwecke eine 1 %ige Stammlösung her, die man durch Schütteln mit Karbolkochsalzlösung erhält. Diese Stammlösung ist im Eisschrank gut haltbar. Mittlere Dosen Lecithin pflegen oft selbst die Hämolyse zu hemmen, während größere Dosen selbst hämolytisch wirken. Die zur Erzielung der optimalen Komplementbindungsreaktion nötige Lecithinmenge ist verschieden, je nachdem es sich um ein stark oder schwach wirksames Luesserum handelt. Die stärkeren Sera bedürfen einer größeren Dosis (0,1 ccm), die schwächeren Sera einer geringeren Menge (0,01 ccm) Lecithin. Jedoch kann man mit einer mittleren Dosis (0,05 ccm) bei fast allen überhaupt wirksamen Seris eine Reaktion erhalten. Diese Dosis hemmt gewöhnlich allein die Hämolyse. Zur Kompensation nehme man das 4—6fache der Titerdosis des Hämolysins. Kompensiert man nicht, dann besteht der Unterschied zwischen dem syphilitischen und normalen Serum darin, daß durch normales Serum die antihämolytische Wirkung des Lecithins aufgehoben wird, also Hämolyse eintritt, während bei syphilitischem Serum die Hämolyse ausbleibt.

Eine ähnliche Beobachtung ist von fast allen Autoren bei der Anwendung des Wassermannschen Luesantigens gemacht worden. Verwendet man ein Antigen, welches selbst etwas die Hämolyse hemmt, so sieht man, daß normale Sera nicht nur nicht die Hämolyse hemmen, sondern vielmehr diese befördern, während luetische Sera im Gegenteil die Hemmung verstärken.

b) Bauer[10, 11]) fand, daß das Blutserum normaler Menschen, wenn man seine Normalhämolysine für Hammelblut durch Zusatz von Hammelerythrocyten absättigt, die Eigenschaften eines luetischen Serums anscheinend gewinnt, d. h. mit Luesextrakt resp. mit alkoholischen Normalextrakten Komplementbindung gibt.

Digeriert man luetisches Serum in genügender Menge mit Meerschweinchenserum und setzt nachher Hammelblut zu, so tritt Lösung auf, wenn häufig auch etwas langsamer als bei Verwendung von Normalserum. Setzt man aber zu dem Luesserum und dem Meerschweinchenkomplement noch Leberextrakt, so wird das zugefügte Hammelblut nicht gelöst, wohingegen bei Gebrauch von nichtluetischen Serum vollkommene Hämolyse eintritt.

Bauer benutzt dieses Prinzip, das also das Hammelbluthämolysin ganz ausschaltet, in folgender Form zur Diagnostik. Es sind für die Reaktion notwendig:

1. Frisches Meerschweinchenkomplement.

2. Alkolischer Organextrakt, hergestellt nach Michaelis und Lesser (s. pag. 1103).

3. 5 % Hammelblut.

4. und 5. Das inaktivierte zu prüfende Blutserum und ein normales Kontrollserum.

Zur Anstellung der Reaktion braucht man nur vier Röhrchen:

In das erste Röhrchen bringt man 0,2 Serum, 1 ccm Organextrakt 1 : 5 und 1 ccm Komplement 1 : 10.

Das zweite enthält dasselbe, nur anstatt Organextrakt 0,85 % NaCl-Lösung.

Das dritte enthält 0,2 Normalserum, ferner Organextrakt und Komplement wie das erste Röhrchen.

Das vierte enthält dasselbe wie das dritte, nur anstatt Organextrakt 0,85 % NaCl-Lösung.

Die Röhrchen gelangen auf $^1/_2$ Stunde in den Brutschrank, dann wird 1 ccm der 5 %igen Hammelblutaufschwemmung hinzugefügt.

Nach 15—45 Minuten lösen sich Röhrchen 2, 3 und 4, während Röhrchen 1, wenn es sich um Lues handelt, ungelöst bleibt oder sich nur ganz allmählich und unvollständig löst.

Lipämisches Serum ist unbrauchbar.

BAUER gibt an, mit dieser Methode die gleichen Resultate wie mit der WASSERMANNschen Reaktion erhalten zu haben. Nachprüfungen von HINRICHS[92a]), v. BEHRING[13a]) u. a. bestätigen die Angaben BAUERS.

c) LANDSTEINER, MÜLLER und POETZL[110 u. 166]) verwenden als Antigen alkoholische Extrakte von Meerschweinchenherzen. Man zerreibt die muskulösen, von Blut befreiten Teile des Meerschweinchenherzens in der Reibschale und extrahiert 1 g des Breies mit 50 ccm 95 %igem Alkohol durch mehrstündiges Erwärmen auf 60°. Hierauf filtriert man durch Papier. Das Filtrat wird bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

LANDSTEINER, MÜLLER und POETZL unterscheiden sich in der Technik ihrer Versuche ferner dadurch, daß sie in folgender Weise vorgehen:

In jedes Reagenzglas geben sie 10 Tropfen NaCl-Lösung und 1 Tropfen normales Meerschweinchenserum als Komplement. Hierzu fügen sie in Röhrchen:

1. 1 Tropfen des inaktivierten zu untersuchenden Serums,
2. Desgl. + 2 Tropfen alkohol. Herzextrakt.
3. 1 Tropfen inaktivierten sicher luetischen Serums.
4. Desgl. + 2 Tropfen alkohol. Herzextrakt.
5. 1 Tropfen inaktivierten normalen Serums.
6. Desgl. + 2 Tropfen alkohol. Herzextrakt.
7. 2 Tropfen Extrakt.

Die Röhrchen werden gut durchgeschüttelt und gelangen dann auf 1 Std. in den Brutschrank bei 37° C. Hierauf wird 1 Tropfen 50 %igen gewaschenen Hammelbluts und die doppelt lösende Dosis der gerade noch lösenden Menge Hämolysin zugesetzt. Nach $1^1/_2$stündigem Verweilen im Brutschrank wird das Resultat abgelesen.

d) MICHAELIS und LESSER[149]) zerkleinern syphilitische oder normale Leber im Mörser und schütteln unter Zugeben von Glasperlen sofort mit dem zehnfachen Volumen absoluten Alkohol mehrere Stunden. Nach 24 Stunden wird die klare Lösung vom Niederschlag abpipettiert und als Stammlösung im Eisschrank aufbewahrt. Für die Reaktion selbst benutzt man eine jedesmal frisch bereitete Verdünnung der Stammlösung mit 4 Teilen physiol. NaCl-Lösung. Die alkoholische Stammlösung wird durch den Wasserzusatz zu einer leicht milchigen Flüssigkeit. Der geringe Alkoholgehalt stört die Reaktion weiter nicht. Läßt man diese milchige Flüssigkeit stehen, so setzt sich allmählich ein flockiger Niederschlag zu Boden. Die geklärte Flüssigkeit ist dann wirkungslos, da das wirksame Prinzip an den Niederschlag gebunden ist. Schüttelt man diesen auf, so ist die Flüssigkeit wieder brauchbar. Von der so verdünnten Lösung benutzt man 1 ccm. Die alkoholischen Lösungen sind nicht dauernd haltbar.

II. Das Antiserum.

Die Gewinnung von Serum zur Untersuchung geschieht am zweckmäßigsten durch Aderlaß oder sterilen Schröpfkopf, die von Lumbal-

flüssigkeit durch die Quinkesche Lumbalpunktion. Die Sera müssen $^1/_2$ Stunde bei 56° inaktiviert werden, für die Lumbalflüssigkeit scheint dies nicht notwendig zu sein (Marie und Levaditi[139]).

H. Sachs[197 a]) gibt neuerdings an, daß aktive Sera stärker reagieren als inaktivierte. Jedoch scheint diese Reaktion weniger spezifisch zu sein, da auch manche aktive Normalsera und nach meinen Erfahrungen besonders aktive Karzinomsera die gleiche Reaktion geben. Erhitzen auf 62° während $^1/_2$ Std. vernichtet nach Sachs die Reaktionsfähigkeit der Sera für Lues. Anmerkung bei der Korrektur. Seit dem Abschluß dieser Arbeit sind von verschiedenen Autoren Versuche angestellt worden, die Wassermannsche Reaktion zu modifizieren. Keine dieser Methoden hat bisher allgemeinere Verwendung gefunden. So hat Weidanz eine Methode ausgearbeitet, in der ähnlich, wie bei der von Landsteiner, Müller und Poetzl, kleinste Blutmengen zur Untersuchung gelangen. Tschernogubow verzichtet auf den Komplementzusatz und benutzt das Komplement des aktiven Syphilisserums, Hecht[91 a]) läßt außerdem noch das Immunhämolysin nach dem Vorgang Bauers fort.

III. Komplement.

Meerschweinchenserum in der Verdünnung 1:10.

IV. Hämolysin.

Kaninchenhammelblutambozeptor. Für die Bauersche Modifikation (s. o.) fällt dieses Hämolysin weg.

V. Blut.

Gewaschene Hammelerythrocyten in 5 %iger Aufschwemmung. Nur Landsteiner, Müller und Poetzl verwenden eine 50 %ige Suspension.

Kontrollen.

Die Kontrollen sind bei allen serodiagnostischen Untersuchungen auf Syphilis besonders wichtig. Folgende Kontrollen sind bei Verwendung der wäßrigen Extrakte in jedem Falle anzustellen:

1. Zu prüfendes Serum und Normalextrakt in der gleichen Konzentration.
2. Sicher syphilitisches Serum, das bereits bezüglich seiner Reaktion bekannt ist, mit luetischem Extrakt.
3. Dasselbe Serum mit normalem Extrakt.
4. Normales Serum mit luetischem Extrakt.
5. Normales Serum mit normalem Extrakt.
6. Luetisches Antigen in doppelter und einfacher Dosis.
7. Normaler Extrakt in doppelter und einfacher Dosis.
8. Zu prüfendes Serum in doppelter und einfacher Dosis.
9. Luetisches Serum in doppelter und einfacher Dosis.
10. Normales Serum in doppelter und einfacher Dosis.

Außerdem noch die üblichen Systemkontrollen.

Bei der Verwendung der alkoholischen Extrakte bleiben die Kontrollen mit Normalextrakt fort.

3. Wertbestimmung.

Die Titration der Luetikersera macht gewisse Schwierigkeiten, da die Antigensubstanz in verschiedenen Extrakten in verschiedener Menge sich findet. Außerdem ist es nicht möglich, das Antigen oder die Sera sehr weit zu verdünnen, wie dies bei den sonstigen Komplementbindungsversuchen geschieht. Die meisten Extrakte und Sera versagen schon

bei 0,05. Die wirksamen Mengen liegen zwischen 0,1 und 0,2 ccm sowohl bei den Extrakten als auch bei den Seren. Vor Mengen über 0,2 ccm, wie sie MUCH und EICHELBERG[162]) verwenden, muß man sich hüten, da in diesen Fällen auch oft unspezifische Reaktionen auftreten.

NEISSER, BRUCK und SCHUCHT[170]) machen die Wertbemessung der Luetikersera in der Art, daß sie das „antikörper"haltige Serum eines Luetikers im Vakuum eintrocknen und so als Standardserum aufbewahren. Mit diesem an einem Standardantigen (hereditär-luetischem Fötalextrakt) austitrierten Serum werden andere zu prüfende Seren auf ihren Antikörpergehalt bemessen.

Nachstehendes Protokoll veranschaulicht dieses Verfahren.

Wertbestimmung dreier menschlicher Luessera nach NEISSER, BRUCK und SCHUCHT.

Vermischt mit	I. 0,1 Standardserum	II. 0,1 Serum eines sekund. Luetikers	III. 0,1 normales Menschenserum
0,2 Standard-Antigen	völlige Hemmung	völlige Hemmung	komplette Lösung
0,1 do. do.	do.	do.	do.
0,075 do. do.	do.	do.	do.
0,05 do. do.	do.	inkompl. Lösung	do.
0,025 do. do.	fast Hemmung	komplette Lösung	do.
0,01 do. do.	inkompl. Lösung	do.	do.
0,005 do. do.	komplette Lösung	do.	do.

Serum I = einfach normal, Serum II = $^1/_5$ normal.

Das Verfahren liefert nach den Angaben von NEISSER, BRUCK und SCHUCHT stets konstante und zuverlässige Resultate. Von anderen Autoren ist diese Art der Wertbemessung bisher noch nicht erprobt worden.

CITRON[37, 48a]) macht die Wertbemessung in der Art, daß er bei der Untersuchung eines jeden Serums auf Luesreagine nur 2 Verdünnungen des Antigens und 2 Verdünnungen des Serums wählt, so daß

1. 0,2 luet. Extrakt + 0,2 Serum und
2. 0,1 „ „ + 0,1 „

angesetzt werden. Hierbei ergeben sich folgende 6 Möglichkeiten:

a) Nr. 1 und Nr. 2 zeigen vollständige Hemmung dar Hämolyse:	++++	stark positiv
b) Nr. 1 zeigt vollständige und Nr. 2 unvollständige Hemmung:	+++	
c) Nr. 1 zeigt vollständige Hemmung und Nr. 2 komplette Hämolyse:	++	schwach positiv
d) Nr. 1 zeigt unvollständige Hemmung und Nr. 2 komplette Hämolyse:	+	
e) Nr. 1 zeigt zweifelhafte Hemmung und Nr. 2 komplette Hämolyse:	±	zweifelhaft
f) Nr. 1 und 2 zeigen komplette Hämolyse:	—	negativ

Dadurch nun, daß man in jedem Serienversuch 3 bereits geprüfte Sera (1 stark positives, 1 schwach positives und 1 negatives Serum) mit einstellt, gelingt es, relativ zuverlässige und konstante Werte zu erzielen. Jeder neue Extrakt wird vor der Benutzung zur praktischen Diagnostik

Nachstehendes Protokoll wird das von Citron benutzte Verfahren illustrieren.

Wertbemessung von 4 Luetikerseren nach Citron.

Luet. Extrakt.	Serum	Komplem.	Hämolysin 1 ccm	Hammelblut	Resultat der Hämolyse	
1. 0,2	0,2 Ser. I. Tabes ohne Luesanamnese, unbehandelt.	0,1	1:1000	1 ccm 5 %	keine Häm.	++++
2. 0,1	0,1 (wie vorher)	0,1	1:1000	„	do.	
3. —	0,4*) (wie vorher)	0,1	1:1000	„	kompl. Häm.	
4. 0,2	0,2 Ser. II. Lues secund., unbehand.	0,1	1:1000	„	keine Hämol.	+++
5. 0,1	0,1 do.	0,1	1:1000	„	inkompl. Häm.	
6. —	0,4*) do.	0,1	1:1000	„	kompl. Häm.	
7. 0,2	0,2 Ser. III. Tabes. Viele Schmierkuren	0,1	1:1000	„	keine Häm.	++
8. 0,1	0,1 do.	0,1	1:1000	„	kompl. Häm.	
9. —	0,4 do.	0,1	1:1000	„	do.	
10. 0,2	0,2 Ser. IV. Gallensteine. Vor 17 Jahr. Lues. Mehrere Kuren. Seit 10 Jahren symptomlos	0,1	1:1000	„	Spur Hemm.	±
11. 0,1	0,1 do.	0,1	1:1000	„	kompl. Häm.	
12. —	0,4*) do.	0,1	1:1000	„	do.	
13. 0,2	0,2 Kontrollser. neg. (Karzinoma hepat.)	0,1	1:1000	„	kompl. Häm.	—
14. —	0,4*) do.	0,1	1:1000	„	do.	
15. 0,1	0,1 Kontrollser. stark positiv. (Lues maligna)	0,1	1:1000	„	keine Häm.	++++
16. —	0,2 do.	0,1	1:1000	„	kompl. Häm.	
17. 0,2	0,2 Kontrollser. schwach positiv. (Primäreffekt)	0,1	1:1000	„	inkompl. Häm.	+
18. —	0,4*) do.	0,1	1:1000	„	kompl. Häm.	
19. 0,4	—	0,1	1:1000	„	kompl. Häm.	
Norm. Extr.						
20. 0,2	0,2 Ser. I	0,1	1:1000	„	kompl. Hämolyse	
21. 0,2	0,2 Ser. II	0,1	1:1000	„	Spur Hemmung	
22. 0,2	0,2 Ser. III	0,1	1:1000	„	kompl. Hämolyse	
23. 0,2	0,2 Ser. IV	0,1	1:1000	„	do.	
24. 0,2	0,2 Kontrollser. neg.	0,1	1:1000	„	do.	
25. 0,2	0,2 Kontrollser. stark positiv	0,1	1:1000	„	do.	
26. 0,2	0.2 Kontrollser. schwach positiv	0,1	1:1000	„	do.	
27. 0,4	—	0,1	1:1000	„	do.	
28. —	—	0,1	1:2000	„	kompl. Hämolyse	
29. —	—	0,1	—	„	keine Hämolyse	
30. —	—	—	—	„	do.	

*) Anmerk. Die Dosis von 0,4 ccm Serum hemmt namentlich bei Lues oft selbst die Hämolyse. Man muß dann in diesen Fällen als Kontrolle 0,2 ccm Serum nehmen. Die Erfahrung hat gelehrt, daß, wenn 0,2 ccm nicht hemmt, die Kombination von 0,2 ccm Serum + 0,2 ccm Antigen aber die Hämolyse verhindert, es sich stets um Lues handelte. (S. außerdem die Anmerkung p. 1091.)

gleichfalls mindestens an 3 bekannten Seren geprüft und kann nun durch Verdünnen oder durch Anwendung entsprechend höherer Dosen auf die Stärke des Standardextraktes gebracht werden. Ein Eintrocknen der Standardsera im Vakuum ist unnötig.

Die CITRONsche Wertbemessung hat sich für klinische Zwecke gut bewährt und ist von mehreren Autoren adoptiert worden (FLEISCHMANN und BUTLER[66]), HOFFMANN und FR. BLUMENTHAL[94]), H. MÜHSAM[163]), G. MEIER[141]) u. a.

Was die Bewertung der Resultate betrifft, so sprechen die stark positiven Reaktionen für sichere luetische Infektion, die schwach positiven Reaktionen gleichfalls, wenn alle Kontrollen vollkommen gelöst sind. Findet sich aber in den Kontrollen auch nur eine Spur Hemmung, dann sind die + Reaktionen nur als zweifelhafte Reaktionen zu betrachten. ± Reaktionen sind nicht eindeutig. Sie finden sich nur selten bei wirklich Gesunden. Dagegen sind sie häufig bei verschiedenen Infektionskrankheiten (Typhus, Masern, Scharlach), ferner bei Tumoren anzutreffen. Es ist niemals gestattet, auf eine ± Reaktion hin die Diagnose Lues zu stellen. Dagegen ist die Reaktion wichtig, bei anamnestisch und klinisch sicher gestellter Lues. Sie spricht hier dafür, daß noch nicht vollkommen normale Verhältnisse vorliegen und ist etwa wie eine ganz schwach positive Reaktion zu bewerten. Als Endresultat der Therapie ist nach CITRON die Erreichung einer ± Reaktion nicht ausreichend, vielmehr muß eine vollkommen negative Reaktion erzielt werden.

Ergebnisse der Serodiagnostik der Syphilis mit Hilfe der WASSERMANNschen Reaktion.

Bei der großen Ausdehnung der Literatur über diese Frage kann an dieser Stelle, die in erster Reihe die Technik berücksichtigt, eine eingehende Schilderung der mit der WASSERMANNschen Reaktion gewonnenen Resultate nicht gegeben werden.

Nur die wesentlichsten Punkte können zusammengefaßt werden.

1. Die Häufigkeit der Reaktion und ihre klinische Spezifizität wird durch nachstehende Zusammenstellungen illustriert:

a) WASSERMANN, NEISSER, BRUCK und SCHUCHT[219]). (NEISSERsche Klinik.).

	Untersucht	Positiv	Negativ
Primäre Fälle	25	2 = 8 %	23 = 91 %
Sekundäre Fälle	101	27 = 26,7 %	74 = 73,3 %
Tertiäre Fälle	37	8 = 21,6 %	29 = 78,4 %
Frühlatente Fälle	41	6 = 14,6 %	35 = 85,4 %
Spätlatente Fälle	53	6 = 11,3 %	47 = 88,7 %
	257	49 = 19 %	208 = 81 %

b) Citron[40]. (Kraussche Klinik.)

	Untersucht	Positiv	Negativ
Nichtsyphilitische	156	0	156 = 100 %
Luetiker und Luesverdächtige .	108	80 = 74 %	28 = 26 %
Tabiker und Paralytiker . . .	43	34 = 79 %	9 = 21 %

c) Citron und Blaschko[16]. (Kraussche und Blaschkosche Klinik.)

	Untersucht	Positiv	Negativ
Initialperiode	64	57 = 90 %	7 = 10 %
Frühperiode mit Symptomen .	56	55 = 98 %	1 = 2 %
Desgl. ohne Symptome . . .	67	54 = 80 %	13 = 20 %
Spätperiode mit Symptomen .	23	21 = 91 %	2 = 9 %
Desgl. ohne Symptome . . .	51	29 = 57 %	22 = 43 %
Cerebrospinalerkrankungen . .	10	6 = 60 %	4 = 40 %

Die Untersuchungen von Fleischmann und Butler[66], H. Mühsam[163], G. Meier[141] (Wassermannsches Laboratorium, 181 Fälle, 81 % positiv), Fischer und Meier[62] (83,7 % positiv), Kroner[106] (73 % positiv), Fischer[63] (Buschkesche Klinik, 250 Fälle, 84 % positiv) u. v. a. haben übereinstimmend die gleich hohen Prozentzahlen ergeben, wie sie zuerst Citron gefunden hat.

Nur Bruck und Stern erhielten niedrigere Werte, wie nachstehende Tabelle lehrt.

d) Bruck und Stern[30]. (Neissersche Klinik.)

	Untersucht	Positiv	Negativ
Primäre Lues	27	13 = 48,2 %	14 = 51,8 %
Sekundäre Lues	163	129 = 79,1 %	34 = 20,9 %
Tertiäre Lues	47	27 = 57,4 %	20 = 42,6 %
Maligne Lues	12	9 = 75 %	3 = 25 %
Frühlatentes Stadium	50	10 = 20 %	40 = 80 %
Spätlatentes Stadium	79	16 = 20,2 %	63 = 79,8 %

Auch die Autoren, die mit alkoholischen Normalextrakten gearbeitet haben, Landsteiner, Müller und Poetzl[110, 166a] (278 Fälle 77 % positiv), Gross und Volk[88, 88a], Elias, Neubauer, Porges und Salomon[59] u. a. haben annähernd die gleichen Ergebnisse bezüglich der Häufigkeit der positiven Reaktionen bei Lues wie Citron gehabt. Dagegen scheint nach den Angaben der genannten Autoren dieser Modifikation im Gegensatz zu der klassischen Wassermannschen Methode in sofern eine geringere Spezifizität zuzukommen, als Tumoren, progressive Phthise und andere Krankheiten in nicht zu seltenen Fällen gleichfalls positiv reagierten, obwohl sich Lues ausschließen ließ. Anmerkung bei der Korrektur: Nach den Untersuchungen von Bauer und Meier[11b] sind diese Angaben jedoch kaum in der genannten Ausdehnung zutreffend. Vielmehr geben auch diese Krankheiten, wenn sie nicht durch Lues kompliziert sind, stets negative Reaktionen. Über die Verhältnisse beim Scharlach siehe pag. 1098 und bei Lepra siehe pag. 1112.

Außer im Serum können auch in anderen Körperflüssigkeiten sich Luesreagine finden. Besonderes Interesse verdient die Lumbalflüssigkeit. Nach den Untersuchungen von WASSERMANN und PLAUT[220, 185—188]), die von MARIE und LEVADITI[139, 139a, 139b, 122]), MORGENROTH und STERTZ[161]) und vielen anderen Autoren bestätigt wurden, gibt die Lumbalflüssigkeit der Paralytiker in 80—100% der Fälle eine positive WASSERMANNsche Reaktion, darunter in manchen Fällen, in denen das Serum negativ reagiert. Darüber, ob bei der Paralyse die Untersuchung des Serums oder die der Lumbalflüssigkeit konstantere Werte gibt, sind die Angaben der Autoren verschieden. Außer bei der Paralyse findet sich eine positive Reaktion in der Lumbalflüssigkeit fast nur noch bei Tabes (SCHÜTZE[202, 204]) und der Meningitis luetica. Jedoch konnte CITRON[36, 40]) im Gegensatz zu SCHÜTZE bei Tabikern nur in einem kleinen Bruchteil der Fälle in der Lumbalflüssigkeit positive Reaktionen erhalten. Vereinzelt findet man bei der Tabes ebenso wie bei der Paralyse bei negativer Serumreaktion Reagine in der Lumbalflüssigkeit.

BAB[3, 4, 5, 6]) und PLAUT fanden in der Milch luetischer Mütter, BAB in der Ascites- und Pleuraflüssigkeit hereditär-luetischer Föten, PICK und PROSKAUER[183]) in der Hydroperikardflüssigkeit bei einem Fall von Gumma cordis, BLUMENTHAL und WILE[17a]) im Urin von Luetikern Luesreagine. Die letztere Angabe entbehrt bisher noch der Bestätigung.

2. Der Einfluß der spezifischen Hg-Therapie auf die Reaktion, den CITRON gefunden hat, wird durch nachstehende Tabellen bewiesen.

a) CITRON[40]). (KRAUSsche Klinik).

	Untersucht	Positiv	Negativ
Unbehandelte Luetiker . . .	94	77 = 81%	17 = 19%
Mit 1 Spritzkur Behandelte. .	11	8 = 73%	3 = 27%
Mit 1 Schmierkur Behandelte .	24	16 = 67%	8 = 33%
Mehrere Quecksilberkuren . .	22	13 = 59%	9 = 41%
Behandelte Luetiker	57	37 = 65%	20 = 35%

b) BRUCK und STERN[30]). (NEISSERsche Klinik).

	Untersucht	Positiv	Negativ
Unbehandelte Luetiker . . .	173	141 = 81,5%	32 = 18,5%
Behandelte Luetiker	178	50 = 28%	128 = 72%

c) MÜLLER (Alkohol. Herzextrakte[166]). (FINGERsche Klinik).

	Untersucht	Vor und nach der Hg-Therapie gleich intensive Reaktion	Abnahme der Reaktionsstärke	Verschwinden der Reaktion
Frisches Exanthem . .	21	13 = 61,9%	4 = 19%	4 = 19%
Älteres Exanthem . . .	6	3 = 50%	3 = 50%	
Erstes Rezidiv	9	5 = 55,5%	4 = 44,4%	
Ältere Rezidive . . .	2	2 = 100%		
Gummöse Form . . .	7	6 = 85,71%	1 = 14,28%	

(Tabelle d) siehe pag. 1110.)

d) Lesser (Alkohol. Herzextrakte) 120a). (Lassarsche Klinik).

Nr.	Diagnose	1. Blutentnahme	2. Blutentnahme nach	3. Blutentnahme nach	4. Blutentnahme nach	5. Blutentnahme nach	
1.	Sekundärsymptome	+ + +	18. Inj. Subl. —				
2.	do.	+ + +	15. Inj. Subl. 15 Inunct. —				
3.	do.	+ + +	32. Inunct. +				
4.	do.	+ + +	30. Inunct. —				
5.	do.	+ + +	26. Inunct. +				
6.	Frühlatent	+ + +	30. Inunct. +				
7.	Sekundärsymptome	+ + +	25. Inunct. + + +	50. Inunct. —			
8.	do.	+ + +	27. Inj. Subl. +	37. Inj. —			
9.	do.	+ + +	28. Inj. Subl. + +	17. Inunct. —			
10.	do.	+ + +	14. Inunct. + + +	36. Inunct. —			
11.	do.	+ + +	21. Inj. Subl. +	30. Inj. —			
12.	Frühlatent	+ + +	20. Inunct. +	30. Inunct. —			
13.	Tertiärsymptome	+ + +	15. Inunct. 50 g IK + +	50 g IK + +	15. Inj. Subl. +	nach 4 Wochen + +	Behandlung zu früh abgebrochen
14.	Sekundärsymptome	+ + +	30. Inunct. +	nach 4 Wochen + +			
15.	do.	+ + +	30. Inunct. +	nach 4 Wochen + +			
16.	Frühlatent	+ + +	12. Inj. Hg. salicyl + +	16. Inj. Subl. —	nach 10 Wochen —		
17.	do.	+ +	50 g IK —				
18.	do.	+ +	50 g IK —	nach 10 Wochen —			
19.	Sekundärsymptome	+ + +	40. Inunct. + + +	15. Inj. Subl. + +	50 g IK +	30. Inunct. —	(Alkoholist)
20.	Frühlatent	+ + +	Hg per os + + +	50 g IK + + +			
21.	Sekundärsymptome	+ + +	35. Inunct. + + +	45. Inunct. + + +			
22.	do.	+ + +	12. Inj. Hg salicyl —				
23.	do.	+ + +	nach 10 Wochen + + + ohne Behandlung				

Das Ergebnis der Untersuchungen am Menschen ist, daß die Reaktion nach einer gewissen Inkubationszeit einsetzt, in ca. 90% der Fälle schon im Primäraffekt positiv ist, bei dem Ausbrechen der sekundären Erscheinungen fast in 100% der Fälle sich findet und dann bei dem Schwinden der äußeren Erscheinungen in einem Bruchteil der Fälle fehlt. Fast stets ist in diesen Fällen eine Hg-Therapie erfolgt. Mit dem Auftreten der Rezidive findet sich auch eine positive Reaktion. In der Spätlatenz endlich sinkt die Zahl der positiven Fälle auf 50—60%. Analysiert man im einzelnen die Fälle, so ergeben sich nach CITRON[40, 48a]) folgende Gesetze:

1. Gesetz: Je länger das Syphilisvirus auf den Körper eingewirkt hat und je häufiger es Rezidive gemacht hat, desto regelmäßiger und stärker ist der Antikörpergehalt (Reagingehalt) des Serums.

2. Gesetz: Je früher die Hg-Therapie eingesetzt hat, je länger sie fortgesetzt und je häufiger sie wiederholt wurde, je zweckmäßiger die Applikationsform war und je kürzer die Frist seit der letzten Kur ist, desto geringer wird der Antikörpergehalt (Reagingehalt), desto häufiger ist er gleich Null.

Eine positive Reaktion beweist aktive Syphilis, eine negative Reaktion spricht für vollkommene Latenz oder Heilung, schließt aber aktive Lues nicht völlig aus.

NEISSER, BRUCK und SCHUCHT[170]) sahen in der positiven Reaktion nur den Ausdruck einer einmal erfolgten Infektion. Demgegenüber vertritt CITRON[36, 37, 40, 41, 43, 46, 47, 48]) die Auffassung, daß eine positive Reaktion das Vorhandensein aktiver Lues bedeutet.

Die Gründe, die er hierfür geltend macht, sind folgende:

1. Das konstante Vorkommen der Reaktion bei manifester Lues. (Die Angaben von BRUCK und STERN[30]) aus der NEISSERschen Klinik, daß bei der tertiären Lues nur 57,4% positiv reagieren, stehen im Widerspruch mit den Erfahrungen aller Autoren.)

2. Die Tatsache, daß namentlich bei unbehandelten oder schlecht behandelten Luesfällen, die Reaktion sich noch nach vielen Jahrzehnten finden kann. Die bakteriellen Antikörper pflegen meist einige Wochen, spätestens einige Monate nach dem Ablauf der Krankheit zu verschwinden. Wenn sich bei der Luesreaktion scheinbar andere Verhältnisse finden, so liegt dies daran, daß die Lues Jahrzehnte hindurch währen kann und stets von neuem zur Produktion von spezifischen Reaktionsprodukten den Organismus zwingt.

3. Auch die Fälle, die beim Fehlen äußerer Symptome nur wegen der positiven WASSERMANNschen Reaktion behandelt werden, können durch Hg-Therapie ihre Reaktion verlieren. Diese Tatsache spricht dafür, daß, wenn der durch die spezifische Therapie ausgeschaltete Reiz auf den Organismus wegfällt, die Neubildung der Reagine ausbleibt und die Reaktion allmählich negativ werden muß. Die langjährige Dauer der Reaktion ist also an sich nichts charakteristisches, sie ist nur eine Folge der noch bestehenden Krankheit.

Demgemäß sieht CITRON in den reagierenden Fällen mit fehlenden äußeren Symptomen nicht latente Fälle, sondern aktive Luesfälle, die ebenso der Behandlung bedürftig sind, wie die Fälle mit äußeren Manifestationen. Die Bezeichnung „latente Lues" sollte nur noch auf Fälle mit fehlenden Manifestationen und fehlender Reaktion angewendet werden.

Die Auffassung Citrons, die anfangs fast allgemeinen Widerspruch auslöste, findet neuerdings immer mehr Anklang (Bruck und Stern[29a,30]), Fr. Lesser[119, 120a]), Neisser[172]).

Bezüglich der negativen Reaktion sind alle Autoren der Ansicht, daß sie diagnostisch nicht zu verwerten sei. Nur Citron[46]) nimmt hier eine Sonderstellung ein.

Die Deutung der negativen Fälle ist freilich nach diesem Autor nicht einheitlich.

Beim Primäraffekt kann die negative Reaktion besagen, daß noch keine Allgemeininfektion erfolgt sei oder aber, daß nur die Reaktion noch nicht eingetreten sei, trotzdem die Infektion bereits den ganzen Organismus ergriffen habe.

Bei den späteren Stadien der manifesten Lues sind negative Reaktionen bei Verwendung eines gut wirksamen Antigens so selten, daß sie für allgemeine Betrachtungen ausscheiden können, da es keine biologische Reaktion gibt, für die nicht einzelne Individuen refraktär sind. Handelt es sich daher z. B. um die Differentialdiagnose Karzinom oder Lues, so spricht eine negative Reaktion ganz entschieden gegen Lues und es ist therapeutisch im Sinne einer Karzinombehandlung vorzugehen.

Bei den Fällen mit fehlenden, äußeren Symptomen bedeutet die negative Reaktion die wirkliche Latenz. Auch die geheilten Fälle sind negativ. Es ist jedoch negative Reaktion mit Heilung nicht gleichbedeutend.

b) Komplementbindungsversuche bei Erkrankungen mit bekannten, aber nicht züchtbaren Erregern: Lepra, Trypanosomen, Spirochäten, Malaria, Echinokokken.

1. Lepra. Eitner[58, 58a]) sah in einem Falle von Lepra eine positive Komplementbindungsreaktion bei Verwendung von Extrakten lepröser Organteile als Antigen. Jedoch ist dieser Fall nicht ganz einwandsfrei, da der Kranke wahrscheinlich außerdem noch luetisch infiziert war. Weitere Versuche Eitners ergaben, daß auch alkoholische Meerschweinchenherzextrakte an die Stelle des Antigens bei Lepra treten können.

Wechselmann und Meier erhielten mit dem Serum eines Leprösen eine positive Wassermannsche Reaktion bei der Verwendung von wäßrigem Luesextrakt, alkoholischem Normalextrakt und Lecithin als Antigen. In späteren, ausgedehnten Versuchen konnte Meier feststellen, daß die meisten tuberösen floriden Fälle von Lepra sowohl mit Luesextrakt als auch mit Tuberkulin positiv reagieren, während die makulo-anästhetischen Formen keine komplementbindenden Substanzen enthalten. Slatinéanu und Daniélopolu[206 b u. c]) kamen unabhängig von Meier zu den gleichen Resultaten. Bei der Verwendung von Lepraextrakt als Antigen erhielten sie in 95 % der Fälle positive Resultate. Die Komplementbindung mit Tuberkulin hängt nach der Meinung Slatinéanus damit zusammen, daß die meisten Leprösen gleichzeitig tuberkulös sind, wie die Resultate der subkutanen und konjunktivalen Tuberkulininjektionen zu beweisen scheinen.

2. Trypanosomen. Citron[36]) fand, daß das Serum von Kaninchen, die Einspritzungen von Blut- und Organextrakten tsetsekranker Ratten, die auf der Höhe der Infektion getötet wurden, erhalten hatten, mit Blut- und Organextrakten tsetsekranker Meerschweinchen Komplementbindung gab.

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß das Serum der Kaninchen vor der Immunisierung gegen die gleichen Extrakte geprüft wurde und sich unwirksam oder wenig wirksam erwies. Die Extrakte wurden in der Weise hergestellt, daß man das trypanosomenreiche Blut direkt in destilliertes Wasser laufen ließ und dann mit dieser blutreichen Flüssigkeit Leber und Milz der Ratten extrahierte. Zur Prüfung der Sera wurden in gleicher Weise hergestellte Meerschweinchenextrakte benutzt, um die Präzipitine gegen Ratteneiweiß auszuschalten. Zur Kontrolle wurden Kaninchen mit Normalrattenextrakt vorbehandelt und mit Normalmeerschweinchenextrakt geprüft. Für alle Versuche wurden die gleichen Extrakte verwendet.

Weitere Versuche mit Trypanosomen wurden von H. WEBER und MANTEUFEL unternommen.

WEBER[229]) verwendete als Antigen Organextrakte aus Leber, Milz, Knochenmark tsetsekranker Ratten und als Antiserum das Serum von infizierten Kaninchen und Ratten, die durch kombinierte Farbstoffarsenbehandlung mehrere Wochen am Leben erhalten, z. T. auch mit Organextrakten von tsetsekranken Tieren vorbehandelt waren. Einige dieser Versuche fielen positiv aus. Normales Rattenserum und normaler Organextrakt gaben nie weder miteinander, noch mit spezifischem Organextrakt bzw. Serum eine Hemmung der Hämolyse.

MANTEUFEL[138]) benutzte als **Antigen** Extrakte aus Blut und inneren Organen von Ratten, die mit Rattentrypanosomen infiziert waren und auf der Höhe der Infektion getötet wurden.

Die Blutextrakte wurden so hergestellt, daß je eine Ratte direkt in ein steriles ERLENMEYER-Kölbchen entblutet wurde, das 10 ccm steriles destilliertes Wasser und Glasperlen enthielt. Hierauf 24stündiges Schütteln im Schüttelapparat und Zusatz von Karbolsäure bis auf 0,5 % Phenolgehalt des Extrakts.

Die Extrakte aus den Rattenorganen wurden analog den Luesextrakten WASSERMANNS hergestellt. Für jeden Versuch wurden frische Extrakte benutzt.

Als **Antisera** dienten die Sera mit Ratten- und Dourinetrypanosomen mehrfach zum Zwecke der Immunisierung infizierter Ratten. Im übrigen war die Technik der Versuche ganz die bei der WASSERMANNschen Reaktion.

Das Resultat der Versuche MANTEUFELS war, daß zwar prinzipiell ein deutlicher Unterschied zwischen spezifischen und normalen Blutextrakten und zwischen spezifischem und normalem Serum auch bei der Trypanosomiasis sich nachweisen läßt, daß aber zur Differenzierung der verschiedenen Trypanosomen untereinander sowie zur Erforschung der Immunitätsverhältnisse die Anwendung der Komplementbindungsreaktion in der angegebenen Versuchsanordnung keinen wesentlichen Fortschritt erwarten läßt. Die Organextrakte zeigten im Gegensatz zu den Blutextrakten keine Differenzen.

LANDSTEINER, MÜLLER und PÖTZL[109, 110]) fanden, daß das Serum von mit Dourinetrypanosomen oder mit Trypanosoma gambiense infizierten Kaninchen mit Extrakten aus normaler Meerschweinchenleber deutliche Komplementbindung gab, während normales Kaninchenserum negativ reagierte. Quantitative Vergleiche mit spezifischen Extrakten wurden von diesen Autoren nicht vorgenommen. HARTOCH und JAKIMOFF[91]) bestätigen diese Befunde.

LEVADITI[125—127]) fand, daß die Lumbalflüssigkeit eines an Schlafkrankheit leidenden Menschen mit Syphilisextrakt Komplementbindung gab.

Sehr wechselnde Resultate erhielten Schilling und v. Hösslin[198d]) in ihren an Kaninchen, Meerschweinchen und Hunden unternommenen Versuchen.

3. Spirochäten. Manteufel[138]) prüfte das Komplementbindungsvermögen von mit Rekurrens- und Hühnerspirochäten zum Zwecke der Immunisierung mehrfach infizierten Ratten und Hühnern gegen spezifische Blut- und Organextrakte als Antigen. Die Technik war ganz analog der der Trypanosomenversuche. Bei den Versuchen mit Hühnerspirochäten wurden 3—4 ccm Blut auf 10 ccm Wasser zur Herstellung des Blutextraktes gewonnen.

Die Organextrakte zeigten keinen Unterschied gegen Normalextrakte. Dagegen war bei den spezifischen Blutextrakten häufig ein deutlicher Unterschied in der Reaktionsstärke im Vergleich zu Normalblutextrakten festzustellen.

Bei dem weiteren Verlauf ließen die Versuche erkennen, daß die Extrakte aus Rekurrensblut wechselseitig mit allen drei verschiedenen Formen von Rekurrensimmunseren positiv reagierten.

Kolle und Schatiloff[104a]) konnten bei experimentell mit Rekurrensspirochäten infizierten Mäusen und Ratten im Serum keine komplementbindenden Substanzen nachweisen. Dagegen erhielten sie mit dem Serum von Menschen, welche zwei Rekurrensanfälle in Rußland überstanden hatten, deutliche Reaktionen, die sich als streng spezifisch darstellten und nicht mit den nahestehenden amerikanischen und afrikanischen Rekurrensspirochäten eintraten.

4. Malaria. de Blasi[16a]) erhielt bei seinen Versuchen, in denen er als Antigen Blutextrakte von Malariakranken und als Antiserum das Serum von Kranken und Rekonvaleszenten benutzte, nur negative Resultate. Much und Eichelberg fanden in einigen Fällen von Malaria eine positive Komplementbindungsreaktion bei der Mischung mit Luesantigen.

5. Echinokokken. Nach Untersuchungen von Ghedini[87a]), sowie Weinberg und Parvu gibt das Serum von Menschen und Tieren, die Echinokokkuserkrankungen haben, Komplementbindung mit Extrakten aus den Parasiten, sowie mit Hydatidenflüssigkeit als Antigen.

c) Komplementbindungsversuche bei Erkrankungen mit unbekannten Erregern: Vaccine, Variola, Lyssa, Hogcholera, Scharlach.

1. Vaccine: Jobling[96]) fand im Blutserum vaccinierter Kälber Substanzen, welche bei der Mischung mit einem Extrakt aus Vaccinepusteln und Komplement letzteres banden. Kontrollversuche mit normalem Kälberserum ließen die Komplementbindung vermissen.

Das Antigen wurde in der Weise hergestellt, daß frische Impfpusteln mit 0,4 % Phenol enthaltender physiologischer Kochsalzlösung verrieben, 3—4 Tage in einem Schüttelapparat geschüttelt und dann klar zentrifugiert wurden. Diese Extrakte wirkten in größeren Mengen selbst hämolytisch, 1 ccm löste regelmäßig in 24 Stunden 1 ccm 5 % Hühnerblut. Außerdem zeigte sich auch hier das bereits oben erwähnte Phänomen der Komplementbindung durch den Extrakt ohne Antiserum. Als hämolytisches System kamen in Anwendung:

Hühnerblut, Immunhämolysin und Meerschweinchenkomplement in der Dosis von 0,05 ccm.

Im Gegensatz zu Jobling erzielten Heller und Tomarkin[92]) bei ihrer Nachprüfung nur negative Resultate.

2. Variola. BEINTKER[11c]) gibt an, daß das Serum von mit Pockenorganextrakt geimpften Kaninchen, als auch von mit Variola infizierten Menschen Komplementbindung gibt, wenn man Kuhpockenlymphe als Antigen benutzt.

3. Lyssa: HELLER und TOMARKIN[92]), sowie unabhängig von diesen Autoren FRIEDBERGER[79]), stellten Komplementbindungsversuche bei Lyssa an. Die Ergebnisse waren negativ.

Als Antigen dienten bei HELLER und TOMARKIN bei 350 Atmosphären gewonnene Preßsäfte aus Gehirnen von Kaninchen, die an Wut (Virus fixe und Straßenvirus) verendet waren. FRIEDBERGER verrieb solche Gehirne im Mörser mit der fünffachen Menge Kochsalzlösung oder Wasser, schüttelte dann 24 Stunden und zentrifugierte die Emulsion möglichst klar.

Das Antiserum gewannen HELLER und TOMARKIN durch subkutane Vorbehandlung (24—36 Einspritzungen) von Kaninchen mit Rückenmarksemulsion der mit Virus fixe getöteten Wuttiere. Entsprechend den Angaben von R. KRAUS über die Produktion der Antikörper bei Lyssa, wurde die Prüfung des Immunserums frühestens 2—3 Wochen nach der letzten Einspritzung entnommen. FRIEDBERGER benutzte als Lyssa-Serum das Serum eines mit Lyssa vorbehandelten Pferdes von hohem rabizidem Vermögen.

4. Hogcholera. DEDJULIN[53]) fand, daß das Serum von hogcholerakranken Schweinen zusammen mit einem Extrakt aus dem Knochenmark eines an der gleichen Krankheit gestorbenen Schweines Komplementbindung ergab, während diese ausblieb, wenn man das Schweineserum mit einem Extrakt von Schweinepestbazillen mischte. DEDJULIN sieht hierin eine Stütze der von DE SCHWEINITZ, DORSET, OSTERTAG und anderen neuerdings vertretenen Auffassung, daß die Erreger der Hogcholera unbekannte Mikroorganismen sind, und daß die Schweinepestbazillen ätiologisch bedeutungslos sind.

5. Scharlach. MUCH und EICHELBERG (siehe pag. 1098) fanden, daß das Serum von Scharlachkranken bzw. -Rekonvaleszenten mit gewissen Luesextrakten eine positive Komplementbindung geben kann. Die betreffenden Reagine können bereits sehr früh auftreten, erscheinen mitunter aber erst in der Rekonvaleszenz. Stets handelte es sich um eine bald wieder aus dem Serum verschwindende Reaktion. HAENDEL[90a]) erzielte die gleiche Reaktion bei der Verwendung von Leberextrakten scharlachkranker Kinder als Antigen (siehe auch pag. 1083 und 1084).

3. Die Differenzierung von Eiweißsubstanzen (NEISSER-SACHSsche Methode*).)

Wie bereits erwähnt, zeigte GENGOU[85]) schon im Jahre 1902, daß man mit Hilfe von Eiweiß und Eiweißantiserum in gleicher Weise wie mit Bakterien und bakteriellen Immunseris Komplementbindung erzielen kann. M. NEISSER und SACHS[173—175]) schlugen dann die praktische Verwendung dieser Reaktion zur Kontrolle und Ergänzung der Präzipitinreaktion für die Zwecke der forensischen Eiweißdifferenzierung vor, da man mit der Komplementbindungsmethode selbst die geringsten Spuren von Eiweiß nachweisen und differenzieren kann. FRIEDBERGER[78]), SCHÜTZE[200, 201]), UHLENHUTH[211]), und andere Autoren bestätigten die

*) Siehe UHLENHUTH, SACHS dieses Handbuch.

Befunde von Neisser und Sachs in allem Tatsächlichen. Um den weiteren Ausbau der Methodik und das Studium der Reaktion machten sich dann insbesondere zwei Mitarbeiter von H. Sachs, Rickmann[194]) und Bauer[197, 9, 10a]) verdient.

Die Methodik, deren zich Neisser und Sachs und ihre Mitarbeiter bedienen, ist bis auf einige kleine Abweichungen identisch mit der bereits im vorigen Abschnitt mitgeteilten Technik des Wassermannschen Laboratoriums*). Das zur Verwendung gelangende hämolytische System ist die Kombination:

Rinder- oder Hammelblut; vom Kaninchen gewonnenes hämolytisches Serum für Rinderblut; Meerschweinchenkomplement.

Neisser und Sachs[174]) hatten in einer zweiten Arbeit eine Vereinfachung der Methode derart empfohlen, daß an Stelle des Immunhämolysins das Normalhämolysin des Kaninchenserums für Rinderblut benutzt werden sollte. Diese Modifikation hat sich in praxi nicht bewährt und ist nicht empfehlenswert.

Das hämolytische Serum muß genau austitriert werden, indem man zunächst bestimmt, bei welcher Serumverdünnung 1 ccm 5% Rinderblut bei Gegenwart von 0,1 ccm Komplement in 2 Stunden Brutschranktemperatur gelöst werden. Zu den Komplementbindungsversuchen wählt man dann das $1^1/_2$—2fache Multiplum der komplett lösenden Menge.

Hierauf bestimmt man für diese Ambozeptormenge noch den Komplementbedarf nach folgendem Schema.

Blut	Hämolysin	Komplement	Resultat
1 ccm 5%	0,001	0,1	Komplette Hämolyse
Rinderblut	(2 × lösende Dosis)	0,075	do.
do.	do.	0,05	Fast komplett
do.	do.	0,025	Mäßige Hämolyse
do.	—	—	0 (keine Hämolyse)
do.	do.	—	0
do.	—	0,1	0

Die komplett lösende Menge Komplement liegt in vorliegendem Falle zwischen 0,05 und 0,075 ccm. Für den Komplementbindungsversuch verwendet man wiederum das $1^1/_2$—2fache Multiplum; d. h. hier 0,1 ccm.

Das Antiserum, mit welchem die Differenzierung des Eiweißes erfolgt, darf nicht in beliebiger Menge benutzt werden. Selbstverständlich dürfen die verwendeten Serummengen nicht zu gering sein, aber auch ein Überschuß von Antiserum ist mitunter schädlich, weil größere Serummengen an sich antikomplementär wirken, andererseits kann aber eine zu große Menge Antiserum, wie Moreschi[156—158]), Neisser und Sachs[173—175]), Liefmann[133]) gezeigt haben, auch die antihämolytische Wirkung verhindern. Es werden daher zur Bestimmung des Antiserums absteigende Mengen desselben mit der Testdosis des Komplements einerseits, andererseits mit Komplement und Antigen gemischt. Als Antigen gilt das homologe Serum. Da für die forensische Praxis zu fordern ist, daß $^1/_{10000}$ ccm Blutserum noch nachgewiesen werden kann, so wird als Antigendosis

*) Historisch ist zu bemerken, daß die Neisser-Sachssche Methode vor der Wassermannschen Reaktion entstand uud dem Wassermannschen Laboratorium die Grundlage für die ersten Versuche bot.

0,0001 ccm des entsprechenden Serums gewählt. Die Gemische bleiben 1 Std. im Brutschrank, dann erfolgt der Zusatz von Hämolysin und Erythrocyten. Für praktische Zwecke wählt man das $1^1/_2$—2fache Multiplum der Titerdosis des Antiserums, wobei freilich notwendig ist, daß diese Menge Serum allein (ohne Antigen) die Hämolyse nicht hemmt. Die Verwendung derart limitierter geringer Mengen Antiserum bietet den Vorteil, daß eine zu große Empfindlichkeit der Reaktion, die nach FRIEDBERGER [78]) die Beurteilung gelegentlich erschweren kann, wahrscheinlich vermeidbar ist.

Hat man das Antiserum einmal austitriert, so genügt dies für alle folgenden Bestimmungen. Vor jedem Versuch bestimmt man dann nur noch für ein hämolytisches Serum von bekanntem Ambozeptorengehalt die komplettierende Menge eines frischen Meerschweinchenserums und legt dann für den eigentlichen Versuch folgende zwei Reihen an:

I. Absteigende Mengen zu differenzierenden Antigens + Testdosis Antiserum + Testdosis Komplement — (1 Std. bei 37° C) — Hämolysin + Blut.

II. Absteigende Mengen Antigen + Testdosis Komplement — (1 Std. bei 37° C) — Hämolysin + Blut.

Die Reihe II ist eine notwendige Kontrolle, um etwaige hemmende Wirkungen, welche das Antigen ausübt, auszuschließen.

Hält man diese Angaben genau ein, so sind nach BAUER [9]) Fehlerquellen, welche einen irrigen positiven Befund vortäuschen, ausgeschlossen.

Was die Resultate der NEISSER-SACHSschen Methode betrifft, so stimmen alle Autoren darin überein, daß es mit ihr gelingt, kleinste Mengen Eiweiß nachzuweisen. Bezüglich der praktischen Verwendbarkeit dieser Methode bestehen jedoch noch Meinungsdifferenzen. UHLENHUTH [211]) erachtet nur dann Schlüsse für gerechtfertigt, wenn die Resultate der Untersuchung mit denen der Präzipitationsmethode übereinstimmen. FRIEDBERGER [78]) wies eine forensisch wichtige Fehlerquelle nach, indem er zeigte, daß sehr hochwertige Antisera selbst die Spuren menschlichen Eiweißes, die sich im Schweiße finden, erkennen lassen. Man vermeide deswegen entweder sehr hochwertige Sera, oder aber schalte diese Fehlerquelle in der Art aus, daß man ganz geringe Mengen Antiserum benutze (s. oben).

H. SACHS und J. BAUER [197]) fanden nämlich, daß bei der hier detailliert wiedergegebenen Technik, deren wichtigstes Merkmal die Verwendung verdünnter Antisera ist, die Komplementbindungsmethode weit spezifischer als die Präzipitationsmethode ist, indem bei verschiedenem Ausfall von Präzipitin- und Komplementbindungsversuchen in Parallelreihen stets die Komplementbindungsreaktion den wirklichen Verhältnissen entsprach. BAUER [9]) schließt daraus, daß heterologe Komplexe von Antigen und Antikörper bis zu einem geringen Grade der Fähigkeit der Komplementbindung entbehren, während die Verbindungen von homologem Antigen und Antikörper auch dann Komplement absorbierend wirken, wenn das Resultat der Präzipitinreaktion unterhalb der Grenze der Sinnfälligkeit gelegen ist. Hieraus ergebe sich, daß die Komplementbindungsmethode es erlaubt, die Eiweißdifferenzierung nicht nur empfindlicher und sinnfälliger, sondern auch spezifischer zu gestalten, als die Präzipitation. Ein weiterer wichtiger Punkt endlich ist nach Untersuchungen von SACHS und BAUER [197, 10a]) der, daß der Nachweis von Eiweißbeimengungen in Lösungen einer anderen Eiweißart mittels Präzipitation auf große Schwierigkeiten stößt, wenn nicht überhaupt unmöglich sein kann, daß dagegen das Komplementbindungsverfahren auch in diesen Fällen erfolg-

reich zum Ziele führt. In der forensischen Praxis dürfte daher die Methode der Komplementbindung für die Differenzierung des weniger konzentrierten Eiweißes in Gemischen verschiedener Eiweißarten von ganz besonderer Bedeutung sein.

Bruck[28]) hat die Neisser-Sachssche Methode in interessanten Versuchen für die Differenzierung verschiedener Affen- und Menschenrassen untereinander benutzt und dabei sehr beachtenswerte Ergebnisse erhalten, die jedoch bisher der Bestätigung von anderer Seite noch entbehren.

Die Technik der sogenannten Luespräzipitation.

Die ersten Präzipitationsversuche bei Lues wurden von Nagelschmidt und Kraus schon in der Zeit vor der Veröffentlichung der Wassermannschen Mitteilung angestellt.

Nagelschmidt[167a]) ging von dem Gedanken aus, daß bei der Immunisierung von Kaninchen mit Luetikerblut sich Antikörper (Präzipitine) nicht nur gegen das menschliche Eiweiß, sondern auch gegen die diesem beigemischte, unbekannte Lueskomponente bilden müßten. Um die Luespräzipitine sichtbar zu machen, sättigte er in dem erhaltenen Immunserum die Menschenpräzipitine durch Zusatz von normalem Menschenblut ab und ließ das Serum dann auf Luetikerblut resp. -Serum einwirken. In der Tat erhielt er bei dieser Versuchsanordnung in einigen Fällen ermunternde Resultate.

R. Kraus (zit. nach Pribram)[192a]) behandelte Kaninchen mit normalem und luetischem Menschenserum in der verschiedensten Weise vor und stellte dann quantitative Präzipitierungsversuche mit Normal- und Luesblut an. Ferner machte Kraus Absättigungsversuche mit normalem und Luesserum, sowie Präzipitierungsversuche mit dem Serum gesunder und syphilitischer Menschen auf das Serum gesunder und syphilitischer Menschen und Affen. Ferner ließ er präzipitierendes Serum, das durch Vorbehandlung von Versuchstieren mit Serum von Luetikern gewonnen wurde, auf das Serum gesunder und syphilitischer Affen einwirken. Alle diese Versuche hatten negative Ergebnisse.

Nach dem Bekanntwerden der Wassermannschen Reaktion wurden die Versuche, zu einer Luespräzipitationsmethode zu gelangen, erneut aufgenommen. Hierbei wurden von Fornet und Schereschewski, Porges und Meier, sowie Klausner bemerkenswerte Resultate erzielt. Die praktische Bedeutung der verschiedenen Präzipitationsmethoden ist zurzeit noch gering, jedoch ist ein weiterer Ausbau derselben für die Bedürfnisse der Klinik nicht unwahrscheinlich. Theoretisch verdienen diese Reaktionen jedenfalls höchstes Interesse.

1. Die Fornet-Schereschewskische Reaktion.

Fornet und Schereschewski[70]) injizierten Kaninchen in Abständen von je 4 Tagen syphilitische menschliche Leber- und Papelaufschwemmungen in steigenden Mengen intraperitoneal und subkutan. Kontrolltiere wurden mit normalem menschlichen Material vorbehandelt. Die 10 Tage nach der letzten Injektion entnommenen Serumproben wurden nun mit den vorher hergestellten Leberauszügen in verschiedenen Kombinationen zusammengebracht. In einem Falle wurde so ein Serum erhalten, das nur dort eine Präzipitation gab, wo der syphilitische Leberauszug mit dem antisyphilitischen Serum zusammentraf, während die übrigen Gläser klar blieben.

FORNET und SCHERESCHEWSKI[70–72]) gingen dann dazu über, Blutsera von Paralytikern und Tabikern, deren Gehalt an „antisyphilitischen Stoffen" durch die Komplementbindung erwiesen war, auf Blutserum von frisch infizierten Luetikern und zur Kontrolle auf normales Menschenserum einwirken zu lassen. Hierbei supponierten sie, daß sich in dem frisch infizierten Blut das Syphilisvirus als Präzipitinogen finde, während die Metasyphilitiker die Antikörper gegen dieses Virus in Gestalt von Präzipitinen hätten. Die Versuche wurden in Gestalt einer Ringprobe angestellt, wobei sich FORNET und seine Mitarbeiter einer Reihe von technischen Kunstgriffen bedienten, die für das Gelingen der Reaktion von großer Wichtigkeit sind.

Technik der FORNETschen Präzipitatreaktion.

Die verwendeten Sera müssen vollkommen klar sein. Stark hämoglobinhaltige Sera sind zu verwerfen. Zur Erzielung klarer Sera empfiehlt es sich, die Blutentnahme frühmorgens vorzunehmen: häufig können etwaige, trotz allem noch vorhandene Trübungen durch scharfes Zentrifugieren oder durch die Filtration (Papier, Schleicher & Schüll, Nr. 602) entfernt werden. Die klaren Sera werden mittels einer sterilen PASTEURschen Kapillarpipette, welche mit einem kleinen Gummiball versehen ist, in 8 cm hohen und 0,5 cm weiten Gläschen vorsichtig übereinander geschichtet. Stehen größere Serummengen zur Verfügung, so geschieht dasselbe mittels graduierter Pipetten, aus denen je 0,15 ccm in 7 cm hohe und 0,8 cm weite Gläschen gegeben werden. Je 20 Gläschen stehen zweckmäßig in einem schwarzen Holzgestell, an dessen Rückseite ein schwarzer Tuchstreifen in beliebiger Höhe verstellbar ist. Ein an beiden Kurzseiten angebrachter Querstab schützt das Gestell vor dem Umfallen und gestattet gleichzeitig, allen Gläschen eine für das Eintropfen des zu überschichtenden Serums besonders geeignete Neigung von etwa 45^0 zu geben. Jedes Serum gelangt sowohl unverdünnt, als auch in einer mit 0,85$^0/_0$iger NaCl-Lösung hergestellten Verdünnung von 1 : 5 und 1 : 10 zur Verwendung. Um eine möglichst scharfe Schichtung zu erzielen, läßt man das spezifisch leichtere Serum vorsichtig an der Wand des schräg gestellten Gläschens auf das schon vorher hineingegebene, spezifisch schwerere Serum herabfließen. Bei positivem Ausfall der Reaktion tritt dann entweder bald, oder aber spätestens innerhalb von 2 Stunden (bei Zimmertemperatur) an der Berührungsstelle der beiden Seren ein feiner Ring auf, welcher besonders deutlich wird, wenn man das direkt durchfallende Tageslicht noch durch ein schräg hinter die Gläschen gehaltenes, schwarzes Papier abblendet. Brutschranktemperatur beschleunigt zuweilen die Reaktion. Für die Konservierung der zu untersuchenden Sera empfiehlt FORNET den Zusatz von Formalin 1 : 10 000 oder das Einschmelzen in FORSTERschen Glasröhren. Als Beispiel möge nachstehende Tabelle dienen:

(Siehe Tabelle pag. 1120.)

Eine Reaktion ist nur dann als positiv anzusehen, wenn die entsprechenden Kontrollen beider Reagentien mit normalem Serum in den angegebenen Verdünnungen negativ ausgefallen sind. Ausnahmsweise kann ein Normalserum Luespräzipitine, aber nie Luespräzipitinogen enthalten. Die WASSERMANNschen Antistoffe (Reagine) sind weder mit dem Präzipitin noch mit dem Präzipitinogen identisch.

CITRON und Fr. BLUMENTHAL[42]), PLAUT, HEUCK und ROSSI[184, 184a]), BAUER[10, 11]), SACHS und ALTMANN (zit. nach LANDAU[107a])) bestätigten die

Angaben Fornets insoweit, als sie ebenfalls beobachteten, daß bei der Überschichtung von Luetikerseren in verschiedenen Verdünnungen Ringe entstehen können. Allein Plaut und seine Mitarbeiter fanden, daß die von Fornet betonte Spezifizität der Reaktion nicht besteht, indem sowohl Normalsera relativ häufig ebenso wie luetische reagieren, als auch ein und dasselbe Serum, in verschiedenen Verdünnungen überschichtet, Ringbildung zeigen kann. Die Beurteilung der Reaktion ist bei einiger Übung nicht schwer. Nur wirkliche Ringe sind als positiv zu bezeichnen.

Nr.	I. Präzipitinhaltige Sera			II. Präzipitinogenhaltige Sera			III. Normale Sera			Reaktion
	Paralyse			Lues			Gonorrhöe			
	unverdünnt	Verdünnung 1 : 5	Verdünnung 1 : 10	unverdünnt	Verdünnung 1 : 5	Verdünnung 1 : 10	unverdünnt	Verdünnung 1 : 5	Verdünnung 1 : 10	
1.	×	·	·	×	·	·	·	·	·	0
2.	×	·	·	·	×	·	·	·	·	Ring
3.	×	·	·	·	·	×	·	·	·	Ring
4.	×	·	·	·	·	·	×	·	·	0
5.	×	·	·	·	·	·	·	×	·	0
6.	×	·	·	·	·	·	·	·	×	0
7.	·	×	·	×	·	·	·	·	·	0
8.	·	×	·	·	×	·	·	·	·	Ring
9.	·	×	·	·	·	×	·	·	·	Ring
10.	·	×	·	·	·	·	×	·	·	0
usw.										

Michaelis[148a]) hat im Anschluß an die Fornetschen Versuche das Präzipitationsvermögen luetischer Sera gegen das wässerige Wassermannsche Luesantigen geprüft. In einem Falle hereditärer Lues fand er eine auffallend starke Niederschlagsbildung. Praktische Bedeutung hat dieser Befund, den auch Citron[42]) einige Male beobachten konnte, wegen seiner Seltenheit nicht erlangt.

Die Frage, ob es sich bei der Fornetschen „Präzipitation" um eine spezifische Reaktion handelt, ist noch unentschieden. Aber selbst wenn dies der Fall wäre, ist die Bedeutung der Reaktion in praxi nur gering. Die Untersuchung ist nicht weniger zeitraubend und kompliziert als die Komplementbindung. Auch die Beschaffung des präzipitierenden Serums in größeren Mengen ist in praxi nicht einfach. Vor allem aber sind die Resultate viel zu inkonstant.

Was die theoretische Grundlage der Methode betrifft, so ist es völlig ungewiß, ob es sich hier um eine echte Präzipitation oder um Fällungsvorgänge handelt, welche auf ähnlicher Grundlage beruhen, wie die gleich zu besprechenden Reaktionen von Porges und Meier, sowie von Klausner.

2. Die Porges-Meiersche Reaktion.

Porges und Meier studierten ausgehend von der Auffassung, daß die Komplementbindungsreaktion mit physikalisch-chemischen Zustandsänderungen der reagierenden Kolloide zusammenhängt, welchen Einfluß luetische Sera bei der direkten Einwirkung auf den physikalisch-chemischen Zustand einer Lecithinsuspension haben. Sie fanden, daß luetische Sera mit Lecithin Ausflockung geben. Die Reaktion ist von einem bestimmten Mengenverhältnis zwischen Serum und Lecithin abhängig.

Als optimale Konzentration erwies sich ihnen 1 ccm eines im Verhältnis von 1 : 5 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnten Serums auf 0,2 ccm der 1 %igen Lecithin-Stammsuspension. Diese in dünnen Präzipitierungsröhrchen zugesetzte Mischung kommt auf einige Stunden in den Brutschrank. Das Resultat der Reaktion ist eine diffus auftretende, anfangs sehr feine, dann immer gröber werdende Flockenbildung, welche bei stark wirksamen Seris zur Bildung eines Niederschlages führt, mit mehr oder weniger vollständiger Klärung der obenstehenden Flüssigkeit. Der Eintritt der Reaktion kann sofort erfolgen. Die Reaktion wird jedoch in der Regel erst nach einer halben bis zu 24 Stunden deutlich erkennbar.

Bei der Ausflockungsreaktion bezeichnen PORGES und MEIER als schwach positiv (+) die diffuse feinkörnige Trübung der Flüssigkeit ohne Bildung eines Bodensatzes nach 24 Stunden, als positiv (++) die Bildung eines geringen Bodensatzes mit zurückbleibender Trübung der obenstehenden Flüssigkeit, als stark positiv (+++) eine völlige Ausflokkung der gesamten Lecithinmenge mit völliger Klärung der Flüssigkeit.

Nach den Untersuchungen von PORGES und MEIER, die anfangs durch NOBL und ARZT[177]), GROSZ und VOLK[88]), STERNBERG[207a]) u. a. bestätigt wurden, geben die meisten Luetikersera einen flockigen Niederschlag. Es zeigte sich jedoch sehr bald, daß die ursprüngliche Annahme von PORGES und MEIER, daß normale Sera die gleiche Reaktion nicht geben, in dieser Form unzutreffend ist [NOBL und ARZT[177]), SALOMON, PORGES, NEUBAUER und ELIAS[59a]), LANDSTEINER und MÜLLER[113a]), KRAUS[105d]) und V. EISLER[58]), STUMME[208]), MEIER[142]), FRITZ und KREN[82]), WEIL und BRAUN[238]).

Namentlich schwere Phthisen, Tumoren, Lepra, Trypanosomiasis scheinen Lecithin ausflocken zu können, aber auch ganz normale Menschensera und besonders Rindersera (TOYOSUMI[210]) besitzen die gleiche Fähigkeit.

ELIAS, NEUBAUER, PORGES und SALOMON[59a]) empfehlen daher, neuerdings an Stelle des Lecithins das Natrium glycocholicum MERCK zu wählen*). Dieses Präparat hat vor dem Lecithin den Vorzug, daß es ein trocknes Pulver ist, das sich nicht so leicht wie Lecithin zersetzt. Es ist in destilliertem Wasser leicht löslich, so daß die Ungleichmäßigkeit der Suspensionen, die eine Hauptquelle der Unzuverlässigkeit der Lecithinreaktion bildet, hier wegfällt.

Die Technik der modifizierten PORGESschen Präzipitinreaktion.

Frisch bereitete 1 %ige Lösung von Natrium glycocholicum (MERCK) in destilliertem Wasser wird mit vollständig klar zentrifugierten, eine halbe Stunde bei 56° inaktiviertem Serum zu gleichen Teilen gemischt. Aktive Sera können auch verwendet werden, jedoch ist die Reaktion dann weniger spezifisch. Bei Anwendung schmaler Präzipitationsröhrchen von ca. 6—7 mm Durchmesser genügen je 0,2 ccm beider Reagenzien. Die Probe muß, vor gröberen Erschütterungen geschützt, 16—20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Zeit haben sich bei positiven Seren deutliche Flocken gebildet, die sich meistens an der Oberfläche der Flüssigkeit zusammenballen. Trübungen oder Spuren von Flockungen sind als negativ anzusehen. Unzulässig sind folgende Modifikationen:

1. Schichtung der beiden reagierenden Substanzen. In diesem Falle zeigte sich immer eine ringförmige Trübung, da sich in den einzelnen

*) Siehe PORGES dieses Handbuch.

Schichten die verschiedensten Mischungsverhältnisse bilden, darunter auch solche, die bei jedem Serum eine Fällung geben.

2. Anwendung von Bruttemperatur, da die Natrium glykocholicum-Lösung ein guter Bakteriennährboden ist.

3. Benutzung einer nicht frisch bereiteten Lösung.

4. Zusatz von Karbol, da hierdurch die Fällung anodischer Kolloide, zu denen das glykocholsaure Natrium gehört, gefördert wird, so daß auch bei Nichtluetischen die Reaktion eintritt.

5. Die Verwendung von trüben oder sehr stark hämoglobinhaltigen Seris.

6. Die Benutzung besonderer Hilfsmittel zur Beurteilung der Reaktion: Lupen, seitliche Beleuchtung. Die Reaktion ist nur bei deutlichen, makroskopisch sichtbaren Flocken als positiv zu betrachten.

Fritz und Kren[82]), die auch mit glykocholsaurem Natron gearbeitet haben und angeben, daß diese Reaktion nicht spezifischer als die Lecithinausflockung ist, haben sich einer anderen Technik als Porges bedient.

Die Resultate von Elias, Neubauer, Porges und Salomon[59a]) sind befriedigend, bedürfen jedoch noch der Nachprüfung und Bestätigung. Von einer Spezifität der Reaktion im strengen Sinne kann keine Rede sein.

3. Die Klausnersche Wasser-Reaktion.

Bei Versuchen, eine eventuelle gegenseitige Beeinflussung von Reizserum aus Papeln uud Sklerosen einerseits und Blutserum von Syphilitikern andererseits zu studieren, fand Klausner[99—101]) die Tatsache, daß mit destilliertem Wasser stark verdünnte Mengen Reizserums beim Zusammenbringen mit Luetikerserum einen flockigen Niederschlag ergaben. Kontrollversuche, in denen er an Stelle des verdünnten Reizserums nur destilliertes Wasser als Reagens benutzte, zeigten mit luetischem Serum das gleiche Phänomen. Zur Anstellung der Reaktion empfiehlt Klausner folgendes Verfahren:

In Standgläschen von $^1/_2$ cm Breite und 7 cm Höhe bringt man 0,2 des zu untersuchenden, völlig klaren Serums und fügt dazu 0,7 oder besser 0,6 ccm destilliertes Wasser. Das Serum muß aktiv sein (Citron[46a])), inaktive Sera geben die Reaktion nicht oder nur undeutlich. Die ungünstigen Resultate mancher Nachuntersuchungen führt Kreibich[105e]) darauf zurück, daß die geprüften Sera nicht ganz frisch untersucht wurden. Man untersuche sofort oder höchstens 2 Stunden nach der Entnahme. Hämoglobin- oder fetthaltige Sera sind ungeeignet.

Im Verlaufe von einigen, höchstens 15 Stunden zeigen die Gläschen eine 2—4 mm hohe, den Boden dicht belegende Ausfällung. Manchmal sind noch in der Flüssigkeitssäule einige makroskopisch deutlich sichtbare Flöckchen suspendiert. Nach neueren Angaben Klausner tritt bei frischer Lues die stärkste Reaktion in 7—9 Stunden ein. Bei älterer Lues erfolgt erst nach 12 Stunden eine schwache Reaktion. Die Quecksilberkur beeinflußt den Ausfall der Reaktion nach Klausner in dem Sinne, daß zunächst die zum Ausfällen nötige Zeit länger wird, erst später verringert sich das Präzipitat selbst.

Citron[46, 46a]), Sachs und Altmann[107a]), Nobl und Arzt[177]), Fritz und Kren[82]) u. a. bestätigten das Phänomen selbst, lehnen aber im Gegensatz zu Klausner die klinische Brauchbarkeit der Methode zum Ersatz der Wassermannschen Reaktion ab, weil die Reaktion ihrem Wesen nach unspezifisch sind. In der Tat findet man ähnliche Reaktionen bei Typhus (Klausner, Citron), Pneumonie (Klausner), Masern (Citron), Lupus (Klausner) usw. Was die Natur dieser Reaktion betrifft, so sieht Klausner

in ihr eine Globulinreaktion, welcher Auffassung sich die anderen Autoren angeschlossen haben. KREIBICH gibt neuerdings an, daß die ausfallende Substanz Fibrinoglobulin sei.

Was die Ursache der Ausfällung ist, ist noch unbekannt. Es könnte sich um eine Vermehrung von bestimmten Globulinen im Blutserum handeln, was mit der Beobachtung von MOLL [154, 155]) und anderen Autoren in präzipitierendem Serum übereinstimmen würde. Hierfür ließen sich auch die Resultate von NONNE und APELT [178]), MARIE und LEVADITI [139a]) u. a. anführen, die fanden, daß man mit Ammonsulfat und ähnlichen Salzen in der Lumbalflüssigkeit von Paralytikern Fällungen bekommt. Aber es können auch andere Momente in Frage kommen, die zu veränderten Fällungsbedingungen der in Betracht zu ziehenden Globuline führen.

CITRON und SACHS und ALTMANN sehen in der KLAUSNERschen und in der PORGESschen Reaktion das gleiche Phänomen, das nur durch die Verschiedenheit des Mediums gewisse Differenzen zeigt. Wahrscheinlich ist auch dieFORNETsche Reaktion letzten Endes auf die gleiche Ursache zurückzuführen. Hierfür sprechen besonders die Befunde von SACHS und ALTMANN [107a]), welche zeigten, daß für Ausflockungsreaktionen auch Seifenlösungen, Alkohol usw. verwendet werden können.

Hierzu mischt man gleiche Teile 0,3—0,35 %iger Lösung von ölsaurem Natron und Serum oder je einen Teil 0,5 %iger Seifenlösung und 20 %igen Alkohols und dazu 2 Teile Serum. Alkohol genügt auch allein, wenn man 2 Teile 20 %igen Alkohols und 1 Teil Serum mischt. Die Niederschlagsbildung tritt nach einigen Stunden auf.

Bei der Überschichtung der Sera mit Wasser oder 20 %igem Alkohol sieht man intensivere Ringbildungen bei dem Serum von Luetikern, als bei normalem Serum.

Literatur.

1) ALBARRAN und JUNGANO, XI. Session de l'Assoc. franç. d'urologie. 10—12. Okt. 1907.

1a) ARMAND-DELILLE, Réaction de WASSERMANN dans le liquide céphalorachidien des paralytiques généraux. Soc. Med. des Hopitaux 20. 12. 07.

1b) Ders., Déviation du complément par les serums antitoxiques en présence des toxins correspondants. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908, pag. 417. 7. Nov.

2) AXAMIT, Bakterienextrakt und Komplementablenkung, Centralbl. für Bakt. 1906, Orig. Bd. XLII, Heft 4 u. 5.

3) BAB, Diskussionsbemerkungen zu CITRON. Ver. für Innere Medizin. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 30.

3a) Ders., Kurze Mitteilung zu dem Aufsatz von WASSERMANN und PLAUT über syphilitische Antistoffe in der Cerebrospinalflüssigkeit von Paralytikern. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 49.

4) Ders., Bakteriologie und Biologie der kongenitalen Syphilis. Zeitschr. für Geburtshilfe und Gynaekol. 1907, Bd. LX, Heft 2.

5) Ders., Beitrag zur Bakteriologie der kongenitalen Syphilis. Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 46.

6) Ders., Diskussionsbemerkungen zu FLEISCHMANN, BLASCHKO und CITRON. Berliner med. Gesellsch. 11. 3. 08.

6a) BAR und DAUNAY, Valeur de la reaction de Wassermann au point de vue du diagnostic de la syphilis latente chez le nouveau-né. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908, pag. 1085. 20. Juni.

7) BALLNER und RAIBMEYER, Über die Verwertbarkeit des Phänomens der Komplementablenkung zur Differenzierung von Kapselbakterien. Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 13.

8) Dies., Über die Verwertbarkeit der Komplementablenkungsmethode für die Differenzierung der Mikroorganismen, nebst Bemerkungen über den Zusammen-

hang dieses Phänomens mit der Agglutinations- bzw. Präzipitationsreaktion. Arch. für Hygiene 1907, Bd. LXIV, Nr. 2.

8a) Ballner und Decastello, Über die klinische Verwertbarkeit der Komplementbinungsreaktion für die Serodiagnostik der Syphilis. Deutsche med. Wochenschrift 1908, Nr. 45.

9) Bauer, Über die Spezifizität der biologischen Eiweißdifferenzierung. Arbeiten aus dem K. Institut für exper. Therapie zu Frankfurt a. M. 1907, Heft 3.

10) Ders., Zur Methodik des serologischen Luesnachweises. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 12.

10a) Ders., Über biologische Milchdiffenzierung. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 16.

11) Ders., Wassermannsche Luesreaktion. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 17.

11a) Ders., Über die bei der Wassermannschen Luesreaktion wirksamen Körper und über die hämolytischen Eigenschaften der Organextrakte. Biochemische Zeitschr. 1908, Bd. X, Heft 4—6.

11b) Bauer und Meier, Technik und klinische Bedeutung der Wassermannschen Reaktion. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 51.

11c) Beintker, Über das Verhalten der Bordetschen Reaktion bei Variola. Centralbl. für Bakt. 1908, Bd. XLVIII, Heft 4. I. Abt. Orig.

12) Beneke, Die Wassermannsche Syphilisreaktion. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 15.

13) v. Bergmann und Savini, Das hämolytische Hemmungsphänomen bei Phosphorvergiftung und anderen pathologischen Prozessen. Zeitschr. für exp. Path. und Therapie 1907, Bd. IV.

13a) v. Behring, Die praktische Bedeutung der Serodiagnostik der Syphilis. Münch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 48.

14) Besredka, Le sérum antistreptococcique et son mode d'action. Ann. de l'Inst. Pasteur 1904, Tome XVIII, pag. 363.

15) Besredka und Dopter, Contribution à l'étude du role des streptocoques au cours de la scarlatine. Ann. de l'Inst. Pasteur 1904, Tome XVIII, pag. 373.

16) Blaschko, Serodiagnostik der Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 14 und Med. Klinik 1908, Nr. 31.

16a) de Blasi, Sulla deviazione del complemento nella malaria umana. Annali d'Igiene sperimentale 1907, Tome 4, pag. 677.

17) Blumenthal, Gesellschaft der Charitéärzte, 16. 12. 07. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 11.

17a) Blumenthal, Diskussion zu Landsteiner und Citron. Bericht über den XIV. internat. Hygienekongreß Berlin 1908, Bd. IV, p. 111.

17b) Ders. und Wile, Über komplementbindende Stoffe im Harn Syphilitischer. Berliner klin. Wochensehr. 1908, Nr. 22.

18) Ders., Diskussionsbemerkung zu Fleischmann, Blaschko und Citron. Berliner med. Gesellsch., 11. 3. 1908.

18a) Boas und Hauge, Komplementablenkung bei Scharlach. Berliner klin. Wochenschrift 1908, Nr. 34.

19) Bordet, La méthode de mise en évidence des sensibilisatrices et ses applications récentes. Bulletin de l'Académie Royale de Médecine de Belgique, 26. 5. 06.

20) Bordet und Gay, Sur les relations des sensibilisatrices avec l'alexine. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1906, Tome 20, pag. 467.

21) Bordet und Gengou, Sur l'existence des substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XV, pag. 289.

22) Dies., Le microbe de la coqueluche. Ann. de l'Inst. Pasteur 1906, Tome XX.

23) Dies., Note complémentaire sur le microbe de la coqueluche. Desgl. 1907, Tome XXI.

24) H. Braun, Über den Nachweis der Antigene mittels der Komplementfixationsmethode. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 50.

25) C. Bruck, Experimentelle Beiträge zur Theorie der Immunität. Zeitschr. für Hygiene und Infekt. 1904, Bd. XLVI.

26) Ders., Zur biologischen Diagnose von Infektionskrankheiten. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 24.

27) Ders., Über spezifische Immunkörper gegen Gonokokken. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 34.

28) Ders., Die biolog. Differenzierung von Affenarten und menschlichen Rassen durch spec. Blutreaction. Berliner klin. Wochenschr. 1907, pag. 793.

29) Ders., Zur forensischen Verwertbarkeit und Kenntnis des Wesens der Komplementbindung. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 47.

29a) BRUCK, C., Die Serodiagnostik der Syphilis. X. Dermatolog. Kongreß, Frankfurt a. M. 1908.
30) Ders. und STERN, Die WASSERMANN-NEISSER-BRUCK'sche Reaktion bei Syphilis. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 10, 11 u. 12.
30a) Ders. und COHN, Scharlach und Serumreaktion auf Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 51.
30b) Dies., Über die klinische Verwertbarkeit der Komplementbindungsreaktion. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 50.
30c) BUTLER, Serumdiagnose der Syphilis. Journ. of Americ. Assoc. 1908, Nr. 50.
31) v. CALCAR, Zur Serodiagnose der Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 4.
31a) CALMETTE, MASSOL und BRETON, La réaction d'activation du venin de Cobra et la recherche des anticorps (BORDET-GENGOU) dans le sérum et dans le lait des sujets tuberc. Soc. de Biol. 1908, pag. 648. 19. Dez.
31b) CAMPANA, Serodiagnose der Syphilis. Riforma med. 1908, Nr. 34.
31c) CHRISTIAN und ROSENBLATT, Untersuchungen über Tuberkuloseantikörper und Immunität. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 39.
32) CITRON, Die Immunisierung gegen Schweineseuche mit Hilfe von Bakterienextrakten. Ein Beitrag zur Aggressinfrage. Zeitschr. für Hygiene 1906, Bd. LII. pag, 238.
33) Ders., Über natürliche und künstliche Aggressine. Centralbl. für Bakt., Orig., I. Abt. 1906. Bd. 41.
34) Ders., Experimentelle Beiträge zur Beurteilung der Hogcholeragruppe. Zeitschr. für Hygiene 1906, Bd. LIII, pag. 159.
35) Ders., Diskussionsbemerkungen Berliner Gesellsch. für Psychiatrie 5. 11. 06. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 5.
36) Ders., Über Komplementbindungsversuche bei infektiösen und postinfektiösen Erkrankungen (Tabes dorsalis etc.), sowie bei Nährstoffen. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 29, 5. 1165.
37) Ders., Schlußwort. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 30, Vereinsbeilage.
38) Ders., Über Tuberkuloseantikörper und das Wesen der Tuberkulinreaktion. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 36.
39) Ders., Erwiderung auf die Bemerkungen E. WEILS. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 43.
40) Ders., Die Serodiagnostik der Syphilis. Vortrag, gehalten auf dem XIV. International. Kongreß für Hygiene und Demographie Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 43, und Bericht über den XIV. Int. Kongreß usw. Berlin 1908, Bd. IV, pag. 101.
40a) Ders., Diskussionsbemerkungen zu FLATTEN, KOLLE und WASSERMANN: Bekämpfung der übertragbaren Genickstarre. Bericht über den XIV. Intern. Kongreß für Hygiene, Berlin 1908, Bd. IV, pag. 473.
41) Ders., Erwiderung auf die Arbeit von WEIL und BRAUN: Über Antikörperbefunde bei Lues, Tabes und Paralyse. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 49.
42) Ders., Diskussionsbemerkungen zu der Demonstration von Michaelis „Präzipitinreaktion bei Syphilis". Verhandlungen der Berliner med. Gesellsch. 6. 11. 07. Autoreferat Berliner klin. Wochenschr. 1907.
43) Ders., Complementbindung. Eulenburgs Real-Encyclopädie der gesamten Heilkunde 4. Aufl. 1908.
44) Ders. und SAVINI, Metoda fixatiunii complementului. Revista stiintelor medicale. Bukarest 1908.
45) Ders. und PLETNEW, Die Serodiagnostik der Syphilis (russisch). Medizinskoje Obosenie 1908, Nr. 2.
46) Ders., Die Bedeutung der modernen Syphilisforschung für die Bekämpfung der Syphilis. Vortrag, gehalten in der Berliner med. Gesellsch. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10.
46a) Ders., Demonstration einer neuen Methode der Serodiagnose der Syphilis. Berl. med. Gesellsch. März 1908. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 9.
47) Ders., Bemerkungen zu dem Aufsatz FR. LESSERS: Zu welchen Schlüssen berechtigt die WASSERMANNsche Reaktion? Med. Klin. 1908, Nr. 12.
48) Ders., Diskussionsbemerkungen zu den Vorträgen von NEISSER und WASSERMANN. Verhandlungen des 25. Kongresses für innere Medizin zu Wien. Wiesbaden 1908. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 12 und Neurolog. Centralbl. 1908, Nr. 9. (Autorreferat).
48a) Ders., Klinische Bakteriologie, Protozoologie und Immuno-Diagnostik in BRUGSCH-SCHITTENHELM: Lehrb. klinischer Untersuchungsmethoden. Berlin-Wien 1908.

48b) CITRON und REICHER, Untersuchungen über das Fettspaltungsvermögen luetischer Sera und die Bedeutung der Lipolyse für die Serodiagnostik der Lues. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 30.
48c) CITRON, Über Arterieninsuffizienz und Lues. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 48.
48d) Ders., Über die Grundlagen der biologischen Quecksilbertherapie der Lues. Med. Klinik 1909, Nr. 3.
49) COHEN, Sur les propriétés sensibilisatrices du sérum d'un enfant convalescent de méningite cérébrospinale. Bulletin de la Société royale des sciences médicales de Bruxelles, 7. 5. 06.
50) Ders., Meningite cérébro-spinale et tuberculose généralisée. Journal médical de Bruxelles, 1906, Nr. 30.
51) Ders., Un cas de méningite cérébro-spinale fruste. Bulletin de la Société des sciences. Bruxelles 1. 10. 06.
52) C. COHEN, Die Serodiagnose der Syphilis in der Ophthalmologie Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 18.
52a) DANIÉLOPOLU, Séroréaction de la syphilis dans les affections de l'aorte et des artères. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908, pag. 971.
53) DEDJULIN, Versuche zum Nachweis des Erregers der Schweinepest mit Hilfe der Methode der Komplementbindung. Zeitschr. für Infektionskrankh. u. Hygiene der Haustiere, Bd. III, Heft 3, 4.
54) DETRE, Über den Nachweis von spezifischen Syphilisantisubstanzen und deren Antigenen bei Luetikern. Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 21.
54a) DETRE und BREZEWSKI, Serumreaktion bei Syphilis. Orvozi Hetilap 1908, Nr. 29—31 und Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 49 u. 50.
55) v. DUNGERN, Beiträge zur Immunitätslehre. Münchener med. Wochenschr. 1900, Nr. 20.
56) EDEL, Diskussionsbemerkungen zu FLEISCHMANN, BLASCHKO und CITRON. Berliner med. Gesellsch., 11. 3. 08.
57) v. EISLER, Über Komplementablenkung und Lezithinausflockung. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 13.
57a) EHRNROOTH, Über die praktische Bedeutung der Alexinfixation (Komplementablenkung) für die forensische Blutdifferenzierung. Vierteljahrsschrift f. gerichtl. Medizin 1906, 3. Folge, Bd. XXXII, p. 276.
58) EITNER, Über den Nachweis von Antikörpern im Serum eines Leprakranken mittels Komplementablenkung. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 51.
58a) Ders., Zur Frage der Anwendung der Komplementbindungsreaktion auf Lepra. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 20.
59) ELIAS, NAUBAUER, PORGES und SALOMON, Theoretisches über die Serumreaktion auf Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 11 V. B. pag. 376, Nr. 21.
59a) Dies., Über die Methodik und Verwendbarkeit der Ausflockungsreaktion für die Serodiagnose der Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 23.
60) FINGER, Die neuesten Errungenschaften auf dem Gebiete der Syphilidologie. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 1.
61) Ders., Diskussion zu NEISSER und WASSERMANN. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 12.
62) W. FISCHER und G. MEIER, Über den klinischen Wert der WASSERMANNschen Serodiagnostik bei Syphilis. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 52.
63) FISCHER, Klinische Betrachtungen über die WASSERMANNsche Reaktion bei Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 4.
63a) Ders., Die WASSERMANNsche Syphilisreaktion und ihre diagnostische und therapeutische Bedeutung. Therapie der Gegenwart 1908, Heft 4.
64) FLEISCHMANN und MICHAELIS, Über experimentell in vivo erzeugten Komplementschwund. Med. Klinik 1906, Nr. 1.
65) FLEISCHMANN, Diskussion zu CITRON. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 30. Vereinsbeilage.
66) Ders. und BUTLER, Serum Diagnosis of Syphilis. Journal of American Med. Association, 14. 9. 07.
66a) FLEISCHMANN, Diskussion zu CITRON. Bericht über den XIV. internationalen Hygienekongreß Berlin 1908, Bd. IV, pag. 109.
67) Ders., Die Theorie, Praxis und Resultate der Serumdiagnostik der Syphilis. Dermatol. Centralblatt 1908, Nr. 8 und 9.
68) Ders., Theorie und Praxis der Serumdiagnose der Syphilis. Vortrag in der Berliner med. Gesellsch., 19. 2. 08. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10.
69) FOIX und MALLEIN, La réaction de BORDET und GENGOU vis à vis du streptocoque dans la scarlatine. Presse médicale 1907, Nr. 97.

70) FORNET und SCHERESCHEWSKY, Serodignose bei Lues, Tabes und Paralyse. Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 30.
71) FORNET, Über Luespräzipitine und Luespräzipitinogene. XIV. Intern. Hygienekongreß. Bd. IV.
72) Ders., SCHERESCHEWSKY, EISENZIMMER und ROSENFELD, Spezifische Niederschläge bei Lues, Tabes und Paralyse. Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 41.
73) FORNET, Über die Spezifizität der Präzipitatreaktion bei Lues und Paralyse. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 18.
74) FORNET, Die WASSERMANN — A. NEISSER — BRUCKsche Reaktion bei Syphilis. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 19.
75) Ders., Technique des divers procédés employés pour le diagnostic de la syphilis. Sem. méd. 1908, Nr. 19.
76) FRÄNKEL und MUCH, Über die WASSERMANNsche Serodiagnostik der Syphilis. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 12, pag. 662.
76a) Dies., Die WASSERMANNsche Reaktion an der Leiche. Ebenda.
77) FRENKEL-HEIDEN, Diskussionsbemerkungen zu FLEISCHMANN, BLASCHKO und CITRON. Berliner med. Gesellsch. 11. 3. 08.
78) FRIEDBERGER, Zur forensischen Eiweißdifferenzierung auf Grund der hämolytischen Methode mittels Komplementablenkung nebst Bemerkungen über die Bedeutung des Präzipitats für dieses Phänomen. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 15.
79) Ders., Hat die Methode der Komplementablenkung eine Bedeutung für die Diagnose der Lyssa? Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 29.
80) Ders., Über Haltbarmachung der Komplemente. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 41.
81) Ders., Über das Verhalten der Komplemente in hypertonischen Salzlösungen. Centralbl. für Bakt. 1. Abt., Orig., 1908, Bd. XLVI, Heft 5.
82) FRITZ und KREN, Über den Wert der Serumreaktion bei Syphilis nach PORGES, MEIER und KLAUSNER. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 12.
82a) GANGHOFNER und LANGER, Über die Verwertbarkeit des Phänomens der Komplementablenkung zum Nachweis von artfremdem Eiweiß im Blut. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 47.
83) GAY, The fixation of alexines by specific serum precipitates. Centralbl. f. Bakt. Orig., 1. Abt. 1905, Bd. 39, Heft 5.
84) Ders., La déviation de l'alexine dans l'hémolyse. Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, Tome XXII.
85) GENGOU, Sur les sensibilisatrices contre les substances albuminoides. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902. Tome XVI, pag. 734.
86) Ders., Nouvelle contribution à l'étude des sensibilisatrices des bacilles tuberculeux. C. R. de la Soc. de Biologie, Tome LXI, pag. 218 (28. 7. 06).
87) Ders., Zur Kenntnis der antituberkulösen Sensibilisatoren. Berliner klin. Wochenschrift 1906, Nr. 48.
87a) GHEDINI, Riceache sul siero di sangue. Gazetta degli ospedali 1906, 1907 Nr. 6 und 45.
87b) GOLDSTEIN, Serumdiagnostik der Syphilis. Prager med. Wochenschr. 1908, Nr. 32.
88) GROSZ und VOLK, K. k. Gesellsch. der Ärzte. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 6.
88a) Dies., Serodiagnostische Untersuchungen bei Syphilis. Wiener klin Wochenschr. 1908, Nr. 18 und Nr. 44.
89) GUTMANN, Diskussionsbemerkung zu FLEISCHMANN, BLASCHKO und CITRON. Berliner med. Gesellsch., 11. 3. 08.
90) HAENDEL, Beitrag zur Frage der Komplementablenkung. Deutsche med. Wochenschrift 1907, pag. 2030.
90a) Ders., Zeitschr. für Immunitätsforschung und exper. Therapie. Bd. I.
90b) HALBERSTÄDTER, MÜLLER und REICHE, Komplementbindung bei Syphilis hereditaria, Scharlach und anderen Infektionskrankheiten. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 43.
91) HARTOCH und JAKIMOFF, Zur Frage der Komplementbindung bei experimentellen Trypanosomosen. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 21.
91a) HECHT, Vereinfachung der Komplementbindungsreaktion bei Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 50 und Prager med. Wochenschr. 1908, Nr. 50.
92) HELLER und TOMARKIN, Ist die Methode der Komplementbindung zum Nachweis spezifischer Stoffe für Hundswut und Vaccine brauchbar? Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 20.
92a) HINRICHS, Med. Klin. 1908.

93) Hirschfeld, Zur Verwendung des Prinzips der Komplementablenkung zur Typhusdiagnose. Zeitschr. für klin. Med., Bd. LXI, Heft 3 und 4.
93a) Höhne, Die Serumdiagnose der Syphilis. Dermatol. Zeitschr. 1908, Bd. XV, Heft 3.
93b) Ders., Verwendung von Urin zur Wassermannschen Syphilisreaktion. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 32.
94) Hoffmann und Blumenthal, Die Serodiagnostik der Syphilis und ihre Verwendbarkeit in der Praxis. Dermatolog. Zeitschr. 1908, Bd. XV, Heft 1.
94a) Jodassohn, Die Bedeutung der modernen Syphilisforschung. Versammlung des Ärztlichen Vereins Olten (Schweiz) vom 31. Okt. 1908. Ref. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 48.
95) Jansky, J., Wassermann-Plautsche Methode. Casop. lék. cesk. 1907. Nr. 24 bis 25.
96) Jobling, The occurrence of specific immunity principles in the blood of vaccined calves. Journal of experimental med. 1906, Vol. VIII, Nr. 6.
96a) Jochmann und Töpfer, Zur Frage der Spezifizität der Komplementbindungsmethode bei Syphilis. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 32.
96b) Kafka, Über die klinische Bedeutung der Komplementbindungsmethode im Liquor cerebrospinalis bei der progressiven Paralyse. Monatsschr. für Psychiatrie 1908, Bd. XXIV, Heft 6.
96c) Kappelhoff, Klausners Serumreaktion. Tijdschr. voor Geneesk. 1908, Nr. 21.
97) Karewski, Über die Bedeutung der Wassermannschen Syphilisreaktion für die chirurgische Differentialdiagnose. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 1, pag. 15.
98) Ders., Diskussionsbemerkungen zu Fleischmann, Blaschko und Citron. Berliner med. Gesellsch. 4. III. 08.
99) Klausner, Vorläufige Mitteilung über eine Methode der Serodiagnostik bei Lues. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 7.
100) Ders., Über eine Methode der Serodiagnostik bei Lues. Wiener klin. Wochenschrift 1908, Nr. 11.
101) Ders., Über die Serodiagnose bei Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 13.
102) Klein, Über die Beeinflußung des hämolytischen Komplements durch Agglutination und Präzipitation. Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 48.
103) Knoepfelmacher und Lehndorff, Komplementablenkung bei Müttern hereditär-luetischer Säuglinge. Wiener med. Wochenschr. 1908, Nr. 12 und Med. Klinik 1908, Nr. 31.
104) Kolle und Wassermann, Versuche zur Gewinnung und Wertbestimmung eines Meningokokkenserums. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 11.
105) Kraus, R. und Volk, Versuche über Immunität bei Syphilis und Vaccine. IX. Kongreß der dermatolog. Gesellschaft Bern 1906 und Wiener klin. Wochenschrift 1906, Nr. 21.
105a) Kraus und Doerr, Meningokokkengifte und Gegengifte. Wiener klin. Wochenschrift 1908, Nr. 1.
105b) Kraus, Diskussion zur Demonstration von Porges. K. K. Gesellschaft der Ärzte in Wien. 31. Januar 1908. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 6.
105c) Ders., Diskussion zu dem Vortrage von Elias usw. Gesellschaft der Ärzte. 28. Februar 1908. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10.
105d) Ders., Über neuere Ergebnisse der Immunitätslehre. Ärztl. Verein in Brünn. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 20.
105e) Kreibich, Diskussion zu Bruck. X. Dermatol.-Kongreß 1908.
106) Kroner, Wassermannsche Serodiagnostik bei Lues. Berliner klin. Wochenschrift 1908, Nr. 4.
107) Kutscher, Ein Beitrag zur Agglutination der Meningokokken. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 46.
107a) Landau, Diskussion zu Fleischmann, Blaschko und Citron. März 1908. Berliner med. Gesellschaft. Berl. klin. Wochenschr. 1908.
108) Landsteiner und Stankovic, Über die Bindung von Komplement durch suspendierte und kolloid gelöste Substanzen. Centralbl. für Bakt. 1906. Orig. Abt. I, Bd. XLII, Heft 4.
109) Landsteiner, Müller und Poetzl, Über Komplementbindungsreaktion mit dem Serum von Dourinetieren. Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 46.
110) Dies., Zur Frage der Komplementbindungsreaktion bei Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 50.
111) Dies., Bemerkungen zu den Mitteilungen von Prof. Wassermann. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 2.

112) LANDSTEINER, K., Ätiologie der Syphilis. Immunität und Serodiagnostik bei menschlicher Syphilis. Bericht vom XIV. Internationalen Kongreß für Hygiene. Berlin 1908, Bd. II, pag. 118.
113) LANDSTEINER und MÜLLER, Bemerkungen zu der Mitteilung: Über die Beeinflußung von Antistoffen durch alkoholische Organextrakte. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 7.
113a) Dies., Diskussion. K. K. Gesellschaft der Ärzte. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 11.
114) LEBER, Klinisches und Experimentelles zur Serodiagnostik der Augenkrankheiten. 34. Zusammenkunft der ophthalmologischen Gesellschaft vom 5.—7. Aug. 1907. Zeitschr. für Augenheilkunde 1907, Bd. XVIII, Heft 3.
115) Ders., Med. Klinik 1907, Nr. 38.
115a) Ders., Diskussion zu CITRON. Bericht über den XIV. internationalen Hygienekongreß Berlin 1908, Bd. IV, pag. 111.
116) Ders., Diskussionsbemerkungen zu FLEISCHMANN, BLASCHKO und CITRON. Berliner med. Gesellsch. 11. III. 08.
117) Ders., Berichtigung zu der Arbeit: Die Serodiagnose der Syphilis in der Ophthalmologie von CURT COHEN. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 20.
117a) LEDERMANN, Diskussion zu FLEISCHMANN, BLASCHKO u. CITRON. Berliner med. Gesellsch. März 1908.
117b) Ders., Über den praktischen Wert der Serodiagnostik der Syphilis. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 41.
118) LESOURD, Recherches expérimentales et cliniques sur la présence d'une sensibilisatrices dans le sérum des typhiques. Thèse de Paris 1902.
119) LESSER, FR., Zu welchen Schlüssen berechtigt die WASSERMANNsche Reaktion? Med. Klinik 1908, Nr. 9.
120) Ders., Antwort auf die Bemerkungen des Herrn J. CITRON. Med. Klinik 1908, Nr. 12.
120a) Ders., Diskussion zu NEISSER und BRUCK. X. Dermatol. Kongreß 1908. Frankfurt a. M.
121) LEVA, Über den Einfluß gewisser Gifte (Alkohol, Adrenalin, Nikotin) auf die Produktion spezifischer Immunsubstanzen. Med. Klinik 1907, Nr. 16.
122) LEVADITI und MARIE, Action du liquide céphalo-rachidien des paralytiques généraux sur le virus syphilitiques. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1907, Mai und Sem. méd. 1907, Nr. 21.
123) LEVADITI, La séroréaction de la syphilis. La Presse méd. 1907, Nr. 41.
124) Ders., La question de la syphilis au XIV. Congrès d'hygiène et de démographie. La Presse médicale 1907, Nr. 90.
124a) Ders., Le sérodiagnostic de la syphilis. Revue pratique des malad. cut., syph. et vén., Tome VI, fasc. 10.
125) LEVADITI und YAMANOUCHI, Le sérodiagnostic de la syphilis. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1907, Tome LXIII, Nr. 38.
126) Dies., Diagnostic de la syphilis et de la paralysie générale. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908, 11. Jan. und Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908, Tome LXIV, Nr. 1.
127) Dies., La séroréaction de la syphilis et de la paralysie générale. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908, Tome LXIV, Nr. 8.
128) LEVADITI, LAROCHE und YAMANOUCHI, Le diagnostic précoce de la syphilis par la méthode de WASSERMANN. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908, 2. Mai, Tome LXIV, Nr. 15.
129) LEVADITI und MUTERMILCH, La solubilité dans l'alcool aqueux des antigènes cholériques. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908. Tome LXIV, Nr. 9. 7. März.
130) LEVADITI, RAVAUT und YAMANOUCHI, Localisation nerveuse de la syphilis et propriétés du liquide céphalo-rachiden. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908, 9. Mai, Tome LXIV, Nr. 16.
131) LEUCHS, Über die diagnostische Zuverlässigkeit und die Spezifizität der Komplementbindungsmethode bei Typhus und Paratyphus. Berliner klin. Wochenschrift 1907, Nr. 3 und 4.
132) LEUCHS und SCHÖNE, Über die Verwendbarkeit der Komplementbindung zur Typhusdiagnose. Zeitschr. für Hygiene 1908, Bd. LX, Heft 1.
133) LIEFMANN, Über Komplementablenkung bei Präzipitationsvorgängen. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 15.
134) v. LINGELSHEIM, Ausfällung bakterizider und globulizider Blutfermente durch Pflanzenschleim. Zeitschr. für Hygiene 1903, Bd. XLII, pag. 308.
134a) LODE und BALLNER, Zur Methodik der Komplementbindung. Münchener med. Wochenschr. 1908, Heft 10.

135) v. Loghem, Agglutination und Komplementablenkung mit Typhusimmunserum. Centralbl. für Bakt., Bd. XLV, Heft 6.
136) Lüdke, Über den Nachweis von Antituberkulin. Brauers Beiträge zur Klinik der Tuberkulose 1907.
137) Ders., Tuberkulin und Antituberkulin. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 15 und 16.
138) Manteufel, Untersuchungen über spezifische Agglomeration und Komplementbindung bei Trypanosomen und Spirochaeten. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1908, Bd. XXVIII, Heft 1.
139) Marie und Levaditi, Les „anticorps syphilitiques" dans le liquide céphalorachidien des paralytiques généraux et des tabétiques. Ann. de l'Inst. Pasteur 1907, pag. 138.
139a) Marie et Levaditi, La réaction des „anticorps syphilitiques" dans la paralysie et la tabes. Revue de Médecine 1907, Tome TXVII, pag. 613.
139b) Marie, Levaditi und Yamanouchi, La réaction de Wassermann dans la paralysie générale. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908, Tome LXIV, Nr. 4.
139c) Marie, Contrôle de Wassermann traitement spécifique des para-syphilitiques. Rev. pratiques des malad. cutenées 1908, Nr. 4.
139d) Maslakovitz und Liebermann, Theorie und Technik der Reaktion von Wassermann und ihre diagnostische Bedeutung. Centralbl. für Bakt., I. Abt., Orig., Bd. XLVII, Heft 3 und Russki Wratsch 1908, Nr. 15.
140) Meier, G., Komplementbindungsversuche bei Keuchhusten. Ver. für innere Medizin, Juli 1907, Bd. XV.
140a) Ders., Diskussion zu Landsteiner u. Citron. Bericht über den XIV. intern. Hygiene-Kongreß. Berlin 1908, Bd. IV, pag. 110.
141) Ders., Technik und klinische Bedeutung der Wassermannschen Reaktion auf Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 51.
142) Ders., Diskussionsbemerkungen zu Fleischmann, Blaschko und Citron. Berliner med. Gesellsch. 26. II. 08. Berliner klin. Wochenschr. 1908.
143) Ders., Diskussion zu Neisser und Wassermann, Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 12.
144) Metschnikoff, La syphilis expérimentale. Revue de Médecine 1907, T. XXIV, pag. 925.
145) Meyer, Fr., Diskussion zu dem Vortrag von Hellmer: Die Behandlung der Meningitis cerebro-spinalis. Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 44, pag. 1426.
146) Meyer, K., Über die Verwendbarkeit der Komplementbindungsmethode zur Diagnose tuberkulöser Exsudate. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 20.
146a) Ders., Über Serumdiagnose bei Lues, Tabes und Paralyse. Folia neuro-biologica 1908, Bd. I.
147) Michaelis und Fleischmann, Über die Erzeugung von Antikörpern durch Injektion artfremder Leberzellen. Zeitschr. für klin. Med. 1907, Bd. LVIII, Heft 5 und 6.
148) Michaelis, L., Die Wassermannsche Syphilisreaktion. Berliner klin. Wochenschrift 1907, Nr. 35.
148a) Ders., Präzipitinreaktion bei Syphilis. Berliner med. Gesellschaft. 6. Nov. 1907. Berliner klin. Wochenschr. 1907.
149) Michaelis und Lesser, Erfahrungen mit der Serodiagnostik der Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 6.
150) Michaelis, Disskussionsbemerkung zu Fleischmann, Blaschko und Citron. Berliner med. Gesellsch. 11. III. 08.
151) Micheli und Borelli, Sulla deviazione del complemento. Revista critica della Clinica Medica 1907, Nr. 43 und 44.
152) Dies., Osservazioni e ricerche sulla siero-diagnosi della sifilide. Ebenda 1908, Nr. 19 und 20.
153) Dies., Sulla sierodiagnosi della sifilide (Reazione di Wassermann). Reele Academia di Medicina di Torino, 21. II. 08.
154) Moll, Über Blutveränderungen nach Eiweißinjektionen. Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiologie, Bd. IV, Heft 12, pag. 578.
155) Ders., Zur Globulinvermehrung der Präzipitinsera. Zeitschr. für experim. Pathol. und Therapie 1906, Bd. III, pag. 325.
156) Moreschi, Zur Lehre von den Antikomplementen. Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 37.
157) Ders., Zur Lehre von den Antikomplementen. 2. Mitteilung. Ebenda 1906, Nr. 4.
158) Ders., Weiteres über Antikomplemente. Centralbl. für Bakt. 1906. Referat. Bd. XXXVIII. Beiheft, pag. 96.

159) MORESCHI, Über den Wert des Komplementablenkungsverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 38.
160) MORGENROTH und RABINOWITSCH, Die Immunitätsreaktionen tuberkulösen Gewebes und deren Zusammenhang mit der Theorie der Tuberkulinwirkung. Deutsche med. Wochenschr. 1907, pag. 705.
161) MORGENROTH und STERTZ, Über den Nachweis syphilitischer Antikörper im Liquor cerebrospinalis von Paralytikern. Virchows Archiv für patholog. Anatomie 1907, Bd. CLXXXVIII, pag. 166.
162) MUCH und EICHELBERG, Die Komplementbindung mit wäßrigem Luesextrakt bei nicht syphilitischen Krankheiten. Med. Klinik 1908, Nr. 18.
162a) MUCH, Eine Studie über die sogenannte Komplementbindungsreaktion mit besonderer Berücksichtigung der Lues. Med. Klinik 1908, Nr. 28 u. 29.
163) MÜHSAM, H., Klinische Leistungsfähigkeit der Serodiagnostik bei Lues. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 1.
164) MUIR und MARTIN, On the deviation of complement by a serum and its antiserum and its relations to the precipitin test. The Journal of hygiene 1906, Vol. VI, Nr. 3.
165) MÜLLER und OPPENHEIM, Über den Nachweis von Antikörpern im Serum eines an Arthritis gonorrhoica Erkrankten mittels Komplementablenkung. Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 29.
166) MÜLLER, RUD., Zur Verwertbarkeit und Bedeutung der Komplementbindungsreaktion für die Diagnose der Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 9.
166a) Ders., Diskussion zu ELIAS. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10.
167) Ders., Diskussion zu NEISSER und WASSERMANN. Ebenda, Nr. 12.
167a) NAGELSCHMIDT, Über Immunität bei Syphilis nebst Bemerkungen über Diagnostik und Serotherapie der Syphilis. Berlin 1904.
168) NEDRIGAILOFF, Zur Frage der Bedeutung der Fixatoren und Stimuline im bakteriziden Serum. Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLI, Heft 1.
169) NEISSER, Die experimentelle Syphilisforschung nach ihrem gegenwärtigen Stande. IX. Kongreß der Deutschen dermatolog. Gesellsch., Bern 1906.
170) NEISSER, BRUCK und SCHUCHT, Diagnostische Gewebs- und Blutuntersuchungen bei Syphilis. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 48.
171) NEISSER, Diskussionsbemerkung zu FLEISCHMANN, BLASCHKO und CITRON. Berliner med. Gesellsch. 4. III. 08.
172) Ders., Der gegenwärtige Stand der Pathologie und Therapie der Syphilis. XXV. Kongreß für innere Medizin, Wien 1908.
173) NEISSER, M. und SACHS, Ein Verfahren zum forensischen Nachweis der Herkunft des Blutes. Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 44.
174) Dies., Die forensische Blutdifferenzierung durch antihämolytische Wirkung. II. Mitteilung. Ebenda 1906, Nr. 3.
175) Dies., Bemerkungen zu der Arbeit von Prof. UHLENHUTH über Komplementablenkung und Bluteiweißdifferenzierung. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 39.
176) NICOLLE und POZERSKI, Une conception générale des anticorps et de leurs effets. Ann. de l'Inst. Pasteur 1908, Tome XXII, pag. 26.
177) NOBL und ARZT, Zur Serodiagnostik der Syphilis. (PORGES-MEIER- und KLAUSNERsche Reaktion.) Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 9.
177a) NOGUCHI, WASSERMANNsche Reaktion. Journ. of Americ. Assoc. 1908, Nr. 22.
178) NONNE und APELT, Archiv für Psychiatrie 1908.
178a) NONNE, Die Diagnose der Syphilis bei Erkrankungen des Zentralnervensystems. Verhandl. der Gesellsch. deutscher Nervenärzte 1908, pag. 44.
178b) OPITZ, Über die Bedeutung der WASSERMANNschen Reaktion für die Geburtshülfe. Med. Klinik 1908, Nr. 3a.
179) OTTO, Die staatliche Prüfung der Heilsera. Jena 1908.
180) PERITZ, Lues, Tabes und Paralyse in ihren ätiologischen und therapeutischen Beziehungen zum Lecithin. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 2.
180a) Ders., Über die Beziehung der Lues, Tabes und Paralyse zum Lezithin. 2. Jahresversammlung der Gesellschaft deutscher Nervenärzte 1908, pag. 87.
181) PFEIFFER und TRUNK, Über die Behandlung von Lungentuberkulosen mit MARMORECKs Antituberkuloseserum. Zeitschr. für Tuberkulose 1907, Bd. XI, H. 4.
182) PFEIFFER und MORESCHI, Über scheinbare antikomplementäre und Antiambozeptorwirkungen präzipitierender Sera im Tierkörper. Berliner klin. Wochenschrift 1906, Nr. 2.
183) PICK und PROSKAUER, Die Komplementbindung als Hilfsmittel der anatomischen Syphilisdiagnose. Med. Klinik 1908, Nr. 15.

184) Plaut, Heuck und Rossi, Spezifische Präzipitinreaktion bei Lues und Paralyse. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 2.

184a) Plaut und Heuck, Zur Fornetschen Präzipitatreaktion bei Lues und Paralyse. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 24.

185) Plaut, Über das Vorhandensein luetischer Antistoffe in der Cerebrospinalflüssigkeit von Paralytikern. Berliner Gesellsch. für Psychiatrie 5. XI. 06. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 5.

186) Ders., Über den gegenwärtigen Stand des serologischen Luesnachweises bei syphilidogenen Erkrankungen des Centralnervensystems. Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 30.

187) Ders., Untersuchungen zur Syphilisdiagnose bei Demenia paralytica und Lues cerebri. Monatsschr. für Psychiatrie und Neurologie 1907.

187a) Ders., Diskussion zu Citron. Bericht über den XIV. internationalen Hygiene-Kongreß Berlin 1908, Bd. IV, pag. 10.

188) Ders., Serodiagnostik der Syphilis. Centralbl. für Nervenheilkunde und Psychiatrie 1908. Neue Folge, Bd. XIX, Nr. 259.

188a) Ders., Die Wassermannsche Serodiagnostik bei erworbener und hereditärer Syphilis des Zentralnervensystems. 2. Jahresverversammlung der Gesellschaft deutscher Nervenärzte 1908, pag. 86.

189) Porges, Demonst. Berliner med. Gesellsch. 11. XII. 07. Berliner klin. Wochenschrift 1907, Nr. 51.

190) Ders., Die Serodiagnostik der Lues mittels Ausflockungsmethoden. Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 51.

191) Porges und Meier, Rolle der Lipoide bei der Wassermannschen Syphilisreaktion. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 15.

192) Porges, Die Serodiagnostik der Syphilis. XXV. Kongreß für innere Medizin. Wien 1908.

192a) Pribram, Über die Schwankungen der Präzipitinreaktion im normalen und pathologischen Serum. Zeitschrift f. experim. Pathologie u. Therapie, 1906, Bd. III, pag. 28.

193) Ranzi, Über Komplementablenkung durch Serum und Organe. Wiener klin. Wochenschr. 1906, Nr. 51.

193a) Raskin, Experimentelle Untersuchungen über die Leistungsfähigkeit des Komplementbindungsphänomens für die Typhusdiagnose. Centralbl. für Bakter., I. Abt., Orig., Bd. XLVIII, Heft 4.

193b) Raviast, Breton et Petit, Recherches sur la réaction de Wassermann chez 400 aliénés. Soc. de Biol., 29. Febr. 1908.

194) Rickmann, Beitrag zur biologischen Eiweißdifferenzierung. Zeitschr. für Fleisch- und Milchhygiene 1907, Nr. 6.

194a) Russowitsch, Die klinische Bedeutung der Wassermannschen Seroreaktion auf Syphilis. Inaug.-Dissert. Berlin 1908.

195) Sachs und Altmann, Über die Wirkung des oleinsauren Natrons bei der Wassermannschen Reaktion auf Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10.

196) Dies., Einfluß der Reaktion auf das Zustandekommen der Wassermannschen Komplementbindung bei Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 14.

197) Sachs und Bauer, Die Differenzierung des Eiweißes in Gemischen verschiedener Eiweißarten. Arbeiten aus dem Königl. Institut für experiment. Therapie zu Frankfurt a. M. 1907, Heft 3.

197a) Sachs, Diskussion zu Neisser und Bruck. X. Dermatologenkongreß Frankfurt a. M. 1908.

197b) Ders., Des modifications du serum sanguin par le chauffage. Semaine médicale 1908, Nr. 26.

197c) Ders. und Rondini, Theorie und Praxis der Wassermannschen Syphilisreaktion. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 44 und Zeitschr. für Immunitätsforsch. u. exper. Therapie, Bd. I, Heft 1.

198) Salomon, Diskussion zu Neisser und Wassermann. Wiener klin. Wochenschrift 1908, Nr. 12.

198a) Salomon, Diskussion zu Elias. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10.

198b) Schereschewski, Experimentelle Beiträge zum Studium der Syphilis. Centralblatt für Bakt. 1908, Bd. 47, Heft 1, Orig.

198c) Ders., Über Serumreaktion bei Scharlach und Masern. Münchener medizin. Wochenschr. 1908, Nr. 15.

198d) Schilling und Hösslin, Trypanosomeninfektion und Komplementbindung. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 33.

198e) SCHICHKUA und JAWEIN, Serodiagnose der Syphilis. Russki Wratsch 1908, Nr. 19.
198f) SCHLEISSNER, Zur Frage der Komplementbindung bei Scharlach. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 40.
199) SCHÖNE, Spezifische komplementbindende Stoffe im Blutserum von Typhusbazillenträgern. Münchener med. Wochenschr. 1908, Nr. 20.
200) SCHÜTZE, A., Über die Anwendung der Ablenkung hämolytischer Komplemente zum Nachweis von Fleischverfälschungen. Med. Klinik 1906, Nr. 18.
201) Ders., Forensischer Wert des NEISSER-SACHSschen Verfahrens der Komplementablenkung. Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 52.
202) Ders., Experimenteller Beitrag zur WASSERMANNschen Serodiagnostik bei Lues. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 5.
202a) Ders., Diskussion zu CITRON. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 30.
203) Ders., Über weitere Anwendungen der Methode der Komplementfixation. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 26.
204) Ders., Tabes und Lues. Zeitschr. für klin. Med. 1908.
205) Ders., Zur Frage der Spezifizität der Organantigene. Ebenda.
206) SELIGMANN, Beiträge zur Frage der sog. „Komplementbindung". Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 32.
206a) SELIGMANN und KLOPSTOCK, Serumreaktionen bei Scharlach. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 38.
206b) SLATINÉANU und DANIÉLOPOLU, Sur le présence d'anticorps spécifiques dans le sérum des malade atteints de lèpre. Soc. de Biol. 1908, 17. Okt.; 1908, 24. Nov.; 1908, 19. Dez. und Centralbl. für Bakt., I. Abt., Orig., Bd. XLVIII, Heft 4.
206c) SLATINÉANU, Réaction de fixation dans le lèpre en employant la tuberculine comme antigène. Soc. de Biol. 1908, 28. Nov.
206d) SOBERNHEIM, Über einige Eigenschaften des Tuberkuloseserums. Centralblatt für Bakt. 1906. Refer. Bd. XXXVIII, Beiheft pag. 114.
207) SPIEGLER, Diskussion zu NEISSER und WASSERMANN. Wiener klin. Wochenschrift 1908, Nr. 12.
207a) STERNBERG, Diskussion zu KRAUS. Ärztl. Verein zu Brünn. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 20.
208) STUMME, Diskussionsbericht der Kaiserl. königl. Gesellsch. der Ärzte. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 11.
209) STÖRCK, Bemerkungen zur Präzipitation bei Tuberkulose. Mitteil. I. Wiener klin. Wochenschr 1908, Nr. 8.
210) Ders., Bemerkungen zur Präzipitation bei Tuberkulose. Mitteil. II. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 11.
210a) TOYOSUMI, Über den Mechanismus der Lezithinausflockung durch Rinderserum. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 17.
211) UHLENHUTH, Komplementablenkung und Bluteiweißdifferenzierung. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 31 und Centralbl. für Bakt., Referate. Bd. XXXVIII, pag. 36.
212) VANNOD, Über Agglutinine und spezifische Immunkörper im Gonokokkenserum. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 49.
213) WASSERMANN, A. und CITRON, Zur Frage der Bildung von bakteriellen Angriffsstoffen im lebenden Organismus. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 28.
214) WASSERMANN, A. und BRUCK, Ist die Komplementbindung beim Entstehen spezifischer Niederschläge eine mit der Präzipitierung zusammenhängende Erscheinung oder Ambozeptorenwirkung? Med. Klinik 1905, Nr. 55.
215) Dies., Experimentelle Studien über die Wirkung von Tuberkelbazillenpräparaten auf den tuberkulös erkrankten Organismus. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 12.
216) WASSERMANN, A. und CITRON, Neuere experimentelle Beobachtungen über Nährstoffe. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 16. (V. B.)
217) WASSERMANN, A. und BRUCK, Experimentelle Studien über die Wirkung von Tuberkelbazillenpräparaten auf den tuberkulös erkrankten Organismus. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 12.
218) WASSERMANN, A. NEISSER und BRUCK, Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 19.
219) WASSERMANN, A. NEISSER, BRUCK und SCHUCHT, Nachweis spezifisch luetischer Substanzen durch Komplementverankerung. Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankh. 1906, Bd. LV.
220) WASSERMANN, A. und PLAUT, Über das Vorhandensein syphilitischer Antistoffe in der Cerebrospinalflüssigkeit von Paralytikern. Deutsche med. Wschr. 1906, Nr. 44.

234) Weil, E. und Braun, Über Antikörperbefunde bei Lues, Tabes und Paralyse. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 49.
235) Dies., Über die Entwicklung und den gegenwärtigen Stand der Serodiagnostik gegenüber Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 52.
236) Dies., Über die Beeinflußung von Antistoffen durch alkoholische Organextrakte. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 2.
237) Dies., Über die Rolle der Lipoide bei der Reaktion auf Lues. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 5.
238) Dies., Über die Entwicklung der Serodiagnostik bei Lues. Wiener klinische Wochenschr. 1908, Nr. 17.
239) Dies., Über Antikörper bei Tumoren. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 18.
240a) Wendelstadt, Über die Einwirkung von Glykogen auf hämolytische Vorgänge. Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV. Original.
240) Westenhoeffer, Über das Wesen und die Natur der Geschwülste. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 19.
241) Weygandt, Über die Frage syphilitischer Antistoffe in der Cerebrospinalflüssigkeit bei Tabes dorsalis. Physik.-Med. Gesellsch. Würzburg. Münchener med. Wochenschr. 1907, pag. 1557.
242) Widal und Lesourd. C. R. de Société de Biologie 27. Juli 1901.
243) Wilde, Über die Absorption der Alexine durch abgetötete Bakterien. Berliner klin. Wochenschr. 1901, Nr. 34.
244) Ders., Über die Beeinflußung der Alexinwirkung durch Absorption. Ein Beitrag zur Kenntnis der natürlichen Schutzstoffe des Blutes. Archiv für Hygiene 1902, Bd. XLIV, Heft 1.
245) Wolff-Eisner, Die vitale Antikörperreaktion im Vergleiche zur Komplementbindungsmethode bei Tuberkulose und Syphilis. Med. Klinik 1908, Nr. 11.
246) Ders., Diskussionsbemerkung zu Fleischmann, Blaschko und Citron. Berliner med. Gesellsch. 11. III. 08.
221) Wassermann, A. und Bruck, Über das Vorhandensein von Antituberkulin im tuberkulösen Gewebe. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 49.
222) Wassermann, A. und Citron, Über die Beziehungen des Serums zu gewissen Nährstoffen (Glykogen, Albumosen, Pepton). Zeitschr. für experim. Pathologie und Therapie 1907, Bd. IV.
223) Wassermann, A., Zur diagnostischen Bedeutung der spezifischen Komplementfixation. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 1.
224) Wassermann, M. und Meier, Zur klinischen Verwertung der Serumdiagnostik bei Lues. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 32.
225) Wassermann, A. und Leuchs, Erwiderung auf die Arbeit Moreschis: Wert des Komplementablenkungsverfahrens in der bakteriologischen Diagnostik. Berliner klin. Wochenschr. 1907, pag. 1596.
226) Wassermann, A., Stand der Serodiagnostik gegen Syphilis. Berliner klin. Wochenschrift 1907, Nr. 50 und 51.
227) Ders., Über die Serodiagnostik bei Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 12.
228) Ders., Über die Serodiagnostik der Syphilis und ihre praktische Bedeutung für die Medizin. XXIV. Kongreß für innere Medizin. Wiener klin. Wochenschrift 1908, Nr. 21.
229) Weber, H., Über Immunisierungs- und Behandlungsversuche bei Trypanosomenkrankheiten. Zeitschr. für experim. Pathologie und Therapie 1907, Bd. IV.
230) Weil, E. und Nakayama, Über den Nachweis von Antituberkulin in tuberkulösen Geweben. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 21.
231) Weil, E. und Axamit, Über freie Rezeptoren. Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 1.
232) Weil, E., Über den Luesantikörpernachweis im Blut von Luetikern. Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 18.
233) Ders., Bemerkungen zu der Publikation Citrons: Über Komplementbindungsversuche bei infektiösen und postinfektiösen Erkrankungen wie bei Nährstoffen. Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 43.

Nachtrag.

(Nach Abschluß des Manuskripts erschienene Arbeiten.)

Bar, P. und Dauney, R., Valeur de la réaction de Wassermann au point de vue du diagnostic de le syphilis latente chez le nouveau-né. Soc. de Biol. 1908, 20. Juni.

KLAUSNER, Klinische Erfahrungen über das Präzipitationsphänomen mit destilliertem Wasser im Serum Syphilitischer. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 26.
LÖFFLER und UHLENHUTH, Bericht über das NEISSER-SACHSsche Verfahren zur forensischen Untersuchung von Menschen- und Tierblut. Klin. Jahrb. 1908, Bd. XIX, Heft 1.
NEISSER, M. und SACHS, H., Desgl. Ebenda.
SCHULZ und MARX, Desgl. Ebenda.
STERN, Serodiagnostik der Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 32.
TAEGE, Die Technik der WASSERMANNschen Serodiagnostik der Syphilis. Münchner med. Wochenschr. 1908, Nr. 33.
TSCHERNOGUBOW, Einfache Methode der Serumdiagnose bei Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 47. Ref. Nr. 49.
TSCHLENOFF, Serodiagnostik der Syphilis. Russki Wratsch 1908, Nr. 10—14.
WASSERMANN, A., Die Diagnose der Syphilis bei Erkrankungen des zentralen Nervensystemes. Gesellsch. deutscher Nervenärzte 1908, pag. 73.
WASSERMANN, A., Desgl. Ebenda.
WECHSELMANN und MEIER, WASSERMANNsche Reaktion in einem Fall von Lepra. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 31.
WEIDANZ, Demonstration der Technik der WASSERMANNschen Reaktion auf Syphilis bei Anwendung kleinster Blutmengen. Zweite Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie, Berlin. Ref. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 48.
WEINBERG und PARVU, Diagnostic de l'echinococcose par la recherche des anticorps spécifiques. Soc. de Biol. 1908, pag. 562. 5. Dez.
Dies., Réaction de BORDET-GENGOU dans les helminthiases. Soc. de Biol. 1908, pag. 298. 17. Okt.
WILE, Vergleichende Experimente über die Gegenwart komplementbindender Substanzen im Serum und Urin Syphilitischer. Journ. of Americ. Assoc. 1908, Nr. 14.
WOLFF und MÜHSAM, Mit Tuberkulin komplementbindende Antistoffe im Serum Tuberkulöser. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 31.
ZEISSLER, WASSERMANNsche Reaktion bei Scharlach. Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 42.

XXXVII.

Über Kolloide und Lipoide in ihren Beziehungen zur Immunitätslehre.

Von

Dr. O. Porges

in Wien.

Einleitung.

Der weitere Ausbau der Immunitätslehre hat ursprünglich weit abliegende Gebiete in den Bereich der biologischen Forschung gezogen und ihre Methoden dienstbar gemacht. So hat hier die Physikochemie der Kolloide, im speziellen die der Protein- und Lipoidsubstanzen in den letzten Jahren eine gewisse Bedeutung erlangt. Es war daher eine notwendige Aufgabe, diese Gebiete in dem vorliegenden Handbuche zu berücksichtigen, zumal da ihre Methodik der Mehrzahl der Immunitätsforscher weniger geläufig ist. Mit Rücksicht auf den zugewiesenen beschränkten Raum mußte selbstverständlich von einer erschöpfenden Darstellung umsomehr abgesehen werden, als eine umfassende Kenntnis dieses Gebietes für den Serologen zunächst nicht erforderlich ist. Die Literatur dieser Richtung wird nur in ihren Ergebnissen möglichst ohne Berücksichtigung von Hypothesen zusammengestellt. Die allgemeinen Tatsachen der Kolloidchemie übersichtlich auf wenigen Seiten zusammenzufassen, ist natürlich nur auf Kosten der Gründlichkeit möglich. Die Darstellung der Methodik beschränkt sich auf diejenigen Punkte, die für die Ausführung der einschlägigen Versuche von Bedeutung sind.

Im ersten Abschnitte wird die Bedeutung der Kolloidchemie für die Immunitätslehre im allgemeinen behandelt, der zweite Abschnitt beschäftigt sich in dieser Richtung speziell mit den lipoidartigen Kolloiden, die nach den Proteinen die wichtigsten für die Immunitätsvorgänge sind.

A. Immunkörperreaktionen und Kolloidreaktionen.

I. Allgemeines über Kolloide.

a) Definition des Kolloidzustandes, Sol und Gel, Einteilung der Kolloide.

Graham, der Begründer der Kolloidchemie, hat Kolloide und Krystalloide als zwei gesonderte Welten der Materie bezeichnet. Seither

haben die Anschauungen über diese zwei Zustandsformen mannigfache Veränderungen durchgemacht. Gegenwärtig wird dem krystalloiden Zustand der amorphe Zustand gegenübergestellt. Der krystalloide Zustand ist durch eine bestimmte räumliche Anordnung der Teilchen charakterisiert, der amorphe Zustand gleicht in der richtungslosen Orientierung der Teilchen einer Flüssigkeit, von der er sich nur durch die größere innere Reibung unterscheidet. Demnach sind amorphe Substanzen eigentlich als Flüssigkeiten bzw. als Lösungen aufzufassen. Dementsprechend verläuft die Verflüssigung von Krystalloiden diskontinuierlich, die Teilchen müssen erst eine Umordnung erfahren, die Schmelzung amorpher Substanzen kontinuierlich, es wird die innere Reibung allmählich geringer. Die Kolloide gehören nun den amorphen Körpern an, d. h. sie sind ihrer Zustandsform nach Lösungen. Man unterscheidet nun nach der inneren Reibung das Gel, eine Zustandsform, die unter den Begriff der festen amorphen Substanz oder der sogenannten festen Lösung fällt, und das Sol, die leichtflüssige Zustandsform. Da der Kolloidzustand an die Gegenwart eines Lösungsmittels geknüpft ist, so spricht man von Hydrosol und Hydrogel, Alkohosol und Alkohogel etc., je nach der als Lösungsmittel dienenden Flüssigkeit.

Wie unterscheidet sich nun der Kolloidzustand von der gewöhnlichen, sogenannten echten Lösung? Eine Beantwortung dieser Frage ist nach dem gegenwärtigen Stande der Wissenschaft nicht mit Sicherheit zu geben. Die eine Ansicht geht dahin, daß die Lösung bei einer gewissen Molekulargröße der gelösten Substanz die Eigenschaften der kolloiden Lösung gewinnt. Diese Ansicht würde keine scharfe Trennung zwischen echter und zwischen kolloider Lösung zulassen, vielmehr würden beide durch kontinuierliche Übergänge zusammenhängen. Viel mehr Wahrscheinlichkeit hat eine zweite Erklärungsmöglichkeit, derzufolge die Dissoziation der kolloidal gelösten Teilchen nicht bis zu den Molekülen fortschreitet, wie bei den echten Lösungen, sondern bei größern oder kleinern Molekülkomplexen Halt macht. Diese Deutung würde uns die Reaktionseigentümlichkeiten der Kolloidlösungen als Oberflächenwirkungen der Komplexe einer Erklärung zugänglich machen und eine scharfe Abgrenzung gegenüber den echten Lösungen ergeben.

Alle übrigen den Kolloidlösungen zugeschriebenen Eigenschaften kommen in gewissem Grade auch den echten Lösungen zu und umgekehrt. So kommt eines der hervorstehendsten Merkmale der Hydrosole, das auch von Graham zuerst zu ihrer Darstellung und Charakterisierung benutzt wurde, ihr relatives Unvermögen, eine Dialysiermembran zu passieren, in gewissem Grade auch den echten Lösungen hochmolekularer Stoffe zu. Diese Eigenschaft steht wohl mit der bedeutenden Teilchengröße und daher geringen Diffusibilität im Zusammenhang.

Die gleichen Momente bilden wohl die Ursache für die Erscheinung, daß viele Kolloide aus ihren Lösungen durch ein Filter zurückgehalten werden; jedoch kommt nach den Untersuchungen von Zsigmondy für die Filtrierbarkeit auch die Adsorption durch die Filteroberfläche in Betracht.

Ein drittes, allen Kolloidlösungen zukommendes Charkteristikum, das zugleich eine gewisse Abgrenzung gegenüber den Suspensionen sowie

*) In diesem Abschnitt, der nur einen Überblick der für die Immunitätslehre wichtigsten Ergebnisse der Kolloidchemie gibt, konnte nur der geringste Teil der Literatur angeführt werden.

Kristalloidlösungen erlaubt, ist ihr optisches Verhalten. Sie lassen, mit dem Ultramikroskop oder nach der Faraday-Tyndallschen Methode*) untersucht kleinste Teilchen erkennen, erscheinen aber, mikroskopisch und im auffallenden und durchfallenden Licht betrachtet, vollständig klar und homogen. Lösungen von Kristalloiden erscheinen dagegen im Ultramikroskop homogen. (Es gibt aber doch Körper mit hohem Molekulargewicht, deren zweifellos echte Lösungen das Tyndalsche Phänomen aufweisen.) Suspensionen und Emulsionen**) endlich haben makro- und mikroskopisch sichtbare Teilchen.

Die Kolloidlösungen üben keinen bestimmbaren osmotischen Druck aus. Die für ihren osmotischen Druck erhaltenen Werte sind nämlich so gering, daß sie auch auf verunreinigende Kristalloide zurückgeführt werden können. Die geringen Druckwerte lassen sich aber auch als Folge des hohen Molekulargewichts auffassen. Demgemäß ist die Arbeit, die dazu notwendig ist, um Kolloide von ihrem Lösungsmittel zu trennen, eine sehr geringe, vorausgesetzt, daß das Kolloid hierbei keine sekundäre Zustandsänderung erfährt.

Die Kolloide sind Nichtleiter des elektrischen Stromes. Ihre von Elektrolyten möglichst befreiten Lösungen zeigen im elektrischen Stromgefälle die Erscheinung der sogenannten Kataphorese, d. h. die Kolloidteilchen transportieren die Elektrizität und sammeln sich je nach ihrer Konvektion an der positiven oder negativen Elektrode. Immerhin ist aber auch die Eigenschaft der Kataphorese nicht beweisend für die Kolloidnatur einer Substanz, denn es ist denkbar, daß hochmolekulare und daher indialysable, aber echt gelöste Stoffe wie Elektrolyte die Elektrizität transportieren, sobalb ihre elektrische Dissoziation durch Entfernung der Elektrolyte ermöglicht wird.

Zusammengefaßt ergibt sich demnach, daß alle eben angeführten Eigenschaften für den Kolloidzustand nicht absolut charakteristisch sind, wie vielfach angenommen wird, sondern ein Attribut der Lösungen hochmolekularer Stoffe bilden. Nur die Erscheinung der noch zu besprechenden Kolloidreaktionen berechtigt uns, eine Lösung als kolloidale Lösung zu bezeichnen.

Eine fast allen Kolloiden zukommende Zustandsform ist der schon erwähnte Gelzustand, der sich vom Solzustand zunächst***) nur durch die höhere innere Reibung der Teilchen unterscheidet. Der Übergang aus dem Solzustand in den Gelzustand kann unmittelbar†) oder nach vorangehender Entmischung erfolgen. Für die erstere Art der Gelbildung ist die Erstarrung einer Gelatinelösung bei niedriger Temperatur, für die zweite die Aussalzung der Gelatine aus der Lösung ein Beispiel. Die zweite Art der Gelbildung, die nur eine Folge der Entmischung und damit der Näherung der Teilchen darstellt, ist die unvergleichlich häufigere und daher wichtigere.

---

*) Durch eine Linse gesammelte Lichtstrahlen werden durch die Lösung geschickt und mit dem Nicolschen Prisma untersucht. Kolloide und Suspensionen bewirken eine Polarisation des passierten Lichtes.

**) Nach den hier entwickelten Anschauungen sind Suspensionen von Kolloidlösungen grundsätzlich nicht zu trennen, einen äußeren Unterschied bildet nur die Teilchengröße.

***) Welche Rolle hier die Komplexgröße, sowie der Grad der Hydratisierung spielt, soll als dem Bereich der Hypothesen angehörend hier nicht erörtert werden.

†) Es scheint auch bei der unmittelbaren Gelbildung sekundär zu teilweiser Entmischung zukommen, worauf die Strukturbildung der Gallerten zurückgeführt wird.

Die Gelbildung tritt im Gefolge mannigfacher Einflüsse auf. Die gewöhnlichste Art, diese Zustandsänderung herbeizuführen, ist die Einengung der Kolloidlösung. Viele Sole werden (meist als Folge der vorangehenden Entmischung) durch Elektrolyte in Gele übergeführt, andere durch Temperaturänderungen, durch mechanische Gewalt (Schütteln, Zentrifugieren) schließlich durch Einwirkung anderer Kolloide. Im Sol gehen aber auch im Sinne der Gelbildung unausgesetzt spontane Veränderungen vor sich; das Gel ist gewissermaßen der Endzustand, in den das labile Sol früher oder später überzugehen die Neigung hat (Hysteresis). Die Agentien, welche die Gelbildung herbeiführen, scheinen sie nur zu befördern, die Annäherung der Teilchen zu beschleunigen.

Bei dem Übergang in den Gelzustand kommt es gewöhnlich zu elektrischen Zustandsänderungen der Kolloidteilchen, oder vielmehr elektrische Zustandsänderungen können die Ursache der Gelbildung sein. Diese Verhältnisse werden uns noch weiter unten im Zusammenhang mit den Kolloidreaktionen beschäftigen.

Die Tendenz, aus dem Solzustand in den Gelzustand überzugehen, spricht sich bei den einzelnen Kolloiden in verschiedem Grade aus, die Stabilität der Sole ist eine differente. Die Stabilität gibt einen Einteilungsgrund der Kolloide. Ein anderes Einteilungsprinzip ist die Reversibilität der Gele. Ist der Gelzustand herbeigeführt, so kann er nämlich sehr rasch sekundäre Veränderungen erleiden oder das System bleibt längere Zeit unverändert. Das Gel kann dann in ersterem Falle nicht direkt in das Sol wieder übergeführt werden, es ist irreversibel, im letzteren Falle ist es reversibel. Diese Einteilung ist jedoch nicht durchgreifend, da auf verschiedenen Wegen erzeugte Gele desselben Sols einmal reversibel, das andere mal irreversibel sein können. Demgemäß haben verschiedene Autoren dieselben Kolloide bald der einen bald der anderen Gruppe zugezählt. Ein drittes Einteilungprinzip stellt Höber auf Grund der Beobachtungen und Anschauungen von Perrin sowie Friedländer auf. Beobachtungen von Friedländer hatten ergeben, daß die eine Gruppe von Kolloiden ebenso wie Kristalloide die innere Reibung des lösenden Wassers erhöht, die andere diesbezüglich keinen Einfluß ausübt. Die Beziehung der ersteren zum Lösungsmittel ist demnach anscheinend eine viel innigere, Höber bezeichnet sie daher im Anschluß an Perrin als hydrophile Kolloide, die letzteren als Suspensionskolloide. Jede dieser Gruppen hat noch eine Anzahl übereinstimmender Merkmale, so sind die hydrophilen Kolloide meist stabil und reversibel, die Suspensionskolloide instabil und irreversibel. Weitere Differenzen dieser beiden Gruppen zeigen die gleich zu besprechenden Kolloidreaktionen.

b) Kolloidreaktionen.

Die Kolloide üben sowohl im Sol- als auch im Gelzustand auf echt und kolloidal gelöster Substanzen eine Attraktion aus, die wohl jetzt allgemein als Oberflächenwirkung, Adsorption oder Absorption aufgefaßt wird und eine Folge der Molekularattraktion ist. Diese Anziehungswirkung scheint die kolloidalen Lösungen in typischer Weise von echten Lösungen zu unterscheiden und kommt in den schon oben erwähnten sogenannten Kolloidreaktionen zum Ausdruck. Ihre Grundlage ist einer oben erörterten Hypothese zufolge die Anwesenheit von multimolekularen Komplexen. Diese Auffassung, welche die Erscheinung von typischen Kolloidreaktionen als

alleinig beweisend für den Kolloidzustand einer gelösten Substanz hinstellt, sei mit allem Nachdruck hervorgehoben, sie wird auch für die Zurechnung der bei den Immunkörperreaktionen beteiligten Substanzen zu den Kolloiden herangezogen werden müssen*).

Was verstehen wir nun unter Kolloidreaktionen? Es sind dies nach dem Charakter der Absorption oder Adsorption verlaufende Reaktionen, die sich durch nachfolgende charakteristisch-physikalische Zustandsänderungen kundgeben können, von denen namentlich die bei Wechselwirkung zweier Kolloide aufeinander (s. später) sich ergebenden Eigentümlichkeiten so typisch sind, daß sie zur Beurteilung der Reaktion herangezogen werden können. Von den chemischen Reaktionen im gewöhnlichen Sinne unterscheiden sie sich scharf durch die variablen Proportionen der Reaktionskomponenten im Reaktionsprodukt, die gleichwie bei den Absorptionen und Adsorptionen von dem Mengenverhältnis der zur Wirksamkeit gelangenden Reaktionskomponenten abhängig sind. Die Kolloidreaktion gleicht solchergestalt einer Ausschüttelung oder Anschüttelung. Mit der Ab- und Adsorption hat die Kolloidreaktion auch die Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes von Druck und Temperatur gemeinsam.

Für den vorliegenden Gegenstand sind die Reaktionen zwischen Kolloiden und Elektrolyten sowie die der Kolloide unter einander von besonderer Bedeutung. Sie sollen daher insbesondere mit Rücksicht auf ihre äußere Erscheinungsform eingehender im speziellen besprochen werden.

Die Wechselwirkung zwischen Kolloiden und Elektrolyten ist den Mengenverhältnissen der Reaktionskomponenten im Reaktionsprodukt nach eine typische Absorption (Kolloidreaktion). Sie führt meist zu physikalischen Zustandsänderungen der Kolloide, deren Bedingungen und Zwischenursachen noch nicht hinlänglich geklärt sind. Die Umwandlungen von Sol in Gel und umgekehrt vollziehen sich vielfach unter dem Einfluß von Elektrolyten. Während eine gewisse Elektrolytmenge bei vielen Kolloiden notwendig ist, um den Solzustand überhaupt zu ermöglichen**) (z. B. bei den Globulinen und anderen Eiweißkörpern), ist eine größere Salzmenge mit dem Solzustand unverträglich, d. h. die Kolloidlösung wird durch Salze gefällt. Die Kolloide reagieren, wie zuerst Schulze bewiesen hat, nur mit dem Salzion, das elektrisch entgegengesetzt geladen ist, anodische Kolloide werden durch Kationen, kathodische durch Anionen gefällt. Elektrisch amphotere Kolloide reagieren, wie Pauli annimmt, mit beiden Ionen, je nach dem Ladungssinn des Kolloides wirkt das eine Ion fällend, das andere lösend, bis schließlich die Wirkung des einen Ions überwiegt. In dieser Art unterscheidet sich die sogenannte Aussalzung der hydrophilen Kolloide, die nach Hofmeister sowie Spiro einer Wasserentziehung gleichzusetzen ist, von der eigentlichen Salzfällung der Suspensionskolloide, bei der nur das eine Ion wirksam ist.

Von besonderer Wichtigkeit für die Immunitätslehre ist die gegenseitige Beeinflussung der Kolloide. Schon Graham war es bekannt, daß Mischungen mancher Hydrosole zur Niederschlagsbildung führen. In späterer Zeit wurde diese Erscheinung wiederholt beschrieben. Linder und Picton, später Lottermoser konnten den Nachweis erbringen,

*) Die Quellung und Imbibition von Gallerten erscheint im Sinne dieser Auffassung als eine Kolloidreaktion (Absorption) zwischen Wasser und Hydrogel einer Erklärung zugänglich.

**) Robertsohn nimmt, an daß es hier zu Verbindungen zwischen Kolloid und Elektrolyt kommt, die er Jonenproteide nennt.

daß die einander ausflockenden Kolloide entgegengesetzte elektrische Ladung tragen. HARDY zeigte, daß es bei der Ausflockung zu elektrischer Neutralisierung kommt. Eingehende Versuche über die gegenseitige Fällung von Kolloiden verdanken wir BILTZ (1904). BILTZ konnte die Beobachtung machen, daß nur elektrisch entgegengesetzt geladene Kolloide miteinander unter Niederschlagsbildung reagieren. Für die Fällung war ein bestimmtes Mengenverhältnis der Reaktionskomponenten erforderlich, Überschuß des einen oder des anderen Kolloides hob die Fällung auf. Ähnliche Versuche rühren von NEISSER und FRIEDEMANN sowie BECHHOLD, von LANDSTEINER und v. JAGIC, von HENRI und seinen Mitarbeitern von GENGOU, von BILTZ, MUCH und SIEBERT u. a. her. BILTZ konnte auch die Mengenverhältnisse, mit denen die Kolloide in Reaktion treten, feststellen, und fand variable Proportionen, wie sie zwischen absorbierendem Material und absorbierter Substanz zu finden sind*).

BILTZ bezeichnet daher die Kolloidverbindung als Adsorptionsverbindungen und hält sie für einen besonderen Typus von chemischen Reaktionen, da der Ladungssinn der Komponenten für das Zustandekommen der Verbindung maßgebend ist. Indessen besteht gegenüber gewöhnlichen Absorptionen oder Adsorptionen durch poröses Material, fein verteilte Substanzen (z. B. durch Tierkohle, Tonpartikelchen) diesbezüglich kein Unterschied, denn die umfassenden Untersuchungen von v. BEMMELEN über diesen Gegenstand haben auch hier eine Abhängigkeit vom Vorzeichen der elektrischen Ladung beobachtet.

Eine andersartige gegenseitige Beeinflussung der Kolloide ist die sogenannte Schutzwirkung. LOBRY DE BRUYN konnte wohl als erster die Beobachtung machen, daß kleine Mengen von Gelatine imstande sind, die Fällung von Kolloiden zu verhindern. Dieselbe Erscheinung wurde später bei Anwendung anderer Eiweißkörper beobachtet. SCHULZE sowie ZSIGMONDY verwendeten die differente Schutzwirkung der verschiedenen Eiweißkörper für die Salzfällung des kolloidalen Goldhydrosols zur Charakterisierung sowie zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Eiweißsubstanzen. Weitere Versuche über die Schutzwirkung der Kolloide rühren unter anderen von NEISSER und FRIEDEMANN sowie BECHHOLD her. Diese Autoren konnten den Nachweis erbringen, daß auch fällende Kolloide fällungshemmend wirken können, falls sie in einem nicht mehr fällenden Überschuß zur Anwendung gelangen. Andererseits ergab es sich, daß die typischen Schutzkolloide, die Eiweißkörper, in Kombination mit an sich nicht fällenden Salzmengen andere Kolloide auszuflocken imstande sind. PORGES konnte dann zeigen, daß unter gewissen Bedingungen auch ohne Mithilfe von Elektrolyten Kolloide von Eiweiß gefällt werden, so daß die Schutzwirkung der Kolloide als derjenige Teil jeder Reaktion erschien, der bei nicht mehr fällendem Überschuß des einen Kolloides zu beobachten ist. In letzter Zeit hat dann FRIEDEMANN die Allgemeingültigkeit dieser Annahme dadurch erwiesen, daß er alle Kolloide, die durch Eiweiß vor der Salzfällung geschützt werden, durch bestimmte Mengen von Eiweiß auch ausflocken konnte. Demnach

---

*) Schon GALEOTTI hatte gefunden, daß der Niederschlag einer Silbernitrateiweißfällung nach variablen Proportionen zusammengesetzt ist. Da die Fällung von Eiweiß durch Schwermetallsalze, wie NEISSER und FRIEDEMANN, sowie PAULI annehmen, durch das hydrolytisch abgespaltene, kolloidale Metallhydroxyd hervorgerufen wird, so hätte GALEOTTI als erster das Bindungsgesetz der Kolloide erschlossen.

gestaltet sich die Reaktion zweier Kolloide, wie Porges der Anschaulichkeit halber annahm, nach folgendem Schema: Zu einer Lösung, welche eine bestimmte Menge des Kolloides A enthält, werden steigende Mengen des Kolloides B zugesetzt. B verteilt sich nach einem bestimmten Verhältnis auf die freie Flüssigkeit und die Teilchen von A, die als suspendiert zu denken sind. Dieses Verhältnis ist für differente Mengenverhältnisse von A und B verschieden, ein entsprechend großer Überschuß von A kann Kolloid B gänzlich absorbieren. Ist B im Überschusse da, so zeigt sich gewissermaßen das umgekehrte Verhältnis, A wird von B absorbiert. Das gebildete Reaktionsprodukt besitzt nun die gewissermaßen algebraische Summe der Eigenschaften der Reaktionskomponenten nach ihren Mengenverhältnissen. Da die Reaktionskomponenten entgegengesetzte elektrische Ladung tragen, so muß es bei bestimmten Mengenverhältnissen zur elektrischen Neutralisierung kommen, was wiederum unter sonst günstigen Bedingungen zur Ausflockung des Reaktionsproduktes führen kann*) Aus dieser Betrachtungsweise erklären sich alle Reaktionseigentümlichkeiten der Kolloide. Die Schutzwirkung des im Überschusse reagierenden Kolloides ist darnach die Folge seiner überwiegenden Menge und Wirksamkeit in den gebildeten Komplexen, vorausgesetzt natürlich, daß das schützende Kolloid gegen das Reagens, auf das sich seine Schutzwirkung bezieht, weniger empfindlich ist als das geschützte Kolloid, sonst kann auch der umgekehrte Vorgang platzgreifen, eine erhöhte Fällbarkeit des Reaktionsproduktes. So zum Beispiel vermag Eiweiß im Überschusse instabile Kolloide vor der Salzfällung zu schützen, weil es für Salze wenig empfindlich ist. Wird aber umgekehrt das betreffende instabile Kolloid im Überschusse angewandt, so können schon geringe Salzmengen ein Eiweiß enthaltendes Reaktionsprodukt fällen, während das Eiweiß im freien Zustande von derselben Salzkonzentration unbeeinflußt bleibt. Das für die Fällung optimale Mengenverhältnis läßt sich weiter einwandsfrei auf den Ausgleich der elektrischen Ladung im Reaktionsprodukt zurückführen, das nur dann zur elektrischen Neutralisierung und Ausflockung führt, wenn die algebraische Summe der Ladungen sich der Größe O, dem iso-elektrischen Punkte nähert.

Wie schon erwähnt reagieren nur entgegengesetzt geladene Kolloide miteinander. Eine scheinbare Ausnahme von dieser Regel bilden die eiweißartigen Kolloide (und vielleicht auch das Lecithin, wie die Untersuchungen von Porges und Neubauer ergeben haben) da sie unabhängig von ihrem Ladungssinn sowohl mit elektropositiven, als auch elektronegativen Kolloiden Verbindungen eingehen. So beobachteten Landsteiner und v. Jagic Agglutination von anodischen Blutkörperchen durch anodische Kieselsäure, andere Beispiele dieser Erscheinung brachten Henri und Girard-Mangin, Neisser und Friedemann sowie Bechhold, Biltz, Much und Siebert u. a. Endlich konnte Friedemann zeigen, daß überhaupt alle anorganischen Kolloide von Eiweiß gefällt werden, wenn man die geeigneten Fällungsbedingungen herbeiführt (s. später). Diese scheinbare Ausnahmsstellung der Eiweißkörper ist in ihrem elektrisch amphoteren Verhalten begründet, in ihrem Vermögen, sowohl Säuren, als auch Alkalien zu neutralisieren, in saurer Lösung basische, in alkalischer saure Eigenschaften anzunehmen. In Wirklich-

*) Nach Billitzer, dessen interessante Theorie des Ausflockungsphänomen hier darzulegen aus Raummangel unmöglich ist, sind manche Kolloide im isoelektrischen Punkt am stabilsten. In der Regel führt aber die Beseitigung der elektrischen Ladung zur Ausflockung.

keit bestätigt sich also auch hier das oben entwickelte Gesetz, daß nur entgegengesetzt geladene Kolloide mit einander reagieren, denn Kolloide von ausgesprochenem elektrischem Verhalten vermögen dem Eiweiß eine ihrer eigenen entgegengesetzt elektrische Ladung zu erteilen, oder vielmehr das Eiweiß stumpft ihre Ladung vermöge derselbeu Eigenschaften ab, die es befähigen, Säuren und Alkalien zu binden. Mit diesem Gesetze steht es auch in Einklang, daß Eiweißkörper von ausgesprochenem elektrischem Eigenschaften nur mit Kolloiden von entgegengesetzter elektrischer Ladung reagieren, z. B. die Bakterien, die infolge ihrer auf die Nukleine zu beziehenden anodischen Konvektion nur von elektropositiven Kolloiden gefällt werden (Landsteiner und v. Jagic, Biltz, Much und Siebert u. a.)

Wie schon erwähnt wurde, zeigt das von zwei Kolloiden gebildete Reaktionsprodukt die Eigenschaften der Reaktionskomponenten und zwar vorwiegend derjenigen, die im Überschusse vorhanden ist. Diese Betrachtungsweise läßt uns von vornherein die Einwirkung von Elektrolyten auf die Reaktionen der Kolloide untereinander, die im Experiment und Organismus eine große Rolle spielt und besonders für die Immunitätsreaktionen von Bedeutung ist, beurteilen. Darnach werden Elektrolyte die gegenseitige Fällung von Kolloiden in der Regel begünstigen, wie es tatsächlich Biltz, Neisser und Friedemann, sowie Bechhold, Porges erwiesen haben. Sind aber Kolloide an der Reaktion beteiligt, die in salzhaltiger Lösung stabiler sind als in salzfreier, z. B. Globuline und andere Eiweißkörper, so werden Elektrolyte gelegentlich auch fällungshemmend wirken können. Eine fällungshemmende Wirkung der Salze werden wir namentlich dann beobachten, wenn bei der Reaktion die in salzfreier Lösung instabilen Kolloide im Überschusse vorhanden sind und deshalb mit ihren Eigenschaften im Reaktionsprodukt dominieren. Damit erklärt sich die Beobachtung von Henri und Girard-Mangin, daß Blutkörperchen in salzfreier Suspension (in Zuckerlösung) durch geringere Mengen von Eisenhydrat gefällt werden als bei Gegenwart von Elektrolyten. Verf. selbst machte die Beobachtung, daß Mastixsuspension von salzfreiem, unverdünntem oder wenig verdünntem Serum gefällt wird, während bei Gegenwart von Elektrolyten hier die Fällung ausbleibt. Eingehende hierher gehörige Versuche, die den besten Beleg für die Richtigkeit des obigen Salzes bilden, hat Friedemann angestellt. In nicht veröffentlichten Versuchen konnte sich Verfasser überzeugen, daß die fällungshemmende Wirkung der Salze am deutlichsten bei Anwendung des Globulins in Erscheinung tritt, weniger ausgesprochen bei einem Wittepepton, in geringem Grade bei Fällungsversuchen mit Albumin, während Gelatine das umgekehrte Verhalten zeigt.

Parallell mit diesen Beobachtungen steht die bekannte Tatsache, daß Globulin bei Gegenwart von Elektrolyten stabiler ist als im salzfreien Medium; bezüglich des Wittepeptons und des verwendeten Albumins konnte sich Verf. selbst überzeugen, daß sich eine möglichst konzentrierte trübe Lösung nach Salzzusatz vollständig klärte, was einen Beweis dafür bildet, daß auch diese Eiweißkörper im salzhaltigen Medium löslicher sind.

II. Die Kolloide in der Immunitätslehre.

Nachdem durch v. Behrings Entdeckung die Immunität auf schützende Eigenschaften des Serums der immunisierten Tiere zurückgeführt worden war, ergab sich die Frage nach der Wirkungsweise der

schützenden Sera. Der ursprüngliche Gedanke, daß das antitoxische Serum das Toxin zerstört, konnte bald durch die Untersuchungen von Calmette, Wassermann, Martin und Cherry u. a. widerlegt werden, denn aus unwirksamen Toxin-Antitoxingemischen ließ sich das Toxin wiederherstellen. Eine weitere Möglichkeit, die besonders von der Münchener (Buchner) und Pariser (Roux, Metschnikoff) Schule verfochten wurde, war die einer Intervention der Körperzellen in der Art, daß das Antitoxin die Gewebselemente oder Leukocyten zu erhöhter Widerstandsfähigkeit und abwehrender Tätigkeit reizt. Erst Ehrlich konnte durch seine grundlegenden Versuche den Nachweis erbringen, daß Toxin und Antitoxin einander direkt im Sinn einer Bindung beeinflussen. Ehrlich machte die Annahme, daß Toxin und Antitoxin eine salzartige Verbindung nach Art der Reaktion zwischen Säure und Basis eingehen. Diese Vorstellungen wurden dann auch auf die Reaktionen anderer Immunkörper und ihrer Antigene ausgedehnt. Bald aber zeigte es sich, daß die Verhältnisse viel komplizierter waren, so daß sich Ehrlich veranlaßt sah, eine Multiplizität sowie unwirksame aber doch reaktionsfähige Modifikationen der beteiligten Substanzen anzunehmen. Obzwar sich nun durch Ehrlichs Annahmen die beobachteten Tatsachen scheinbar befriedigend erklären ließen, so ergaben sich immer wieder neue Erscheinungen, die durch neue Hypothesen begreiflich gemacht werden mußten, so daß sich das Bedürfnis nach einer einfacheren Erklärungsmöglichkeit fühlbar machte. Diese glaubten Arrhenius oder Madsen gefunden zu haben, die die komplizierten Verhältnisse der Toxinneutralisation als Gleichgewicht einer stark dissoziierten Verbindung wenig avider Komponenten nach dem Guldberg-Waageschen Gesetze auslegten. Gegen eine derartige Deutung erhob sich aber gerechtfertigter Widerspruch, namentlich in der denkwürdigen Sitzung der der Bunsengesellschsft im Jahre 1904 wurde von vielen Seiten die Haltlosigkeit der Arrhenius-Madsenschen Annahme dargetan. Wie Ehrlich daselbst ausführte, widerspricht das Danysz Dungernsche Phänomen den Arrhenius-Madsenschen Postulaten, Nernst maß ihren Formeln lediglich den Wert von Interpolationsformeln zu, andere Einwände brachten Bredig, Biltz, Bechhold, Zangger*). Bei Gelegenheit derselben Diskussion brachten Bechhold, Biltz sowie Zangger experimentelle und theoretische Beiträge zu einer anderen Theorie, die eine mathematische Behandlung nach Art der Arrhenius-Madsenschen zuläßt, der Adsorptionstheorie. Ostwald wendete zwar gegen diese Theorie ein, daß der Exponent des Arrhenius-Madsenschen Ableitungen für Adsorptionsvorgänge zu hoch ist, was aber, wie auch Höber ausführt, in Anbetracht gewisser Besonderheiten nicht ins Gewicht fällt. Diese Theorie soll im Nachfolgenden ausführlich an der Hand der Literatur erörtert werden.

Nachdem schon Bordet die Reaktion zwischen Hämolysin und Erythrocyten vermutungsweise mit den Verhältnissen bei der Färbung verglichen, jedoch als chemische Reaktion gedeutet hatte, machten Zangger, sowie Landsteiner und Jagic als die ersten auf die Ähnlichkeiten zwischen Immunkörperreaktionen und Kolloidreaktionen aufmerksam. Ihre Anregungen bilden den Ausgangspunkt einer großen Reihe von Untersuchungen, welche die scheinbar so komplizierten Verhältnisse der

*) Die Anschauungen von Arrhenius und Madsen und deren experimentelle Grundlagen sind in dem „Immunochemie“ betitelten Werke des ersteren zusammen gefaßt. Eine eingehende Kritik ihrer Theorie bringt Friedemann sowie Michaelis.

Immunkörperbindung, die nur mit Hilfe der EHRLICHschen Theorie zu übersehen waren, auf einfachere Grundlagen zurückgeführt haben.

Als erste Frage war zu beantworten: sind die Immunkörper und ihre Antigene Kolloide?

Von den Substanzen des Organismus, die bei Immunitätsreaktionen in Betracht kommen, sind nur die Lipoide chemisch charakterisiert. Ihre Kolloideigenschaften im wässerigen Medium sind einwandfrei festgestellt (THUDICHUM, KOCH, PORGES und NEUBAUER). Die wichtigern Körper, die bei der erworbenen Immunität in Betracht kommen, und ihre Antigene lassen sich chemisch nicht fassen, doch sprechen alle Eigenschaften, die natürlich nur indirekt geprüft werden können, für ihre Kolloidnatur. Die meisten Erfahrungen sprechen sogar dafür, daß wir es hier mit Proteinen zu tun haben. Sie diffundieren nnd dialysieren wie Kolloide nur langsam. Sie sind meist thermolabil, unterliegen leicht spontanen Veränderungen wie die Kolloide. Sie werden durch gewisse Filter zurückgehalten (BECHHOLD u. a.). Sie zeigen die Eigenschaft der Kataphorese (COHEN, RÖMER, BECHHOLD, TEAGUE und BUXTON, FIELD und TEAGUE, unveröffentlichte Versuche des Verfassers*). Beweisend für ihre Kolloidantur ist aber die Übereinstimmung der Immunkörperreaktionen mit Kolloidreaktionen. Dieser Parallelismus besonders ist in der Literatur ausführlich geprüft und erörtert worden und soll im folgenden kurz dargestellt werden.

a) Agglutination und Präzipitation als Kolloidreaktionen.

Die Agglutinin- und Präzipitinreaktion zeigen die sinnfälligsten Ähnlichkeiten mit den Ausflockungserscheinungen der Kolloide. Die Reaktionseigentümlichkeiten der Agglutination und Präzipitation, die vor allem durch die grundlegende Arbeit von EISENBERG und VOLK erschlossen worden sind, werden in einem andern Abschnitt dieses Handbuches erörtert. Hier sollen nur die wesentlichsten Merkmale zusammengefaßt werden. Man kann bei der Agglutination und Präzipitation nach BORDETS Vorgange zwei getrennte Reaktionsphasen unterscheiden: 1. Die eigentliche primäre Reaktion, die sogenannte Bindung, 2. die sekundäre Reaktion, die Fällung. Für die primäre Reaktion ist die Verbindung der Reaktionskomponenten nach variablen Verhältnissen charakteristisch. In dem gebildeten Reaktionsprodukt geht nämlich das Mengenverhältnis der Komponenten mit dem Verhältnisse der Quantitäten, die an der Reaktion beteiligt waren, parallel. Für das Zustandekommen der sekundären Reaktion ist in vielen Fällen (s. später) ein bestimmtes Mengenverhältnis der Reaktionskomponenten erforderlich, Überschuß der einen oder der anderen Komponente hebt die Fällung auf. Das Zustandekommen der sekundären Reaktion ist weiter von der Anwesenheit von Elektrolyten abhängig. Bezüglich der Präzipitinreaktion wiesen MICHAELIS, SCHUR, FLEISCHMANN und MICHAELIS u. a. analoge Verhältnisse nach.

Die quantitativen Verhältnisse der Bindung haben LANDSTEINER und JAGIC, wie schon erwähnt wurde, mit analogen Beziehungen bei Kolloidreaktionen verglichen. In eingehenden Versuchen hat dann BILTZ, diese Frage bearbeitet und den Nachweis erbracht, daß das Bindungsgesetz, das für die Reaktionskomponenten der Agglutination Geltung hat, auch bezüglich der Einwirkung der Kolloide aufeinander zu beobachten

*) S. Anhang.

ist. Für die Abhängigkeit der sekundären Reaktion der Fällung, von einem optimalen Mengenverhältnis der Reaktionskomponenten bietet die Chemie zahlreiche Beispiele, die aber von der Immunitätsforschung nicht zum Vergleich herangezogen werden konnten. So gibt es zahlreiche Substanzen, die von Säuren oder Alkalien gefällt, von einem Überschusse dieses Fällungsmittels aber gelöst werden. Erst Neisser und Friedemann sowie Bechhold erkannten das für die Fällung optimale Mengenverhältnis als Charakteristikum einer Kolloidreaktion und Zangger war der erste, der diese Erscheinung mit der analogen der Agglutination in Parallele setzte. Hier gab das Studium der Immunitätsreaktion erst den Anstoß zur Erforschung dieses entsprechenden Gebietes der Kolloidchemie. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung verdanken wir Landsteiner und Jagic, Girard-Mangin und Henri, Biltz, Gengou, Biltz, Much und Siebert, Porges u. a. Durch die genannten Arbeiten wurden auch zahlreiche schon von früher her bekannte, aber in ihrem Wesensgang nicht erfaßte Pseudoagglutinationen als Kolloidreaktionen definiert, zum Beispiel die Ausflockung von Bakterien mit Chrysoidin, Vesuvin, Gelatine, Gummiarabikum etc. Durch alle diese Untersuchungen waren auffallende Analogien zur Agglutinin- und Präzipitinreaktion gefunden worden, um sie aber als Kolloidreaktionen definieren zu können, mußte noch ein Einwand, den unter anderen Eisenberg erhoben hat, beseitigt werden. Was zunächst die Präzipitinreaktion anlangt, so war es bekannt, daß ein Überschuß der präzipitablen Substanz die Präzipitatbildung verhindert (Michaelis). Dagegen sind die präzipitierenden Sera in den höchsten Konzentrationen wirksam, erst durch Hitze oder chemische Agentien modifiziertes Präzipitin hemmt die Reaktion (Kraus und Pirquet, Müller, Eisenberg). In ähnlicher Weise wirken native agglutinierende Sera oft in größter Konzentration fällend, allerdings sind hier mitunter auch bei frischen Seris Hemmungszonen beobachtet worden (Volk und de Waele). Dagegen agglutinieren durch Hitze und chemische Agentien (Volk und Eisenberg) modifizierte Sera nur von einer bestimmten Verdünnung ab, nicht aber bei konzentrierter Anwendung. Es zeigt also hier Agglutination sowie Präzipitation gewisse Unterschiede gegenüber den Kolloidreaktionen. Es gelang nun Porges, diese Differenzen zu beseitigen, denn es ergab sich, daß die nativen Sera die nicht mehr fällende hohe Agglutinin- und Präzipitinkonzentration gewöhnlich nicht erreichen, daß dagegen die Hemmungszone in Erscheinung tritt, wenn die Stabilität der einen oder der andern Reaktionskomponente durch die Hitzeeinwirkung modifiziert und so der Bereich der Ausflockung eingeengt wird. Weiter ließ sich zeigen, daß die thermolabilen eiweißartigen Kolloide ebenso wie das Agglutinin durch Erhitzen auf höhere Temperaturen derartig modifiziert werden, daß ihre Fällungsreihe, die sie mit anderen Kolloiden bilden, nach der Seite der höheren Serumkonzentration zu eingeengt wird, so daß hier eine vollkommene Übereinstimmung mit der analogen spezifischen Reaktion zum Vorschein kommt. So zum Beispiel wirkt natives Serum auf Mastixsuspension noch in hoher Konzentration fällend, erhitztes Serum in derselben Konzentration fällungshemmend. Die Veränderung, die das Serum bei nativer Reaktion durch Erhitzen erfährt, die Alkalialbuminatbildung, ist einer Verstärkung der anodischen Konvektion der Eiweißteilchen gleichzusetzen, es entsteht ein saurer Eiweißkörper, der bei Reaktion mit einem gleichfalls anodischen Kolloid nicht mehr in demselben Maße wie früher imstande ist, dessen elektrische Ladung abzustumpfen.

Daß es sich bei der Agglutination und Präzipitation um echte Kolloidreaktionen handelt, konnte Porges weiter durch Versuche beweisen, welche die bei Kolloidreaktionen erkannten Gesetzmäßigkeiten auf die spezifischen Reaktionen übertragen. Wie schon im allgemeinen Teil ausgeführt worden ist, zeigt das bei Kolloidreaktionen gebildete Reaktionsprodukt fällenden Agentien gegenüber ein Verhalten, wie es der im Überschusse vorhandenen Reaktionskomponente zukommt; auf dieser Erscheinung beruht die Schutzwirkung der Kolloide. Sind nun die spezifischen Reaktionen tatsächlich Kolloidreaktionen, so müssen sie bei geeigneter Versuchsanordnung auch die Reaktionseigentümlichkeit der Schutzwirkung zeigen. In der Tat ließ sich nun nachweisen, daß Bakterien, die mit einem nicht mehr fällenden Überschuß von Agglutinin beladen sind, durch Ammonsulfat innerhalb der Fällungsgrenzen der Globuline (Agglutinin hat, wie bekannt, die Fällungsgrenzen des Pseudoglobulins) ausgefällt werden, während für gewöhnlich die Bakterien erst bei höherer Ammonsulfatkonzentration ausflocken. Dagegen wurden spontan agglutinable Bakterien, die ohne Agglutinin schon in physiologischer Kochsalzlösung ausfallen, durch nicht mehr fällendes, überschüssiges Agglutinin in Suspension gehalten. Schon vorher hatte Weil gefunden, daß mit nicht mehr fällendem überschüssigem Agglutinin beladene Bakterien im Gegensatz zum gewöhnlichen Verhalten von Gelatine nicht verklumpt werden. Weiter konnte Porges zeigen, daß Bakterien in einer Eisenchloridlösung von hoher Konzentration von ihrem spezifischen Agglutinin nicht verklumpt werden, die Ursache hierfür bildet die Schutzwirkung des kolloidalen Eisenhydrates.

Schließlich erübrigt noch, die Rolle der Salze bei der Agglutination und Präzipitation aus den Reaktionsgesetzen der Kolloide abzuleiten. Schon Bordet verglich die Verklumpung der agglutininbeladenen Bakterien unter dem Einfluß der Elektrolyte mit der Salzfällung suspendierter Thonpartikelchen. Von den Gesichtspunkten der Kolloidchemie aus wurde die Salzfällung agglutininbeladener Bakterien von Neisser und Friedemann sowie Bechhold, weiter von Porges, von Buxton und Shaffer, Buxton und Teague bearbeitet. Sie fanden die Fällungsgesetze der sogenannten instabilen oder Suspensionskolloide. Von der Salzfällung der Kolloide unterscheiden sich aber die spezifischen Reaktionen in einem wesentlichen Punkte: Man hat es hier bereits mit dem Reaktionsprodukt zweier Kolloide, der Bakterien und des Agglutinins, bzw. der präzipitablen Substanz und des Präzipitins zu tun. Wie nun im allgemeinen Teil dargelegt ist, üben Elektrolyte auf das Reaktionsprodukt zweier Kolloide bald eine fällungsbefördernde, bald eine fällungshemmende Wirkung aus, je nachdem, ob das im Überschusse vorhandene Kolloid durch Salze eine erhöhte oder verringerte Stabilität seiner Lösung gewinnt. Diese Tatsache macht es uns begreiflich, daß die Bakterienagglutininverbindung, in der die Bakterien dominieren, durch Salz im Sinne einer Fällung beeinflußt wird. Daß aber Bakterien beim Fällungsoptimum auch ohne Mitwirkung der Salze von ihrem Agglutinin ausgeflockt werden, konnte Porges in Versuchen zeigen, in denen er sorgfältig dialysiertes Serum und salzfreie Bakterien aufeinander einwirken ließ. Die spezifische Reaktion unterscheidet sich also von anderen Kolloidreaktionen nur durch den engeren Fällungsbereich, der in Anbetracht der hochgradigen Stabilität ihrer Reaktionskomponenten begreiflich ist. Würde es gelingen, an die Bakterien einen bedeutenden Überschuß von Agglutinin anzulagern, so könnte man möglicherweise auch eine fällungshemmende Wirkung von Elektrolyten beobachten, die in einem gleichsinnigen Einfluß

auf das Agglutinin ihre Ursache hätte*). Von Interesse ist es, daß Friedemann tatsächlich in einigen Fällen bei der Agglutination mit normalen Kaninchenseris eine fällungshemmende Wirkung von Salzen beobachten konnte. Sein Befund wird uns dadurch erklärlich, daß das von ihm untersuchte Agglutinin, wie er wahrscheinlich macht, der Euglobulinfraktion des Serums angehörte, daher wie dieses im salzfreien Medium ausfallen und die Fällung auf die angelagerten Bakterien übertragen mußte, während es bei Gegenwart von Elektrolyten seine erhöhte Stabilität auch der Bakterienagglutininverbindung mitteilte. (Da das Immunagglutinin, wie bekannt, der im salzfreien Medium weit löslichern Pseudoglobulinfraktion angehört, so wird sich bei Anwendung des Immunagglutinins eine fällungshemmende Wirkung der Salze erst bei viel größerem Agglutininüberschuß erwarten lassen als in dem von Friedemann beschriebenen Fall.) Bei der Präzipitinreaktion hat schon vor längerer Zeit Neisser in bestimmten Mengenverhältnissen der Reaktionskomponenten eine Hemmungswirkung der Elektrolyte nachweisen können. Weitere Untersuchungen über diesen Gegenstand wären wünschenswert, da vielleicht die Möglichkeit gegeben ist, die Präzipitinreaktion durch Erleichterung der Ausflockung empfindlicher zu machen.

b) Die Toxinantitoxinreaktion und die Kolloidreaktionen.

Der erste, der die Reaktion sowohl zwischen Toxin und Antitoxin als auch zwischen Toxin und Gewebszellen im Sinne der Absorption auf Grund von Kolloideigenschaften deutete, war Zangger (1903). Unabhängig davon trat Biltz für ähnliche Anschauungen ein. Biltz konnte die Reaktionsverhältnisse zwischen Toxin und Antitoxin mit der Kombination arsenige Säure — kolloidales Eisenhydrat vollständig nachahmen, d. h. die Giftwirkung der arsenigen Säure wurde durch Eisenhydrat in Mengenverhältnissen neutralisiert, die in allen Einzelheiten mit dem Reaktionsmodus von Toxinantitoxin übereinstimmen. Unabhängig von Biltz hat Pauli unter Anführung einer großen Anzahl von Vergleichspunkten die Toxinantitoxinreaktion als Kolloidreaktion definiert. Pauli bezieht die spontane Abschwächung der Toxinlösungen auf die so häufig beobachteten spontanen Veränderungen unreiner Kolloide (Hysteresis), den eigenartigen Reaktionsverlauf bei der Absättigung von Toxin durch Antitoxin auf die Bildung von Toxinantitoxinkomplexen von verschiedengradiger Giftigkeit, das sogenannte Danysz-Dungernsche Phänomen findet sein Analogon in dem Unterschied zwischen simultaner oder sukzedaner Fällung eines Kolloids durch eine bestimmte Menge eines zweiten**).

Die gleichen Argumente, welche die Toxinreaktionen mit den Kolloidreaktionen in Beziehung setzen, haben auch für die Hämotoxine Geltung. So läßt sich durch zahlreiche Kolloide und Suspensionen eine Hämolyse

---

*) Friedemann ist der Ansicht, daß ohne Mitwirkung von Elektrolyten keine echte Agglutination zustandekommen kann; er konnte nämlich beobachten, daß selbst mit unverdünntem Serum versetzte Bakterien sich dauernd suspendieren liessen, nachdem durch wiederholtes Zentrifugieren und Wiederaufschwemmen die Salze entfernt waren. Gegen diese Versuchsanordnung ist jedoch einzuwenden, daß mit den Salzen auch soviel Agglutinin aus den Bakterien herausgewaschen wurde, daß schließlich eine Agglutininmenge übrigblieb, die nur mehr mit Unterstützung der Salze fällen kann.

**) Wird z. B. ein Suspensionskolloid gefällt, so ist das Endergebnis ein anderes, je nachdem ob das Fällungsmittel auf einmal oder portionsweise zugesetzt wird.

hervorrufen, die in ihrer Erscheinungsform mit der durch echte Hämotoxine erzeugten identisch ist (Saponin [Ransom, Zangger], Bariumsulfat [Gengou], Eisenhydrat [Cernovodeanu und Henri], kolloidales Quecksilber [Frei] u. a.). Die quantitativen Verhältnisse der Giftbindung (Volk) stimmen mit dem Absorptionsgesetze der Kolloidreaktionen überein (Frei).

Hier ist auch der Platz, die Beziehungen der im zweiten Abschnitt eingehend zu behandelnden Cholesterinverbindungen zur Kolloidchemie zu erörtern. Zunächst ist schon durch Ransom, weiter durch Madsen, Madsen und Walbum, Madsen und Noguchi, Frei u. a. der Nachweis geliefert worden, daß die Giftbindung durch Cholesterin den Reaktionsverlauf der Toxinantitoxinneutralisierung nachahmt. Die oben angeführten Momente, welche die Toxinantitoxinverbindung in Beziehung zu Kolloidreaktionen setzen, sind daher auch für die Cholesterinverbindungen heranzuziehen, wofür schon Zangger eingetreten ist.

Versuche von Porges und Neubauer haben denn auch die Verbindung zwischen Saponin und Cholesterin zuverlässig als Kolloidverbindung charakterisiert; es ergaben sich die Phänomene des Fällungsoptimums, der Schutzwirkung bzw. vermehrten Empfindlichkeit bei Überschuß einer Reaktionskomponente. So kam es bei mittleren Mengenverhältnissen zwischen Saponin und Cholesterin zu gegenseitiger Ausflockung, durch Überschuß von Saponin wurde das Cholesterin vor der Fällung durch Salze geschützt, bei Überschuß von Cholesterin dagegen das Saponin mit dem Cholesterin durch Salzkonzentrationen gefällt, die an sich sonst das Saponin unbeeinflußt lassen.

c) Die komplexen Hämolysine und Bakteriolysine sowie die Komplemente und die Kolloidreaktionen.

Wie bereits erwähnt wurde, hat schon Bordet die quantitativen Beziehungen zwischen Erythrocyten und des von ihm „substance sensibilisatrice" genannten Immunkörpers wegen der dabei zu beobachtenden variabeln Proportionen mit den Verhältnissen bei der Färbung verglichen. Zangger berichtet über ähnliche in Gemeinschaft mit Frei ausgeführte Versuche, die eine Absorptionskurve nach Art der Kolloidreaktionen ergaben.

Den Reaktionsverhältnissen der normalen Hämolysine haben Henri sowie Cernovodeanu und Henri ein eingehendes Studium gewidmet. Sie stießen auf Erscheinungen, die nur durch die Annahme eines Verteilungsvorganges zu erklären sind und somit die Reaktion zwischen Blut und Hämolysin als Kolloidreaktion definieren.

Die kolloidale Beschaffenheit und Reaktionsfähigkeit der Komplemente läßt sich aus vielen Erscheinungen erschließen. Schon vor Jahren war es bekannt, daß Wittepepton (Löwenstein), Hefezellen und Bakterien (v. Dungern, Hocke), Organzellen (Bail, Ehrlich und Sachs), Pflanzenschleim (v. Lingelsheim), Glykogen (Wendelstadt), Pulver und Niederschläge Komplemente binden. Auch hier war es Zangger, der diese Erscheinung als erster im Sinne einer Absorptionswirkung zweier Kolloide auffaßte. Als dann später die sogenannte Komplementbindung zum Nachweise einer Antigen-Antikörperreaktion benutzt wurde, wandte man sich diesem Phänomen mit größerem Interesse zu. Landsteiner und Stankovic haben systematisch diese Frage vom kolloidchemischen Gesichtspunkt untersucht und festgestellt, daß sämtliche Kolloide, ins-

besondere aber Niederschläge und Fällungen imstande sind, Komplemente zu absorbieren. Weitere Beweisstücke in diesem Sinne bringen auch die Befunde von Wassermann und Citron, Uhlenhuth, Seligmann. Ähnliche Erwägungen waren es auch, welche Verf. in Gemeinschaft mit Meier bestimmten, die als Luesantigen bezeichnete Substanz im Extrakte von luetischen Lebern einer Untersuchung zu unterziehen, wobei es sich herausstellte, daß die wirksame Substanz der Extrakte ein Lipoid ist, das mit einem Kolloide des Luesserums eine Fällungsreaktion eingeht und auf diese Art Komplement bindet.

Ein weiteres Phänomen, das von den Gesichtspunkten der Kolloidchemie seine Erklärung findet, ist die Neisser-Wechsbergsche Komplementablenkung, worauf schon Zangger hinweist. Da, wie wir gesehen haben, der Komplementbindung physikalisch-chemische Zustandsänderungen von Komplexen zweier mit einander reagierender Kolloide zugrunde liegen, so wird überall dort Komplementbindung ausbleiben, wo diese Zustandsänderungen sich nicht vollziehen können, wo das für diese Zustandsänderungen erforderliche Mengenverhältnis der Reaktionskomponenten nicht besteht. Wenn also der Immunkörper des spezifischen Serums im Verhältnis zu der Menge der Bakterienkolloide im Überschuß reagiert, wird die zur Komplementbindung erforderliche physikalisch-chemische Zustandsänderung (die meist als Agglutination zum Ausdruck gelangt) ausbleiben, das Komplement ist scheinbar abgelenkt, in Wirklichkeit aber überhaupt nicht gebunden worden.

Die synthetische Beweisführung für die Deutung der komplexen Lysinwirkung als Kolloidreaktion haben endlich Landsteiner und v. Jagic erbracht. Sie konnten mit dem System Kieselsäure-Lecithin sämtliche Reaktionseigentümlichkeiten nachahmen, die bei den spezifischen Vorgängen in Erscheinung treten. Eine ähnliche Kombinationswirkung beschreiben Cernovodeanu und Henri (kolloidales Eisenhydrat + Hundeserum gegen Huhnblut), sowie Frei (Saponin + Natriumtaurocholat gegen Erythrocyten). Hier ist auch der Ort, die Auffassung der Giftlecithide, von denen im zweiten Abschnitt noch ausführlicher die Rede sein wird, als Kolloidverbindungen zu diskutieren. Schon Bredig hat die Vermutung ausgesprochen, daß die Giftlecithide Absorptionsverbindungen sind. Neuere Untersuchungen von Kyes sind eher imstande, diese Auffassung zu bekräftigen als zu widerlegen, denn seine „ungesättigten" Lecithide wiesen bezüglich des Mengenverhältnisses zwischen Kobragift und Lecithin die verschiedensten Proportionen auf. Sein schließlich dargestelltes reines Lecithid ist aber der Elementaranalyse nach ein Monostearinlecithin, scheint also vollständig von Kobragift gereinigt zu sein. In welcher Beziehung das hämolytische Prinzip dieses Präparates zum Kobragift sowie Lecithin steht, soll im zweiten Abschnitt noch erörtert werden.

d) Phagocytose und Opsoninwirkung und Kolloidreaktionen.

Daß die Phagocytose ein Phänomen ist, das sich auch auf Substanzen erstreckt, die nicht zu den Antigenen zu rechnen sind, ist eine längst bekannte Tatsache. Bisher hatte man Phagocytose nur für korpuskuläre Elemente beobachtet.

Die Auffassung eines „spezifischen" Phänomens erhielt die Phagocytose hauptsächlich durch die Entdeckungen der opsonisierenden Serumwirkung. Daß aber auch dieser Wirkung ein allgemeiner Geltungsbereich für alle der Phagocytose zugänglichen Substanzen zukommt, konnte Ver-

fasser im Laboratorium von WASSERMANN zeigen*); denn aktives Serum übte im Gegensatz zum inaktiven auf die Phagocytose von Stärkekörnern einen befördernden Einfluß aus. Die Opsoninwirkung würde darnach auf noch nicht näher bestimmte Einflüsse von aus dem Serum absorbierten Kolloiden hinauslaufen, die das zu opsonisierende Partikelchen gewissermaßen umhüllen, einerlei, ob diese Kolloide Agglutinine, Immunkörper, Komplemente oder gewöhnliches Eiweiß sind.

e) Spezifizität der Immunkörperreaktionen und Kolloidreaktionen.

Wie schon erwähnt, lassen sich die meisten Reaktionseigentümlichkeiten der Immunkörper als Kolloidreaktionen deuten, nur die Spezifizität bleibt vorläufig durch die Kolloidtheorie ungeklärt. Es ist versucht worden, auch diese Eigenschaft der Immunkörper mit ihrer Kolloidnatur in Zusammenhang zu bringen. Eine gewisse Spezifizität findet man schon bei der gegenseitigen Ausflockung anorganischer Kolloide; denn wie besonders die Untersuchungen von BILTZ gezeigt haben, beeinflussen sich bloß entgegengesetzt geladene Suspensionskolloide. Diese Tatsache bot auch vielfach zu der Vermutung Anlaß, daß es sich auch bei den spezifischen Reaktionen, besonders bei der Agglutination und Präzipitation ebenfalls um einen durch elektrischen Antagonismus bedingten Vorgang handelt. Bei den Reaktionen eiweißartiger Kolloide (um solche handelt es sich bei den Immunitätsreaktionen), liegen die Verhältnisse etwas komplizierter, da ihr elektrisch amphoteres Verhalten sie befähigt, mit allen Kolloiden von ausgesprochener elektrischer Ladung (unter Niederschlagsbildung) zu reagieren. Doch kommt auch hier eine gewisse Spezifizität zum Vorschein, wie sich aus den Untersuchungen von LANDSTEINER und UHLIRZ, LANDSTEINER und STANKOVIC, BILTZ, MUCH und SIEBERT, BECHHOLD ergibt, denn differente Kolloide hatten ein verschiedenartiges Absorptionsvermögen für Eiweiß- und Immunkörper. Interessant ist der Befund von LANDSTEINER und STANKOVIC, daß ausgefälltes Kasein durch verschiedenartige chemische Eingriffe, die zugleich den Kolloidzustand veräudern, Modifikationen in seinem Bindungsververmögen für Abrin erleidet. Eine ziemlich ausgesprochene Spezifizität zeigen bereits die Reaktionen zwischen Lipoiden und Blutgiften, denn Lecithin zeigt z. B. ein ganz andersartiges Verhalten als das Cholesterin, das Cholesterin vermag eine Reihe von Blutgiften zu neutralisieren (Saponin, Tetanolysin), während es andere (Staphylolysin, Ricin) unbeeinflußt läßt. Auch die Affinität der Immunsubstanzen zu den einzelnen Kolloiden zeigt nach den Versuchen von LANDSTEINER und seiner Mitarbeiter UHLIRZ, STANKOVIC, BOTTERI, eine gewisse Selektion. Während das Agglutinin eine große Affinität zu eiweißartigen Kolloiden hat, wird das Tetanustoxin mehr durch Lipoide gebunden, die Komplemente werden durch die verschiedenartigsten Substanzen absorbiert.

Bei den Immunitätsreaktionen handelt es sich um gegenseitige Beeinflussung von eiweißartigen Kolloiden. Wie aber eiweißartige, d. i. elektrisch amphotere Kolloide aufeinander einwirken, ob sie ihren Ladungssinn modifizieren, darüber liegen keinerlei Erfahrungen vor. Es erscheint jedenfalls nicht ausgeschlossen, daß ein elektrisch amphoteres Verhalten beider Reaktionskomponenten bei der Spezifizität der Immunkörperreaktion

*) Noch nicht veröffentlicht.

eine besondere Rolle spielt, ein Gedanke, der einer von Landsteiner und v. Jagic entwickelten Spezifizitätstheorie zugrunde liegt, derzufolge die miteinander reagierenden Körper in ihrem Aufnahmevermögen für elektrische Ladung gewissermaßen aufeinander abgestimmt sind. Derartiges Aufeinanderpassen der elektrischen Ladungen würde nach den Anschauungen dieser Autoren auch die wunderbare Multiplizität der Immunkörper erklären, da es denkbar wäre, daß die spezifischen Eigenschaften durch die Größe der Ladung die verschiedenartigsten Modifikationen erleiden.

III. Methodik.

Die zur Ausführung der einschlägigen Versuche dienende Methodik unterscheidet sich nirgends von dem Verfahren bei den analogen Versuchen mit Immunkörpern, es ist daher diesbezüglich in den betreffenden Kapiteln dieses Handbuches nachzusehen. Nur die Darstellung der Kolloidlösungen, sowie einige Operationen benötigen eine gesonderte Behandlung.

Darstellung einiger Hydrosole.

Die Darstellung der Hydrosole erfordert zum Teil große Übung und Geschicklichkeit, in vielen Fällen auch umständliche Reinigung des Ausgangsmaterials. Daher sollen hier nur einige einfachere Darstellungsmethoden Platz finden, zumal da schon eine geringe Anzahl von Kolloiden genügt, um die für die Immunitätslehre in Betracht kommenden Versuche auszuführen. Zsigmondy unterscheidet vier Darstellungsarten der Hydrosole:

1. Die spontane Solbildung, spontane Auflösung der Gele, (z. B. Gelatine);
2. die Solbildung durch Peptisation, d. i. die Auflösung des Hydrogels mit Hilfe eines peptisierenden Agens (z. B. Lösung des Globulins mit Hilfe von Salz und Alkali);
3. elektrische Zerstäubung nach Bredig. Bredig konnte in elektrischen Lichtbogen Metalle unter Wasser in kolloidale Lösung zerstäuben.
4. Darstellung aus Krystalloiden durch chemische Reaktionen bei Bildung von praktisch wasserunlöslichen Körpern unter Einhaltung bestimmter Bedingungen.

Darstellung kolloidaler Hydroxyde.

Manche Schwermetalle bilden schon spontan kolloidale Hydroxyde, indem in ihren Salzlösungen das kolloidale Hydroxyd hydrolytisch abgespalten wird.

Man erhält daher z. B. aus Ferrichlorid das kolloidale Eisenhydrat einfach durch Dialyse der verdünnten Salzlösung, wobei das Salz und die Salzsäure aus dem Pergamentschlauch hinausdiffundieren. Eine einfache Darstellungsmethode der Metallhydrate rührt von Graham her. Graham löste das aus seiner Salzlösung durch Ammoniak frisch gefällte Metallhydroxyd in der Lösung des Salzes aus dem der Niederschlag gewonnen war, und erhielt durch andauernde Dialyse das reine Hydrosol.

Auf diese Art kann man kolloidales Eisenhydrat, Aluminiumhydrat, Chromoxydhydrat aus Ferrichlorid, Aluminiumchlorid, Chromchlorid gewinnen. Das Hydrosol des auf diese Weise dargestellten Aluminiumhydrates ist sehr unbeständig. Die Metallhydroxyde sind elektropositiv. Die elektronegative kolloidale Kieselsäure ist nach Graham durch Ein-

gießen des käuflichen Wasserglases in verdünnte Salzsäure und darauffolgende Dialyse zu erhalten. Kolloidale elektronegative Molybdänsäure erhielt GRAHAM aus Natriummolybdat, indem er dieses Salz mit überschüssiger Salzsäure versetzte und das auf diese Art abgespaltene Kolloid von den Salzen und der restlichen Säure durch Dialyse befreite. Das Zinnsäurehydrosol ist am besten nach der Methode von A. SCHNEIDER darzustellen. Sehr verdünnte Zinnchloridlösung wird in verdünntes Ammoniak eingegossen, wobei zunächst ein Niederschlag entsteht, der aber beim weitern Verdünnen mit Wasser wieder aufgelöst wird. Dieses Zinnsäurehydrosol ist durch Dialyse zu reinigen.

Darstellung der kolloidalen Metallsulfide.

Verhältnismäßig einfach ist die Darstellung der elektronegativen Metallsulfide. SCHULZE, dem wir die Entdeckung der ersten kolloidalen Sulfide verdanken, konnte das Hydrosol des Arsensulfids durch Einleitung von Schwefelwasserstoff in eine neutrale Lösung von Arsentrioxyd erhalten. Auf dieselbe Art stellte er das Antimonsulfid dar. Nach einer anderen Methode ist von PROST das kolloidale Kadmiumsulfid dargestellt worden. Es wurde durch eine ammoniakalische Lösung von Kadmiumsulfat Schwefelwasserstoff geleitet, der ausfallende Niederschlag von Kadmiumsulfid gut mit Wasser ausgewaschen, hierauf in Wasser verteilt. Schließlich folgte wiederum Einleitung von Schwefelwasserstoff. Hierbei ging das Kadmiumsulfid in Lösung. Das auf diese Art gebildete Hydrosol wurde durch Erwärmen von Schwefelwasserstoff befreit. Nach ähnlichen Methoden sind noch zahlreiche andere Sulfide in kolloidale Lösung gebracht worden.

Darstellung kolloidaler Metalle.

Die Darstellung der Hydrosole der Metalle erfolgt meist durch Reduktion aus ihren Salzen. BREDIG hat, wie schon erwähnt, ein anderes Verfahren erfunden, das der Zerstäubung im elektrischen Lichtbogen unter Wasser.

Die kolloidalen Lösungen der Metalle sind meist sehr unbeständig und werden schon durch geringe Mengen von Elektrolyten gefällt. Die Gele erleiden meist rasch sekundäre Veränderungen. Das Hydrosol der kolloidalen Metalle hat anodische Konektion. Hier soll nur die Darstellung des kolloidalen Goldes nach ZSIGMONDY sowie diejenige des kolloidalen Silbers nach CAREY LEA Platz finden. ZSIGMONDY löst in 120 cm wiederholt destilliertem Wasser 15 mg Goldchloridchlorwasserstoff ($Au\ Cl_4H$) und 37 mg Kaliumkarbonat. Diese Lösung wird mit einigen Tropfen ätherischer Phosphorlösung reduziert. Es bildet sich langsam eine hochrote Goldlösung, die durch Dialyse von den Salzen getrennt werden kann. Das zur Darstellung verwendete Wasser muß absolut rein sein (am besten im Silberkühler kondensiert) da die geringste Verunreinigung zu trüben, unstabilen Goldlösungen führt.

CAREY LEA benutzt 200 ccm einer 10 %igen Silbernitratlösung, sowie eine Mischung von 200 ccm 30 %iger Ferrosulfatlösung, 250 ccm 40 %iger Natriumnitratlösung und 50 ccm 10 % iger Natriumkarbonatlösung. Diese beiden Lösungen werden zusammengegossen, wobei ein bläulicher Niederschlag ausfällt, der abfiltriert, mit Wasser aufgenommen und durch wenig Ammonnitrat mehrmals umgefällt wird, wobei sich mit fortschreitender Reinigung eine immer klarer werdende, braunrote Lösung bildet.

Mastixsuspension und analog hergestellte Suspensionen.

Eine leicht herstellbare elektronegative Suspension, an der sich leicht die Kolloidreaktionen studieren lassen, ist die Mastixsuspension. Sie wird durch Eingießen einer (1—5%igen) alkoholischen Lösung des Harzes in destilliertes Wasser hergestellt. Alkoholreichere Suspensionen haben für Salze und Kolloide einen niedrigeren Schwellenwert der Ausflockung als alkoholarme.

In analoger Art lassen sich eine große Anzahl von Substanzen in kolloidaler Form erhalten, wenn man ihre Lösungen sehr schnell durch eine mit ihrem Lösungsmittel mischbare Flüssigkeit verdünnt, in der sie unlöslich sind.

Darstellung einiger Hydrogele.

Biltz, Much und Siebert haben die Absorption von Immunkörpern durch Hydrogele und ausgefällte Suspensionen untersucht. Ähnliche Versuche liegen von Landsteiner und seinen Mitarbeitern, einige auch von Bechhold vor. Biltz, Much und Siebert brachten die nach nachstehender Art bereiteten Hydrogele in Anwendung:

Eisenhydroxyd. Eine ca. 10%ige Lösung von Ferrisulfat wird mit einem großen Überschuß von Ammoniak in der Wärme gefällt, der ausfallende Niederschlag unter Einleitung von Wasserdampf solange mit Wasser gewaschen, bis die Waschflüssigkeit frei von Schwefelsäure abfließt. Die braune gelatinöse Masse erweist sich dann, mikroskopisch untersucht, frei von Kristallen.

Zirconhydroyd wird aus Merckschem Zirconitrat in analoger Weise hergestellt.

Thoriumhydroxyd aus Thoriumzitrat Chenal und Douillet, Paris wird auf dieselbe Art bereitet.

Kieselsäure. 100 ccm künstliches Wasserglas wird mit $1^1/_2$ l Wasser gut gemischt, mit Salzsäure genau neutralisiert, der Niederschlag möglichst chlorfrei gewaschen. Ein großer Teil der Kieselsäure geht als Hydrosol hierbei in Lösung.

Landsteiner und seine Mitarbeiter Stankovic, Uhlirz und Botteri arbeiteten hauptsächlich mit Suspensionen, mit Kaolin. Tierkohle, Meerschaum, Serpentin, Zinkoxyd, Mangankarbonat, Talk, Graphit, Lepidolith, Bleikarbonat, Schwefel (Flores sulfuris), Bariumsulfat, Pyrop, Bergkristall, Seide, Stärke, Kasein, Fibrin usw. Diese Pulver sind größtenteils käuflich, einige als Niederschläge beim Zusammenmischen der Salze der Komponenten (z. B. $BaSO_4$ aus $BaCl_2$ und Na_2SO_4) leicht darstellbar.

Bechholds Versuch bezieht sich auf die Absorption von Arachnolysin durch Kollodium (Verteilung von Eisessigkollodiumlösung in Wasser). Gelatine, Formalgelatine, (Gelatine mit 2—4% Formaldehyd behandelt).

Einige für kolloidchemische Versuche wichtige Operationen (Methodik).

Kataphoretische Versuche. Zum Nachweis der Kataphorese ist eine von Billitzer angegebene, von Pauli mit gutem Erfolg benutzte Versuchsanordnung am geeignetsten (siehe Fig. 1). Mehrere Bechergläser werden mit durch sorgfältige Dialyse von Salzen befreiter Kolloidlösung gefüllt. Die Verbindung dieser Behälter erfolgt durch gabelför-

mige Pipetten (*P*), die durch Ansaugen mit der betreffenden Flüssigkeit gefüllt und durch Abklemmen oder Zustöpseln (*M*) eines Gummischlauches (*S*), mit dem sie armiert sind, verschlossen werden. In die beiden Außenglieder dieser Reihe werden Elektroden (*E*) aus Platinblech eingesenkt. Gewöhnlich genügen übrigens drei Gefäße, ein Mittelgefäß und zwei Elektrodengefäße. Als Elektrizitätsquelle kann ein Gleichstrom, der von der Lichtquelle herrührt, Anwendung finden, PAULI benutzt einen Strom von 250 Volt und 5 Ampere. Es genügt jedoch auch eine größere Reihe von LECLANCHÉE-Elementen (25—40).

Ist der Versuch beendet, so werden die Gabelpipetten vorsichtig aus den Gefäßen, deren Kommikation sie herstellen, herausgezogen, die an den Elektroden befindliche Lösung kann jetzt isoliert auf ihre Zusammensetzung untersucht werden. Prüft man die Stromwanderung von Immunsubstanzen, so erheben sich insofern gewisse Schwierigkeiten, als

Fig. 1.

Konzentrationsänderungen an den Elektroden nur bei beträchtlichen Differenzen nachweisbar sind. So läßt sich z. B. zwischen 900 und 1100 Agglutinineinheiten nur schwer unterscheiden. Außerdem erleiden wohl alle Antigene und Immunsubstanzen unter dem Einflusse der Elektrizität (Ionenbildung) eine größere oder geringere Abschwächung, die die Beurteilung des Ergebnisses unmöglich macht (RÖMER, BECHHOLD, HENRI). Für diese Fälle hat sich mir das Verfahren bewährt, die zu untersuchende Lösung bloß an eine Elektrode zu bringen, die anderen Gefäße aber mit destilliertem Wasser zu füllen. Erfolgt eine Stromwanderung, so wird nach Beendigung des Versuches auch an der anderen Elektrode eine kleine Menge des betreffenden Körpers nachweisbar sein, während bei der Gegenprobe, bei der der Strom in entgegengesetzter Richtung durchgeschickt wird, die andere Elektrode andauernd von destilliertem Wasser umgeben bleibt. Vielleicht dürfte diese Methode bezüglich der Stromwanderung von Toxin und Antitoxin, die mit Hilfe der anderen Methoden bisher nicht zu entscheiden war, eindeutige Resultate geben.

BECHHOLD benutzte bei seinen Versuchen ein einfaches U-Rohr, dessen Schenkel zur Aufnahme des Elektroden dienten, TEAGUE und BUXTON modifizierten dieses Verfahren durch Verwendung von U-förmigen Gefäßen, die, wie die Figur 2 zeigt, aus drei Teilen zusammengesetzt sind,

zwei Elektrodenteilen, die mit destiliertem Wasser gefüllt werden*), und einem Verbindungsstück, das die zu untersuchende Lösung aufnimmt. Auf diese Art gelingt es leicht, die Stromwanderung in deutlich getrübten oder gefärbten Lösungen zu beobachten, da dann die Teilchen aus dem Mittelstück je nach ihrer Ladung nur in das positive oder negative Elektrodengefäß treten. In neuester Zeit hat Bechhold einen Überführungsapparat angegeben (Fig. 3), der die Schädigung der zu untersuchenden Substanz durch die Elektroden in der Weise auszuschließen sucht, daß zwischen Elektroden und zu prüfende Flüssigkeit ein Diaphragma geschaltet wird. Der Apparat besteht aus zwei durch eine Pergamentmembran verschlossene Glocken, die zur Aufnahme der zu untersuchenden Substanz bestimmt sind. Die Glocken kommunizieren mittels einer Glasröhre, die noch einen senkrechten offenen Schenkel in der Mitte trägt, um für Steige-

Fig. 2.

Fig. 3.

rungen oder Senkungen des Druckes Spielraum zu lassen. Die Elektroden tauchen außerhalb der Glocken in zwei mit Wasser gefüllte, zur Aufnahme der Glocken bestimmte Gefäße.

Methodik der Dialyse von Kolloiden, Antigenen und Immunkörpern. Zur Dialyse werden in der Praxis ausschließlich Pergamentmembranen gebraucht. Pergamentschläuche, die im Handel sind, haben sehr oft kleinste Undichtigkeiten, so daß man sie allenfalls zur Reinigung eines Kolloides von Salzen verwenden kann, jedoch keine Schlüsse bezüglich der Dialysierfähigkeit desselben ziehen darf. Besser, jedoch nicht absolut verläßlich, sind diesbezüglich die Schleicherschen Dialysierhülsen. Am besten fährt man mit Beuteln aus starkem Pergamentpapier, die man sich leicht in beliebiger Größe herstellen kann. Auf jeden Fall muß man sich auch hier überzeugen, ob das Material nicht schadhaft ist. (Um für die Dialyse eine möglichst große Oberfläche zu schaffen. ist es auch vorteilhaft, ein weites Einsiedeglas, dessen Boden abgesprengt ist, mit dem Pergamentpapier zu bespannen.) Vor Gebrauch werden die Schläuche, Hülsen bzw. das zu Beuteln zu faltende Pergamentpapier in warmes Wasser getaucht, um das Material geschmeidig zu machen, hierauf mit der zu dialysierenden Lösung derart gefüllt, daß noch reichlich Raum für während der Dialyse eindringendes Wasser bleibt und mit Bindfaden fest zugebunden. Zum Zwecke der Dialyse wird dann der Apparat bis zum Niveau seines Inhaltes in Wasser getaucht, das oftmals

*) Schon Billitzer hatte vorgeschlagen, die Elektroden in destilliertes Wasser zu senken, um auf diese Art die an den Elektroden gebildeten Wasserstoff- und Hydroxionen auszuschalten.

zu erneuern ist. Man dialysiert zweckmäßiger Weise zunächst gegen strömendes Leitungswasser, hierauf gegen destilliertes Wasser. Über

Fig. 4.

die von v. Calcar für eine bestimmte Fragestellung angegebene Versuchsanordnung (Dialyse durch Amnionmembran, der je nach Bedarf eine verschiedene Spannung erteilt werden kann) vergl. Kap. XVI, Bd. I, pag. 541 von E. P. Pick.

Methodik der Filtration von Kolloiden, Antigenen und Immunkörpern. Wie schon erwähnt wurde, werden viele Kolloide aus ihren Lösungen durch engporige Filter zurückgehalten. Die Impermeabilität

Fig. 5.

der Filter hängt aber nicht nur von der Porengröße, sondern auch von durch das Filtermaterial bedingten Adsorptionswirkungen ab. Immerhin aber ist man unter gewissen Voraussetzungen berechtigt, aus der Filtrierbarkeit

auf die Teilchengröße sowie aus Änderungen der Filtrierbarkeit auf stattgehabte Reaktion zu schließen, worauf die Bedeutung dieser Methode für unser Gebiet beruht.

Gewisse Kolloide werden schon durch dichte Papierfilter zurückgehalten, viele durch Tonkerzen, Berkefeldfilter. Antigene und Immunkörper vermögen alle diese Filter vollständig oder teilweise zu passieren. Eine Methode, die ersonnen war, um die Filtrierbarkeit von Toxin und Antitoxin mit Rücksicht auf gewisse Fragestellungen zu untersuchen, hat Martin und Cherry angegeben, es sei diesbezüglich auf das Kapitel XVI, Bd. I, pag. 530 ds. Handb. verwiesen. Das Prinzip dieser Methode, die Filtration durch mit Gelatine imprägnierte Membranen, liegt auch dem Verfahren von Bechhold zugrunde, das nicht nur alle bisherigen Filtrationsmethoden ersetzt, sondern an Einfachheit und Leistungsfähigkeit übertrifft. Wir wollen uns daher auf die Auseinandersetzung dieser „Ultrafiltrations“-Methode beschränken.

Der Bechholdsche Apparat (Fig. 4 und 5)*) ist ein Metallkonus (Fig. 5 *H*, *Fr*, *D*), dessen Boden zur Aufnahme der imprägnierten Membran (F_2) dient. Zu diesem Zwecke hat die Bodenplatte in der Ausdehnung der einzupassenden Filtermembran eine Anzahl Löcher. Zwischen Filter und Bodenplatte kommt noch ein engmaschiges Drahtnetz (*N*), um eine Ausbuchtung und Verletzung der Membran zu hindern. Mittelst einer Zwischenlage von Gummi (*G*) wird nun die Filtermembran an ihrer Peripherie durch den Druck eines in den äußern Mantel eingepaßten inneren Konus auf ihre Unterlage dicht angefügt. Der Verschluß des Apparates wird durch einen passend konstruierten Metalldeckel (*D*) bewerkstelligt, der in der Mitte durch ein Rohr durchbohrt ist, das die Verbindung des Konus mit einer Druckpumpe gestattet. Eine etwas modifizierte Konstruktion (Fig. 4 F_2) ist auch mit einem Rührer versehen, dessen Achse den Deckel durchbohrt und mittels einer Stopfbüchse eingefügt ist. Der Konus wird mit der zu filtrierenden Lösung beschickt, der Deckel durch eine Schraubenvorrichtung (*Schr*) luftdicht angefügt, worauf ein genau einzustellender Druck der kommunizierenden Pumpe die Lösung durch das Filter durchtreibt. Zur Herstellung der Filtriermembranen dient eine Vorrichtung, die es gestattet, die Entstehung von kleinsten Luftbläschen im Innern der Filtermembranen zu vermeiden. Sie besteht aus einem Glastrog (Fig. 5 *J*), der einen luftdicht aufgeschlossenen Deckel trägt. Der Deckel hat zwei Öffnungen, von denen die eine zur Aufnahme eines Trichters (*Fr*) dient, dessen Rohr bis auf den Boden des Behälters reicht und zur Einfüllung der zur Imprägnation dienenden Lösung bestimmt ist. Die andere Öffnung trägt einen doppelt durchbohrten Gummistopfen, dessen eine Bohrung die Kommunikation mit einem Vakuummeter (*V*), dessen andere Bohrung die Zuleitung zu einer Vakuumpumpe (*L*) vermittelt. Im Innern des Troges befindet sich ein Querbalken an den mittels Haken die Filtermembranen frei gehängt werden können.

Zur Imprägnation der Membranen dient nach Bechhold eine Gelatinlösung bzw. eine Kollodiumeisessiglösung. Als Membrangrundlage verwendet er meist starkes Filtrierpapier. Dieses wird entsprechend zugeschnitten an dem Querbalken im Troge aufgehängt, hierauf die Luft ausgepumpt und aus dem bis dahin verschlossenen Trichter die zur

*) Diese Abbildungen verdanke ich der Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. H. Bechhold.

Imprägnation dienende Lösung einfließen gelassen, bis die Filter vollständig in dieselbe eintauchen*). Sie werden nun herausgezogen, abtropfen gelassen, Gelatinfilter mit eisgekühlter 2—4 %iger Formaldehydlösung, Kollodiumfilter mit Wasser gehärtet, dann einige Tage im Eisschrank gehalten, schließlich mit strömendem Wasser gut gewaschen und unter Wasser, dem etwas Chloroform beigemengt ist, aufbewahrt. Außer Filtrierpapier verwendet Bechhold für gewisse Zwecke engmaschige Nickeldrahtnetze als Filtermembrangrundlage. Es lassen sich aber auch tierische Häute oder Pergamentpapier ohne jede Vorbehandlung in dem Apparat als Filter gebrauchen. Je nach dem Zwecke der Filtration wird mit konzentrierteren oder verdünnteren (1—10 %) Gelatin- oder Kollodiumlösungen imprägniert.

Literatur.

Die mit * bezeichneten Schriften sind zusammenfassenden Inhaltes.

*Aron, Über organische Kolloide. Biochem. Centralbl. 1905, Bd. III, pag. 461, 501.
Arrhenius, Zeitschr. für Elektrochemie 1904, Bd. XIII, pag. 661.
*Ders., Immunchemie. Leipzig 1906.
Bechhold, Zeitschr. für physik. Chemie 1904, Bd. XLVIII, pag. 385.
Ders., Zeitschr. für Elektrochemie 1904, Bd. XIII.
Ders., Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 25.
Ders., Zeitschr. für physik. Chemie 1907, Bd. LX, pag. 257.
Ders., Münchener med. Wochenschr. 1907, pag. 1921.
Ders., Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. VI, pag. 379.
Billitzer, Zeitschr. für physik. Chemie 1905, Bd. LI, pag. 130.
Biltz, Chem. Ztg. 1903, Bd. XXVII, pag. 947.
Ders., Ber. d. deutschen chem. Ges. 1904, Bd. XXXVII, pag. 3138; 1904, Bd. XXXVII, pag. 1095.
Ders., Zeitschr. für Elektrochemie 1904, Bd. XIII, pag. 668.
Ders., Nachr. d. Ges. d. Wissensch. Göttingen math.-phys. Kl. 1904, Heft 1.
Ders., Zeitschr. für physik. Chemie 1904, Bd. XLVIII, pag. 615.
Biltz, Much und Siebert, Beitr. z. exper. Ther. 1905, Heft 10, pag. 30.
Bordet, Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, 225; 1900, pag. 267; 1903, 161.
*Bredig, Anorgan. Fermente. Leipzig 1901.
Ders., Zeitschr. für Elektrochemie 1904, Bd. XIII, pag. 674.
Buxton und Shaffer, Zeitschr. für. physik. Chemie 1906, Bd. LVII, pag. 47.
Buxton und Teague, Zeitschr. für physik. Chemie 1906, Bd. LVII, pag. 64.
Carey, Lea, Americ. journ. of science 1889 Vol. XXXVII, pag. 476; Vol. XXXVIII, pag. 47.
Cernovodeanu und Henri, Compt rend. de Soc. de Biol. 1905, Tome LVIII, pag. 222, 224, 507, 855, 858.
Coehn, Zeitschr. für Elektrochemie 1904, Bd. XIII, pag. 677.
v. Dungern, Münchener med. Wochenschr. 1900, Nr. 20.
Ehrlich, Zeitschr. für Elektrochemie 1904, Bd. XIII, pag. 671.
Ehrlich und Sachs, Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 14.
Eisenberg und Volk, Zeitschr. für Hyg. u. Infektionskrankh. 1902, Bd. XL, pag. 155.
Eisenberg, Centralbl. für Bakt. Orig., 1906, Bd. XLI, pag. 756.
Field und Teague, Journ. of exper. med. 1907, Vol. IX, pag. 86.
Fleischmann und Michaelis, Biochem. Zeitschr. 1906, Bd. II, pag. 425.
Frei, Berliner tierärztl. Wochenschr. 1905, Nr. 21.
Ders., Zeitschr. für Infektionskrankh. d. Haustiere 1907, Bd. II, pag. 138, 360.
Friedemann, Arch. für Hyg. 1906, Bd. LV, pag. 361.
Friedemann und Friedenthal, Zeitschr. für exper. Path. u. Ther. 1906, Bd. III, pag. 73.
Friedländer, Zeitschr. für physik. Chemie 1901, Bd. XXXVIII, pag. 385.
Galeotti, Zeitschr. für physiol. Chemie 1903, Bd. XLII, pag. 330.

---

*) Wird mit Gelatinelösungen gearbeitet, so ist der ganze Apparat in ein warmes Wasserbad einzustellen.

Gengou, Ann. de l'Inst. Pasteur 1904.
Girard-Mangin und Henri, Compt. rend. de Soc. de Biol. 1904, Tome LVI, pag. 866, 931, 933; Tome LVII, pag. 34, 35, 65.
Graham, Liebigs Ann. 1862, Bd. 121, pag. 1.
Ders., Philosoph. Transakt. 1861, pag. 183.
Ders., Ann. de Chemie et de Phys., Tome III, pag. 127.
Hardy, Zeitschr. für physik. Chemie 1900, Bd. XXXIII, pag. 385.
Ders., Journ. of Physiol. 1899, Bd. XXIV, pag. 288.
*Hamburger, Osmot. Druck- und Ionenlehre. Wiesbaden 1902/04.
Henri, Zeitschr. für physik. Chemie 1905, Bd. LI, pag. 19.
Ders., Compt. rend. de Soc. de Biol. 1905, Tome LVIII, pag. 28, 35, 37.
Henri, Lalou, Mayer, Stodel, Compt. rend. de Soc. de Biol. 1903, Tome LV, pag. 1613.
Henri und Mayer, Compt. rend. de Soc. de Biol. 1904, Tome LVII, pag. 33.
*Höber, Physikalische Chemie d. Zelle u. Gewebe. Leipzig 1906.
Hofmeister, Arch. für exper. Path. u. Pharmak. 1889, Bd. XXV, pag. 1.
*Jordis, Zeitschr. für Elektrochemie 1904, Bd. X, pag, 509.
*Ders., Ber. d. physik.-med. Soc. Erlangen 1904.
Koch, Zeitschr. für physiolog. Chemie 1903, Bd. XXXVII, pag. 181.
Kyes, Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 99.
Ders., Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. VIII, pag. 42.
Landsteiner und Jagic, Münchener med. Wochenschr. 1903, Nr. 18; 1904, Nr. 27.
Dies., Wiener klin. Wochenschr. 1904, Nr. 3.
Landsteiner und Uhlirz, Centralbl. für Bakt. Orig. 1906, Bd. XL, pag 265.
Landsteiner und Stankovic, Centralbl. für Bakt. Orig. 1906, Bd. XLI, pag. 108.
Dies., Centralbl. für Bakt. Orig. 1906, Bd. XLII, pag. 353.
Landsteiner und Botteri, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLII, pag. 562. Origbd.
Linder und Picton, Journ. of chem. soc. 1897, Tome LXXI, pag. 572.
v. Lingelsheim, Zeitschr. für Hyg. 1903, Bd. XLII, pag. 308.
Lobry de Bruyn, Zit. der Kgl. Akad. v. Wet. Amsterdam 1898, pag. 61.
Löwenstein, Lotosvortrag. Prag 1902.
*Lottermoser, Über anorganische Kolloide. Leipzig 1901.
Martin und Cherry, Proc. roy. soc. 1898, Vol. LXIII, pag. 420.
*Michaelis, Die Bindungsgesetze zwischen Toxin und Antitoxin. Berlin 1905.
*Müller, Die Theorie der Kolloide. Wien-Leipzig 1903.
*Ders., Allgemeine Chemie der Kolloide. Leipzig 1907. Barth.
Neisser, Hygienische Rundschau 1903, pag. 1261.
Neisser und Friedemann, Münchener med. Wochenschr. 1904, pag. 465 und 829.
Nernst, Zeitschr. für Elektrochemie 1904, Bd. XIII, pag. 676.
Pauli, Hofmeisters Beiträge 1902, Bd. III, pag. 225, 1904, Bd. V, pag. 27, 1905, Bd. VI, pag. 233, 1906, Bd. VII, pag. 531.
*Ders., Wandlungen in der Pathologie der Fortschritte der allgem. Chemie. Wien 1905.
Porges, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XL, pag. 133. Originalbd.
Porges und Prantschoff, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLI, pag. 466. Origbd.
Porges und Neubauer, Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. VII, pag. 152.
Porges und Meier, Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 15.
Perrin, Journ. de Chieux Phys. 1905, Bd. III, pag. 50.
Prost, Bull. de l'Acad. des sciences de Bruxelles, Bd. XIV, pag. 312.
Ransom, Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 13.
Römer, Berliner klin. Wochenschr. 1904, pag. 209.
Schneider, Liebigs Annalen, Bd. CCLVII, pag 372.
Schulze, Journ. für prakt. Chemie 1882, Bd. XXV, pag. 431; 1883, Bd. XXVII, pag. 320.
Schulze und Zsigmondy, Hofmeisters Beiträge 1903, Bd. III, pag. 136.
Spiro, Hofmeisters Beiträge 1904, Bd. IV, pag. 300.
Teague und Buxton, Zeitschr. für physik. Chemie 1906, Bd. LVII, pag. 76; 1907 Bd. LX, pag. 469 und 489.
*Thudichum, Die chemische Konstitution des Gehirnes der Menschen und der Tiere. Tübingen 1901.
Volk, Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV, pag. 843.
Volk und de Waele, Wiener klin. Wochenschr. 1903.
Wassermann und Citron, Zeitschr. für exper. Path. u. Ther. 1907, Bd. IV, pag. 274.
Wendelstadt, Centralbl. für Bakt. Orig. Bd. XXXIV, pag. 831 (1903).
Zangger, Antrittsvorlesung. Zürich, 28. Mai 1902.
*Ders., Centralbl. für Bakt. 1903, Orig.-Bd. XXXIV, pag. 428.
Ders., Correspondenzbl. Schweizer Ärzte 1904, Nr. 3.

*Zangger, Centralbl. für Bakt. Ref. 1905, Bd. XXXVI, pag. 161, 225.
Ders., Compt. rend. de Soc. de Biol. 1905, Bd. LVIII, pag. 589; 1905, Bd. LIX, pag. 664.
*Zsigmondy, Zur Erkenntnis der Kolloide. Jena 1905.
*Zeitschrift für Chemie und Industrie der Kolloide. Herausgeg. von W. Ostwald, Dresden.

B. Die Beziehungen der Lipoide zur Immunitätslehre.

I. Allgemeines über Lipoide.

Als Lipoid bezeichnete Overton ein die Plasmamembran bildendes Substanzgemenge, welchem die Löslichkeit der Fettkörper zukommt. Dieses Gemenge besteht im wesentlichen aus Lecithin und Cholesterin. Die Bezeichnung „Lipoide" wurde in der Folge als Gattungsname für diese und andere fettähnliche Körper gebraucht. Die Lipoide bilden demnach keine durch chemische Verwandtschaft charakterisierte Gruppe von Substanzen, sondern ordnen sich auf Grund von ähnlichen physikalisch-chemischen und physiologischen Eigenschaften zu einer Einheit. Die Gemeinschaft beruht auf ihrer Löslichkeit in vielen organischen Lösungsmitteln und ihrer Fähigkeit, in Wasser kolloidale Lösungen oder Suspensionen zu bilden.

Die Lipoide sind ein regelmäßiger Bestandteil des Protoplasmas. In besonderer Menge sind sie an der Zusammensetzung des Nervengewebes beteiligt. Diese Verbreitung läßt auf eine wichtige Rolle im Haushalt des Organismus schließen. Trotzdem war ihre biologische Bedeutung bis in die jüngste Zeit nicht erkannt. Erst die epochemachenden Untersuchungen von H. Mayer sowie Overton gaben uns über ihre Funktionen einigen Aufschluß. Aus diesen Untersuchungen ergab sich, daß die Aufnahmefähigkeit der Zelle und Gewebe für gelöste Substanzen mit deren Lösungsaffinität zu den Lipoiden im Zusammenhang steht. Nach Overton bilden, wie schon erwähnt wurde, die Lipoide um die Zelle eine Membran, die allein mit der umspülenden Gewebsflüssigkeit in Berührung kommt und den Stoffaustausch der Zelle vermittelt. Diese Betrachtungsweise macht es verständlich, daß nur solche Substanzen in der Zelle ihre Wirksamkeit entfalten können, welche die Lipoidmembran zu durchdringen vermögen.

Schon durch die Untersuchungen von Overton und Meyer war demnach der Hinweis gegeben, daß die physiologische Rolle der Lipoide an ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften geknüpft ist, ein Gedanke, den Höber, Zangger, Landsteiner, Henri u. a. mehrfach ausgesprochen haben. In letzter Zeit konnten Porges und Neubauer den Nachweis erbringen, daß vielfach ein vollständiger Parallelismus im kolloidchemischen und biologischen Verhalten der Lipoide besteht. Die Grundlage ihrer Wirksamkeit ist darnach ihre Kolloidnatur im wässerigen Medium. Diese Betrachtungsweise gilt insbesondere für die Beziehungen der Lipoide zur Immunität, womit sich der Zusammenhang dieses Kapitels mit dem vorigen ergibt.

II. Literaturübersicht.

Während die Beziehungen der eiweißartigen Kolloide zur Immunität schon frühzeitig erkannt waren, wurde man verhältnismäßig erst spät auf die Bedeutung, die den Lipoiden für die Empfindlichkeit und Resistenz der Zelle gegen Gifte zukommt, aufmerksam. Der erste Befund, der dieses Gebiet betrifft, wurde von Fraser erhoben, der den Nachweis

liefern konnte, daß alkohollösliche Bestandteile der Galle eine mehrfach tödtliche Dosis von Schlangengift unschädlich machen können. Phisalix erkannte in weiterer Verfolgung dieser Versuche das Cholesterin als die antitoxische Substanz. Später konnten Kempner und Schepilewski zeigen, daß Cholesterin und Lecithin tödliche Mengen von Botulismustoxin neutralisieren. Aber erst durch die Arbeiten von Ransom 1901 und Kyes 1902 gelangte die Bedeutung der Lipoide für die Immunitätslehre zur klaren Erkenntnis. Die Ransomsche Untersuchung wurde durch die bekannten Versuche von Meyer, sowie Overton angeregt. Ransom konnte zeigen, daß die hämolysierende Eigenschaft des Blutgiftes Saponin durch geringe Mengen von Cholesterin aufgehoben wird. In den Einzelheiten bietet der Neutralisierungsvorgang, wie er nachweisen konnte, eine vollständige Analogie zu echten antitoxischen Prozessen.

Kyes konnte eine andere Funktion der Lipoide, die die Empfindlichkeit für Gifte betrifft, aufdecken. Er fand, daß das Gift der Kobraschlange, welches für die roten Blutkörperchen vieler Tierspezies an sich indifferent ist, durch Lecithinzusatz eine intensive hämolysierende Eigenschaft empfängt. Diese Entdeckung bietet eine vollständige Analogie zu der von Flexner und Noguchi beschriebenen Aktivierbarkeit des Kobragiftes durch echtes Serumkomplement. Das Lecithin bildet nach den Untersuchungen von Kyes mit dem Schlangengifte eine Blutkörperchen lösende Verbindung, die er Kobragiftlecithid nennt.

Durch diese zwei grundlegenden Arbeiten wurden zum erstenmale chemisch charakterisierte Körper als Träger von Eigenschaften, die man früher Substanzen von fermentartiger Beschaffenheit zuzuschreiben geneigt war, erkannt. Die von Ransom sowie Kyes gefundenen Tatsachen haben die weitere Bearbeitung dieses Gebietes von seiten der Immunitätsforschung angeregt, und gegenwärtig liegen bereits zahlreiche Erfahrungen über die Funktion der Lipoide als Antitoxine, Komplemente und über die sonstige Rolle, die ihnen in der Immunität zukommt, vor.

a) Die Lipoide als Antitoxine.

Die Ransomsche Entdeckung veranlaßte eine Reihe von Fragenstellungen. Es waren außer Cholesterin auch andere Lipoide auf antitoxische Eigenschaften zu prüfen, die verschiedenartigsten Gifte in den Bereich der Untersuchung zu ziehen, der Zusammenhang der natürlichen und künstlichen Immunität mit der Anwesenheit der Lipoide im Organismus aufzuklären, schließlich das Verhältnis der antitoxischen Wirkung zu anderen Eigenschaften der Lipoide festzustellen.

Antihämotoxische Eigenschaften ließen sich außer beim Cholesterin nur noch bei einem aus Erythrocyten dargestellten Cerebrin (Pascucci) nachweisen, alle anderen Lipoidkörper erwiesen sich als unwirksam. Detre und Sellei machen zwar die Angabe, daß die von ihnen gefundene Hämolysinwirkung des Sublimats sich durch Lecithin neutralisieren läßt, Sachs konnte jedoch diesen Befund nicht bestätigen, so daß diesbezüglich weitere Untersuchungen abzuwarten sind; jedenfalls ist die antilytische Wirkung des Lecithins auch nach den Versuchen von Detre und Sellei nicht erheblich. Gegen Saponin und andere Gifte, die durch Cholesterin neutralisiert werden, erwies sich das Lecithin als unwirksam (Ransom, Noguchi, Pascucci u. a.). nur gegen Agaricin übte das Lecithin eine geringe Schutzwirkung aus (Noguchi).

Die Gifte, die durch Cholesterin unschädlich gemacht werden, sind, soweit unsere bisherigen Kenntnisse reichen, Saponin (Ransom), Solanin

(Bashford), Agaricin (Noguchi), Tetanolysin (Noguchi), Vibriolysin (Pribram), Kobragiftlecithid (Kyes), Arachnolysin (Belonowski), Bienengiftlecithid (Morgenroth und Carpi); unbeeinflußt bleiben Staphylolysin, Abrin, Ricin, Robin (Kyes und Sachs) ebenso wie die komplexen Normal- und Immunhämolysine.

Wie schon Ransom gefunden hatte, vermag normales Serum infolge seines Cholesteringehaltes Saponin zu entgiften. Es ergab sich nun die weitere Frage, ob die von zahlreichen Autoren beobachtete Hämotoxine abstumpfende Wirkung von Normalseris, antihämotoxischen Immunseris, tierischen Flüssigkeiten, Organextrakten ebenfalls auf die Anwesenheit von Lipoiden zu beziehen ist. Schon Kyes und Sachs stellten fest, daß die von Kraus und Clairmont gefundene antitetanolytische Eigenschaft des normalen Pferdeserums seinen alkohollöslichen Bestandteilen anhaftet. P. Th. Müller unterzog dieses Antitetanolysin einer genaueren Untersuchung und sah es vollständig in den Alkoholextrakt übergehen. Im Gegensatz zu diesen Befunden schrieben Arrhenius und Madsen dem Serumeiweiß antilytische Eigenschaften zu. Detre und Sellei fanden dieses Antihämotoxin ätherlöslich, stellten aber das Lecithin als lösungshemmende Substanz hin, während Noguchi, wie schon erwähnt, nur das Cholesterin als wirksam befunden hatte. Diese Wiedersprüche wurden schließlich von v. Eisler geklärt. Er fand sowohl ein alkohol- und ätherlösliches Antitetanolysin, das er mit Cholesterin identifiziert, als auch eine den Eiweißkörpern angehörende antilytische Substanz. Sera anderer Tierspezies mögen ein von dem Pferdeserum verschiedenes Verhalten zeigen, wie z. B. das Menschenserum oder das Taubenserum, das nach Detre und Sellei seine antitetanolytische Wirkung ausschließlich den Lipoiden verdankt. Gegen Staphylolysin fand v. Eisler wie schon vor ihm Sachs den Alkoholextrakt des normalen Pferdeserums unwirksam, ebenso gegen Vibriolysin, trotzdem diese beiden Gifte von nativem Serum abgestumpft werden.

Da die meisten tierischen Flüssigkeiten und Organextrakte Cholesterin enthalten, so ist ihre Schutzwirkung gegen Gifte, die sich mit Cholesterin absättigen lassen, von vornherein verständlich. Daß der Ätherextrakt von Erythocyten gegen Saponin schützt, hatte schon Ransom gefunden und auf das anwesende Cholesterin zurückgeführt. Noguchi fand die Milch infolge ihres Cholesteringehaltes gegen Tetanolysin wirksam, P. Th. Müller konnte mit Alkohol aus dem Eiklar ein Antitetanolysin extrahieren, Landsteiner und v. Eisler neutralisierten dieses Gift mit Petrolätherextrakten von roten Blutkörperchen. Schließlich fanden Madsen und Walbum im Wittepepton einen alkohollöslichen antitetanolytischen Körper, dessen nähere Untersuchung sie in Aussicht stellen.

Abgesehen von den Hämotoxinen sind auch schon andere Gifte durch Lipoide neutralisiert worden, so, wie eingangs erwähnt wurde, das Schlangengift und Botulismustoxin. Auch die von Wassermann und Takaki sowie Behring und Ransom beobachtete Entgiftung des Tetanustoxins durch Gehirnsubstanz scheint wenigstens teilweise sich auf seine Lipoide zu beziehen, wie schon Besredka und Metschnikoff angenommen hatte. Neuerdings hat Landsteiner die Beantwortung dieser Frage in Angriff genommen und in gemeinsamen Versuchen mit v. Eisler gezeigt, daß das Gehirn durch Ätherextraktion einen großen Teil seiner Bindungsfähigkeit für Tetanusgift verliert. Indessen waren Alkohol oder Ätherextrakte des Gehirns sowie Cholesterin und Lecithin nur in ge-

ringem Grade befähigt, das Gift unwirksam zu machen. Derselbe Autor hat später in Gemeinschaft mit Botteri das Protagon und Cholesterin als Tetanusgift neutralisierende Substanzen charakterisiert. Schließlich sei noch erwähnt, daß die von Stoudenski beobachtete Eigenschaft der Cochenille, Tetanusgift zu binden, auf die Lipoide dieses Insektes zurückzuführen sein dürfte, wie schon Metschnikoff vermutete.

Wie sich also aus Vorangehendem ergibt, ist ein Teil der sogen. Normalantitoxine auf Lipoide, speziell auf das Cholesterin zurückzuführen, Dagegen ist es nicht gelungen, Immunantitoxin, besonders Immunantihämotoxin mit Lipoiden zu identifizieren, denn alle Untersucher fanden Alkohol- und Ätherextrakte der betreffenden Immunsera unwirksam. Überhaupt gewähren bisher nur wenige Befunde einen gewissen Anhaltspunkt, daß bei der künstlichen Immunität die Lipoide eine Veränderung erfahren. So fand Hahn, daß das Blut bei steriler Autodigestion eine Zunahme seines Petrolätherextraktes erfährt, die wahrscheinlich auf Zunahme des Neutralfettes zurückzuführen ist. Im Blute von zwei immunisierten Tieren war nun im Gegensatze zu zahlreichen normalen eine derartige Zunahme nicht nachzuweisen. In welcher Beziehung diese Erscheinung zur Immunität steht, ob sie vielleicht auf Veränderungen der Lipoide zurückgeht, müssen künftige Untersuchungen zeigen. Vielleicht stehen die neuesten Befunde von Neuberg und Reicher mit dieser Beobachtung im Zusammenhang, denen zufolge die Immunsera ein ausgesprochenes Fettspaltungsvermögen zeigen.

Die Ransomsche Entdeckung ermöglichte es schließlich, zum ersten Male der Frage näher zu treten, welche Atomgruppierung das Substrat der Immunkörperwirkung darstellt. Hausmann sowie Abderhalden und Le Count untersuchten den Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution und antilytischer Wirkung des Cholesterins. Sie fanden übereinstimmend, daß die Besetzung der Hydroxylgruppe die antilytische Eigenschaft aufhebt, Auflösung der doppelten Bindung das Entgiftungsvermögen wesentlich schwächt. Daher sind auch die im Serum und in den Organen reichlich vorfindlichen Ester des Cholesterins unwirksam. Von Interesse wäre bei den einzelnen Cholesterinderivaten der Vergleich ihrer antilytischen Wirkung mit ihren sonstigen physikalischen und chemischen Eigenschaften.

Das Wesen der Cholesteringiftverbindungen wurde schon im ersten Teil (Über Kolloidreaktionen) ausführlicher erörtert.

b) Die Lipoide als Komplemente.

Ähnlich wie die Arbeit von Ransom hat auch die Entdeckung von Kyes eine Reihe von Untersuchungen angeregt, die über die über die Komplementfunktion der Lipoide Erfahrungen sammelten.

Schon Kyes hat in dieser Richtung gearbeitet und die anderen Lipoide auf ihre komplettierende Fähigkeit geprüft. Außer Lecithin fand er aber nur noch das chemisch verwandte Kephalin als Komplement für Kobragift wirksam. In neuester Zeit konnte P. Meyer auch beim Jekorin, ebenfalls einem Lezithinderivat, eine derartige Eigenschaft feststellen. Von den Substanzen, die mit den Lipoiden in gewisser Hinsicht in eine Gruppe gehören, den eigentlichen Fetten, erwies sich, wie Noguchi fand, das Triolein sowie die Ölsäure als Aktivatoren für Kobragift wirksam. Auch Seifen können hier die Rolle von Komplementen spielen, wie Noguchi sowie Liebebmann unabhängig von einander zeigen konnten. Von großer Bedeutung ist der Befund dieser Autoren, daß die komplettierende Wirkung

des ölsauren Natrons bei Eiweißgegenwart thermolabil ist, demnach diesbezüglich kein Unterschied gegenüber der Wirksamkeit von echtem Komplement besteht.

Die Komplementfunktion des Lecithins wurde als eine allgemeinere Eigenschaft erkannt. Schon Kyes konnte mit Lecithin verschiedenartige Schlangengifte sowie Skorpiongift aktivieren. Pascucci stellte ein hämolysierendes Abrinlecithid her (von Neuberg als Wirkung von sich bildender Ölseife aufgefaßt, s. später), Morgenroth und Carpi fanden, daß die blutlösende Wirkung des Bienengiftes durch Lecithinzusatz erheblich verstärkt wird. Schließlich entdeckten Friedemann, Neuberg und Reicher, sowie Wohlgemut unabhängig von einander ein durch Lecithin aktivierbares Hämolysin im Pankreassaft. Von besonderem Interesse ist es, daß Landsteiner und v. Jagic auch ein anorganisches Kolloid, die Kieselsäure, in ein hämolysierendes Lecithid überzuführen vermochten, während die Kieselsäure an sich nur geringe Hämolyse, dagegen starke Agglutination zu erzeugen vermag (von Liebermann bestätigt). Von größter Wichtigkeit ist die Angabe von Noguchi, daß auch hämolytische Immunkörper durch ölsaures Natron aktiviert werden, was indessen Hecker bestreitet.

Die Scheidung des echten Kobragiftkomplements von der komplettierenden Wirkung des Lecithins konnten schon Kyes und Sachs durchführen. Das echte Komplement ist thermolabil, die komplettierende Wirkung des Lecithins ist thermostabil; mitunter ist das Lecithin im Serum auch in einer unwirksamen Bindung, die erst durch Erhitzen beseitigt wird. Daraus erklären sich auch ältere Befunde von Calmette, denen zufolge manche Sera erst nach Erwärmung auf höhere Temperaturen Schlangengift zu komplettieren imstande sind.

Kyes und Sachs konnten weiter den Nachweis erbringen, daß Lecithin und Komplement für sich im Serum wirksam sind. Sie stellten nämlich fest, daß das Cholesterin nur durch Lecithin, nicht aber durch echtes Komplement aktiviertes Kobragift neutralisiert. Weitere Unterschiede lassen sich aus den Untersuchungen von Morgenroth und seiner Mitarbeiter ableiten. Sie zeigten, wie schon teilweise auch Kyes gefunden hatte, daß die Lecithide widerstandsfähig sind gegen hohe Temperaturen (100°) gegen Einwirkung von Verdauungsfermenten, Eingriffe, die sowohl Gift an sich als auch echtes Komplement sicher zerstören.

In neuester Zeit will endlich v. Dungern festgestellt haben, daß die durch Lecithin aktivierbare Substanz des Kobragiftes von den Erythrocyten nicht gebunden wird, während eine durch echtes Komplement ergänzbare Komponente in analoger Weise wie hämolytischer Immunkörper absorbiert wird. Indessen hatte schon vorher Lamb festgestellt, daß keine der Komponenten, weder die durch Lecithin noch die durch echtes Komplement aktivierbare, gebunden wird, daß somit diesbezüglich ein Unterschied gegenüber den sogenannten komplexen Hämolysinen der Sera besteht. Durch diese Untersuchungen sowie die noch zu besprechenden von Neuberg und seinen Mitarbeitern scheint die Lecithidfrage eine neue Basis gewonnen zu haben, deren Beurteiluug erst durch künftige Untersuchungen ermöglicht werden kann.

Einen Ausblick gewähren aber jetzt schon die chemischen und physikalisch-chemischen Untersuchungen über Lecithide, wie sie zum Teil schon im Kapitel I erörtert worden sind. Während nämlich Kyes die Giftlecithinverbindung als echte chemische Verbindung nach konstanten

Proportionen auffaßt, lassen sich aus seinen Versuchsdaten gerade Anhaltspunkte dafür gewinnen, daß es sich um eine Kolloidverbindung handelt, was schon Bredig vermutet hatte. Eine Stütze dieser Anschauung bilden die Versuche von Reis, Michaelis und Rona, denen es gelang, analoge Verbindungen zwischen Lecithin und Ferment bezw. Albumosen herzustellen. Der Wesensvorgang der veränderten Löslichkeit von Kobragift, Ferment und Albumosen bei Lecithingegenwart dürfte auf einer Schutzkolloidwirkung des Lecithins beruhen, wie noch nicht veröffentlichte Versuche des Verfassers mit Neubauer wahrscheinlich machen. Eine andere Frage ist es aber, ob diese Giftlecithinverbindung tatsächlich das blutlösende Prinzip ist. Neuberg und Reicher, sowie Neuberg und Rosenberg konnten nämlich im Kobragift ebenso wie in einer großen Anzahl anderer cytolytischer Agentien die Gegenwart einer Lipase feststellen, die aus dem Lecithin einen Fettsäurerest abspaltet. (Damit erklärt sich auf die Beobachtung von Kyes sowie Lüdecke, daß bei der Lecithidbildung Ölsäure abgespalten wird.) Es wäre nun die Möglichkeit vorhanden, daß das hämolytische Prinzip mit dem Lecithid überhaupt nichts zu tun hat, sondern auf die hämolytische Wirkung etwa von Seifen und Fettsäuren zurückzuführen ist. Eine andere Möglichkeit ergibt sich aus der Elementaranalyse des Kyesschen gereinigten biuretfreien Kobralecithids, das nach Willstädter und Lüdecke ein anscheinend von Kobragift freies Monostearinlecithin ist*). Die Lecithidbildung wäre danach nichts anderes als die Bildung von Monostearinlecithin aus Lecithin durch die Lipase des Kobragiftes. Mit einer derartigen Auffassung würden insbesondere die schon erwähnten Untersuchungen von Morgenroth und seiner Mitarbeiter in gutem Einklang stehen, denn die geringe Widerstandsfähigkeit des nativen Kobragiftes (Prolecithids) würde sich aus der Labilität der Lipase erklären, während das bereits gebildete Monostearinlecithin einen stabilen Körper darstellt. v. Dungern macht übrigens die Angabe, daß es ihm gelungen sei, aus Lecithin eine Substanz von der hämolysierenden Fähigkeit des Lecithids direkt darzustellen. Eine weitere Stütze dieser Auffassung bilden die schon erwähnten Befunde von Friedemann, Wohlgemut sowie Neuberg und Rosenberg, denen zufolge der fettspaltende Pankreassaft ebenfalls zur „Lecithidbildung“ befähigt ist.

c) Lipoide als Antiambozeptoren, Antikomplemente, Antiagglutinine.

Landsteiner und v. Eisler machten die Beobachtung, daß Äther- und Petrolätherextrakte aus Erythrocyten die Fähigkeit haben, hämolytische Normalambozeptoren zu binden. Die Reaktion war bis zu einem gewissen Grade spezifisch, d. h. es wurden immer die homologen Ambozeptoren der Blutart stärker gebunden als heterologe. Einen analogen Befund erhoben sie betreffs der Bakterienextrakte und bakteriziden Ambozeptoren. Es wäre dies der erste Nachweis einer spezifischen Wirkung vonn Lipoiden, wenn es gestattet ist, aus der Ätherlöslichkeit auf die Lipoidnatur zu schließen. Indessen sind diese Untersuchungen von Landsteiner in Gemeinschaft mit Dautwitz fortgesetzt worden und es ergab sich, daß die spezifisch bindende Substanz in Aceton sowie in wasserfreiem

*) Das von Biltz ermittelte hohe Molekulargewicht kann diese Auffassung nicht widerlegen, es spricht vieles dafür, daß die Substanz in Chloroform kolloidale Lösungen bildet.

Äther unlöslich ist. Aus der letzteren Tatsache muß es, wie diese Autoren selbst hervorheben, zweifelhaft erscheinen, ob es sich hier tatsächlich um Lipoide und nicht etwa um verunreinigende Proteine handelt.

Daß Lipoide Komplemente binden können (Landsteiner und Stankovic, Bang und Forssmann, Wassermann und Citron) erscheint nicht auffallend, da wir aus einer Anzahl von anderen Untersuchungen wissen, wie schon im ersten Teil ausgeführt wurde, daß die verschiedenartigsten Kolloide und Suspensionen imstande sind, Komplement zu absorbieren. So ist auch die antikomplementäre Wirksamkeit erhitzter Sera, wie Noguchi nachweist, auf den Cholesteringehalt zurückzuführen. Eine Antiagglutininwirkung der Lipoide konnte Lazar beobachten. Er fand, daß die Agglutination der Zellkerne von Taubenerythrocyten durch das Zusammenwirken von zwei Substanzen gehemmt wird, von denen die eine spezifisch ist und durch Ätherextraktion, nicht aber durch Petroläther dem Taubenblut entzogen werden kann, während die andere nichtspezifische Komponente in den Äther- und Petrolätherextrakt des Taubenblutes sowie einer großen Anzahl von untersuchten Blutarten übergeht und wahrscheinlich mit Cholesterin identisch ist.

d) Lipoide als Gifte, Lysine und bakterizide Substanzen, Lipoide als Immunogene.

Wie sich aus dem Bisherigen ergibt, kommen den Lipoiden entsprechend ihrer Kolloidnatur die mannigfachsten Funktionen in der Immunitätslehre zu. Von größtem Interesse ist nun die Frage, ob sie ähnlich wie die proteinartigen Kolloide imstande sind, im Organismus die Bildung von spezifischen Antikörpern anzuregen. Diesbezügliche Versuche mit reinen Lipoiden hatten bisher durchwegs ein negatives Ergebnis (s. Lecithin Wassermann und Citron). Dagegen berichten Bang und Forssmann, daß es ihnen gelungen sei, aus Erythrocyten ein Lipoid darzustellen, das im Tierkörper spezifische Antihämolysine erzeugt. Die Substanz ist unlöslich in wasserfreiem Äther und Aceton sowie kaltem Benzol, löslich in heißem Benzol. Doch erscheint es möglich, daß hier das wirksame Agens beigemengtes Protein ist, wie auch Landsteiner und Dautwitz, die sich ebenfalls mit derartigen Versuchen befaßten, vermuten. Daß die Substanz andere Löslichkeitsverhältnisse zeigt als Protein, spricht jedenfalls noch nicht gegen eine Proteinbeimengung, denn die Kolloidverbindungen zwischen Protein und Lipoiden bieten diesbezüglich besondere noch zu wenig untersuchte Verhältnisse dar, wie noch im methodischen Teil ausgeführt werden wird.

Von großem Interesse ist auch die von Gottlieb und Lefmann beobachtete spezifische Giftwirkung der Bang-Forssmannschen Erythrocytensubstanz.

Daß Lipoiden und lipoidartigen Substanzen nichtspezifische Giftwirkungen zukommen können, ist wohl eine längst bekannte Tatsache; es ist z. B. nur an die Giftwirkung der Seifen und gallensauren Alkalien zu erinnern. Gottlieb und Lefmann konnten jedoch zeigen, daß die nach Bang und Forssmann dargestellten Erythrocytenextrakte nur für heterologe, nicht aber für homologe Tierarten giftig sind.

In naher Beziehung zu der Giftwirkung der Lipoide stehen ihre hämolysierenden und bakteriziden Eigenschaften. Schon lange bekannt ist die Tatsache, daß Seifen, gallensaure Alkalien, Fette, Öle und Lecithin Blut lösen. Hierher gehören auch die Untersuchungen von

Korschun und Morgenroth, Levaditi, Wölfel, denen zufolge alkoholische Auszüge aus Organen und Blut Erythrocyten lösen. Noguchi sowie Landsteiner und Ehrlich nahmen in jüngster Zeit die Verfolgung dieser Frage auf und machten wahrscheinlich, daß das blutlösende Agens dieser Auszüge mit Seife identisch ist. Bemerkenswerter Weise konnten nun diese Autoren feststellen, daß diese Extrakte bei Eiweißgegenwart in ihrer hämolysierenden Wirksamkeit thermolabil sind, wie sich denn nach Noguchi in analoger Weise auch die hämolysierende Fähigkeit der Seifen als thermolabil bei Eiweißgegenwart herausstellte. Landsteiner und Ehrlich konnten weiter durch Ätherextraktion aus Knochenmark bakterizide Substanzen darstellen, die sich ebenfalls bei Eiweißgegenwart als thermolabil erweisen. Durch diesen Befund erscheint die Lipoidnatur der bakteriziden Substanzen in wässerigen Extrakten aus Knochenmark und Leukocyten (Bail und Petterson) wahrscheinlich gemacht. Bassenge beobachtete eine bakterizide Wirkung des Lecithins, Russ und Raubitschek stellten fest, daß die bakterizide Wirksamkeit der Pyocyanase (Emmerich, Löw) auf deren Lipoide zurückzuführen ist. Endlich konnten Landsteiner und Raubitschek aus Trypanosomen sowie aus Bakterien alkohollösliche Substanzen von hämolytischer Wirkung darstellen.

e) Bedeutung der Lipoide für den Mechanismus der Cytolyse, für Transport und Fixierung von Giften im Organismus.

Hoppe-Seyler sowie Köppe haben zuerst den Gedanken ausgesprochen, daß die Wirkungsweise vieler hämolytischer Agentien auf ihrer Einwirkung (Lösung, Spaltung) auf die die Zellmembran bildenden Lipoide der Erythrocyten zurückzuführen ist. Landsteiner und v. Eisler kamen nun auf Grund ihrer Versuchsresultate zu der Anschauung, daß die blutlösenden Toxine sowie komplexen Hämolysine ebenfalls ihren Angriffspunkt in der Lipoidhülle der Erythrocyten haben. Einen Beweis für diese Anschauung hat mit einer eleganten Versuchsanordnung Pascucci erbracht. Er stellte durch Imprägnation von Seidenstoff mit Lipoiden Membranen her, auf die er verschiedene Blutgifte (Saponin, Solanin, Kobragift, Tetanolysin) einwirken ließ. Die Gifte machten nun die Membranen für Hämoglobin und Cochenillelösungen durchgängig, Cholesterinmembranen waren widerstandsfähiger als Lecithinmembranen.

Welcher Art ist nun die Veränderung, die die Zellipoide unter der Einwirkung des hämolytischen Agens erfahren? Die schon erwähnten Untersuchungen von Neuberg und Rosenberg, sowie Neuberg und Reicher würden darauf hindeuten, daß bei diesem Vorgang die Lecithinspaltung irgend eine Rolle spielt, indessen läßt sich, wie diese Autoren selbst erwähnen, auf Grund dieser Tatsachen noch keine brauchbare Vorstellung über die Einzelheiten des Lösungsvorganges gewinnen. Vielleicht ergeben Untersuchungen des Verfassers mit Neubauer, die in dieser Richtung noch nicht abgeschlossen sind, wenigstens für eine Anzahl von Blutgiften eine Erklärungsmöglichkeit. Verfasser konnte nämlich in Gemeinschaft mit Neubauer zeigen, daß Saponin imstande ist, eine Lecithinsuspension aufzuhellen. Daß diese Erscheinung einem Lösungsvorgang gleichkommt, konnte Neubauer dadurch erweisen, daß Lecithin aufhellende Konzentrationen gewisser Salze (Jodide, Rhodanide) wiederum Blut lösen. Die Wirkung des Saponins und vielleicht anderer ähnlich reagierender Gifte wäre danach eine Art Peptisation des Lecithins.

Die schon oben besprochene Lipoidaffinität vieler Gifte (Tetanustoxin usw.) läßt erwarten, daß sie im Organismus besondere Beziehungen zu den lipoidreichen Organen zeigen. In der Tat beweisen die Untersuchungen von Meyer und Ransom, Ransom, Löwi und Meyer, daß dem lipoidreichen peripheren und Zentralnervensystem eine hohe Bedeutung für den Transport und die Fixierung des Tetanusgiftes bzw. des Diphtheriegiftes zukommt.

Schließlich wäre noch eine jüngst aufgedeckte Funktion der Lipoide zu besprechen. Es gelang nämlich dem Verfasser in Gemeinschaft mit Maier den Nachweis zu erbringen, daß die sogenannten „Luesantikörper" mit Lecithin und anderen Lipoiden im Sinne einer kolloidalen Verbindung reagieren. Landsteiner sowie Levaditi arbeiteten gleichzeitig in ähnlicher Richtung.

Durch das bisherige Tatsachenmaterial ist demnach bereits eine hervorragende Bedeutung der Lipoide für die Immunitätslehre festgestellt. Namentlich hat die natürliche Resistenz mit ihrer Wirksamkeit zu rechnen und viele Untersuchungen aus den Anfängen der Immunitätsforschung wären in diesem Sinne einer Revision zu unterziehen.

Auch bei vielen anderen bisher unaufgeklärten Erscheinungen wäre eine Beteiligung der Lipoide denkbar, so z. B. bei der Komplementwirkung, wie dies schon im Vorangehenden erwähnt wurde (Landsteiner und v. Eisler und Landsteiner und Ehrlich). Eine Stütze erfährt diese Vermutung durch die Beobachtungen von Kyes und Sachs sowie Ottolenghi und Mori, die durch Ätherbehandlung Sera (es handelte sich um echte thermolabile Komplemente) ihrer aktivierenden Eigenschaften berauben konnten.

Jedenfalls gibt das eigenartige physikalisch-chemische Verhalten der Lipoide (Porges und Neubauer), ihre Fähigkeit, die Löslichkeit anderer Substanzen zu modifizieren (Michaelis und Rona), ihr Kolloidzustand im wässerigen Medium und die dadurch bedingten Beziehungen zu Elektrolyten und anderen Kolloiden, ihre ubiquitäre Verbreitung im Organismus, ihre Bedeutung für den Stoffaustausch der Zelle, in der sie nach den Proteinen das wichtigste Element darstellen, einen deutlichen Hinweis auf eine noch nicht genügend gewürdigte Bedeutung für die Lebensvorgänge, zu deren wunderbarsten Erscheinungen die Immunität gehört.

III. Methodik.

a) Eigenschaften, Darstellung, Nachweis der Lipoide.

Cholesterin $C_{26}H_{43}OH$. Weiße, mattglänzende Kristallblättchen. Kristallisiert aus wasserfreiem Äther, aus Chloroform, Benzol in feinen Nadeln, aus kochendem Alkohol nach dem Erkalten in größeren Blättchen. Schmelzpunkt um 145°. Cholesterin ist löslich in Äther, Chloroform, Aceton, Benzol, Fetten und flüchtigen Ölen, unlöslich in kaltem Alkohol, löslich in heißem Alkohol. Durch Eingießen seiner alkoholischen oder Acetonlösungen in Wasser erhält man eine homogene Suspension, die die Eigenschaften der Suspensionskolloide hat (Porges und Neubauer).

Zur Erkennung des Cholesterins dient sein Verhalten gegen konzentrierte Schwefelsäure, durch deren Einwirkung schön gefärbte Kohlenwasserstoffe entstehen.

Reaktion von Salkowski: Cholesterin in Chloroform gelöst wird mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet.

Die Chloroformlösung färbt sich erst blutrot, dann violettrot. Die Schwefelsäure erscheint dunkelrot mit grüner Fluoreszenz. Gießt man die Chloroformlösung in eine Porzellanschale, so sieht man einen Farbenwechsel in blau, dann in grün, schließlich in gelb.

Reaktion von v. LIEBERMANN und BORCHARD: Cholesterin wird in wenig Chloroform gelöst, hierauf mit 2—3 Tropfen Essigsäureanhydrid und schließlich vorsichtig mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Lösung färbt sich erst rot, dann blau, schließlich grün. Bei wenig Cholesterin tritt die Blaufärbung nach einiger Zeit unvermittelt auf.

Vorkommen des Cholesterins: In größerer Menge in Gallensteinen, im zentralen und peripheren Nervensystem, in geringerer Menge in alten Transsudaten, in Cystenflüssigkeit, Atherominhalt, in Tumoren, Blutkörperchen, ferner im Serum, in der Milch, in den Organen. Im Serum sowie in den Organen ist der größte Teil als Fettsäureester vorhanden.

Darstellung des Cholesterins. Gepulverte Gallensteine (Cholesterinsteine zeigen konzentrische Schichtung und Wachsglanz der Bruchflächen) werden mehrmals mit kochendem Wasser, hierauf mit siedendem Alkohol ausgezogen. Der filtrierte Alkoholextrakt läßt beim Erkalten das Cholesterin in Kristallen ausfallen, die hierauf noch mit alkoholischer Kalilauge gekocht werden, um verunreinigendes Fett zu verseifen. Die nach dem Erkalten ausfallende Masse wird zur Entfernung der Seifen mit kaltem Alkohol und mit Wasser gewaschen, darauf in einer Mischung von Alkokol und Äther aufgenommen und zur Kristallisation offen stehen gelassen. Nach Verdunstung des Äthers scheidet sich das Cholesterin aus und wird dann noch mehrmals zur weiteren Reinigung aus Alkoholäther umkristallisiert.

Nachweis in tierischen Flüssigkeiten, Organen, Organsäften: Man extrahiert die betreffende Flüssigkeit (Organe in feuchtem Zustande) wiederholt mit heißem Alkohol. Der vom Eiweißkoagulum abfiltrierte Alkohol läßt beim Erkalten und Eindunsten Cholesterinester in Kristallform ausfallen, die zu entfernen sind. Nach Verdunstung des Alkohols wird der Rückstand mit Äther erschöpft, die vereinigten auf ein kleines Volumen eingeengten ätherischen Auszüge nach ZÜLZER mit Aceton im Überschuß versetzt, die von dem ausfallenden Niederschlag (Lecithin eventuell Protagon) abfiltrierte Lösung eingedampft. Der Rückstand wird wieder mit kochendem Alkohol aufgenommen, filtriert, das Filtrat in der Kälte eingedunstet, wobei anfangs noch Cholesterinester ausfallen, die zu entfernen sind. Die nach Verjagung des Alkohols restierende Substanz enthält das Cholesterin fast rein*). Identifizierung durch den Schmelzpunkt. Die Reaktionen von SALKOWSKI, v. LIEBERMANN, NEUBERG und RAUCHWERGER geben auch Cholesterinester. Zur Identifizierung läßt sich auch die Schutzwirkung gegen die hämolysierende Eigenschaft des Saponins heranziehen.

Man kann auch gleich zu Beginn mit Äther extrahieren, den eingeengten Ätherextrakt mit Aceton fällen usw. Kleine Mengen von Cholesterin entgehen bei dieser Behandlung leicht dem Nachweise.

Lecithin. Glyzerin mit zwei Fettsäureresten (Palmitin, Stearin- oder Ölsäure) und einem Phosphorsäurerest verestert, der wieder mit Cholin in Bindung steht. Das aus Organen dargestellte Lecithin ist ge-

*) Eventuell sind verunreinigende Fette mit alkoholischer Kalilauge zu verseifen, das Cholesterin mit Äther auszuziehen.

wöhnlich ein Gemenge von Lecithinen mit verschiedenem Fettsäureradikal, meist noch durch schwer entfernbare Farbstoffe, Zersetzungsprodukte des Lecithins und andere Substanzen (Lipoide) verunreinigt. In chemisch reinem Zustande ist es bisher kaum noch dargestellt worden. Es ist optisch aktiv, rechtsdrehend (P. Mayer stellte auch die inaktive und linksdrehende Modifikation dar). Kristallisiert aus konzentrierter alkoholischer Lösung unter 0° in kleinen Kristalldrusen. Gewöhnlich erhält man es amorph, salbenartig, doch läßt es sich im Vakuum zu einem Pulver eintrocknen (Bergell). Lecithin ist leicht löslich in Alkohol, Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff, fetten Ölen, etwas schwerer in Äther, wenig löslich in Aceton. In Wasser quillt es und läßt sich leicht zu einer homogenen stabilen Suspension verteilen, die die Eigenschaften eines hydrophilen Kolloides hat (Thudichum, W. Koch, Porges und Neubauer). Mit Wasser auf 70° erwärmt, zersetzt sich das Lecithin unter Braunfärbung, wobei saure Reaktion auftritt (Fettsäure), dasselbe vollzieht sich an der Luft allmählich schon bei gewöhnlicher Temperatur. Verdünnte Säuren verändern Lecithin nur langsam, rascher verdünnte fixe Alkalien, besonders beim Erwärmen. Lipasen spalten aus Lecithin die Fettsäuren ab.

Zur Erkennung dienen die Löslichkeitsverhältnisse, nach der Veraschung der Phosphorgehalt, bei der Zersetzung die Bildung von Cholin.

Vorkommen: In reichlicher Menge im Zentralnervensystem, in den Blutkörperchen, in größerer Menge in den Nerven, in allen Organzellen, im Serum, in der Milch und in anderen tierischen Flüssigkeiten.

Darstellung. Am ergiebigsten ist die Darstellung aus Eidotter. Zu diesem Behufe werden die vom Eiklar sorgfältig getrennten Dotter solange mit Äther ausgezogen, als noch gelber Farbstoff übergeht, hierauf mit konzentriertem Alkohol eine halbe Stunde bei ca. 50° digeriert. Der abfiltrierte Alkoholextrakt wird bei 50° auf dem Wasserbade eingedampft, der restierende Syrup mehrmals mit Äther extrahiert, die vereinigten Ätherextrakte verdunstet, der Rückstand nach dem Vorgang von Altmann mit Chloroform aufgenommen und mit Aceton gefällt, der Acetonniederschlag in dieser Art noch mehrmals gelöst und gefällt, um das Cholesterin zu entfernen (Hoppe-Seyler). — Nach Zülzer läßt sich aus dem Ätherextrakte des ersten Alkoholauszuges das Lecithin direkt durch Fällung mit Aceton gewinnen.

Nachweis in tierischen Flüssigkeiten, Organen, Organextrakten. Flüssigkeiten werden mit dem 20fachen Volumen Alkohol gefällt, Organe zerkleinert und mit Alkohol ausgezogen, die Rückstände bei 50—60° noch mehrmals mit Alkohol erschöpft. Die vereinigten Alkoholauszüge werden bei 50° eingedampft, am besten im Vakuum, der trockene Rückstand mit einem Gemisch von Alkohol und Äther zu gleichen Teilen ausgezogen, um von den Phosphaten zu trennen. Der Alkoholätherextrakt wird verdunstet, getrocknet und mit Soda und Salpeter verascht. Aus dem Phosphorgehalt der Schmelze kann man den Lecithingehalt berechnen. (Ist das Lecithin in anderer Richtung zu untersuchen, so kann man aus dem Rückstand des Alkoholätherextraktes das Cholesterin und die Fette mit Aceton entfernen (Zülzer), das vom Aceton Ungelöste mit Äther erschöpfen, den eingedunsteten Ätherauszug nochmals mit Alkohol aufnehmen, aus dem das Lecithin resultiert.) Die Bestimmung des Lecithins durch Phosphornachweis ist nicht absolut beweisend, da im Alkoholätherextrakt außer Lecithin noch andere phosphorhaltige Substanzen, z. B. das Jekorin, enthalten sein können. Die Er-

kennung des Lecithins kann durch Darstellung des Platindoppelsalzes des Cholins ermöglicht werden. Zu diesem Zwecke wird der genannte Alkoholätherextrakt eingedampft, der Rückstand mit konzentrierter Ätzbarytlösung eine Stunde lang gekocht, der Baryt im Kohlensäurestrom gefällt und abfiltriert. Das eingedampfte Filtrat wird mit absolutem Alkohol ausgezogen, filtriert, das Filtrat mit alkoholischer Platinchloridlösung versetzt, worauf bei Anwesenheit von Cholin das Cholinplatindoppelsalz als hellgelber Niederschlag ausfällt.

Protagon. Chemisch noch nicht ausreichend charakterisiert. Weißes lockeres Pulver, scheidet sich in 85 %igem Alkohol bei 45° gelöst in der Kälte als schneeweißer flockiger Niederschlag aus, der aus feinsten Krystallnadeln besteht. In kalten Lösungsmitteln ist es unlöslich, löst sich aber in warmem Alkohol und Äther. Mit Wasser quillt es ähnlich wie das Lecithin und gibt eine haltbare Suspension.

Darstellung. Von Blut und Häuten sorgfältig gesäubertes Gehirn wird fein zerrieben und mit kaltem Alkohol mehrere Tage digeriert. Der Alkohol wird hierauf abgegossen, die restierende Masse wiederholt mit 85 %igem Alkohol bei 45° erschöpft. Der warm filtrierte Alkoholextrakt läßt beim Erkalten einen weißen feinflockigen Niederschlag ausfallen, der gesammelt und mit Äther gewaschen wird, um Cholesterin und Lecithin zu entfernen. Behufs weiterer Reinigung kann der Niederschlag, nachdem er über Schwefelsäure getrocknet ist, noch wiederholt mit 85 %igem Alkohol bei 45° aufgenommen und wieder abgeschieden werden. Nachweis durch die Löslichkeitsverhältnisse. Beim Erhitzen zersetzt sich das Protagon und liefert außer Lecithin, Cholin, die zu beschreibenden Cerebrine.

Cerebrin. (Phrenosin). Von unbekannter chemischer Konstitution. Weißes krystallinisches Pulver. In kalten Lösungsmitteln unlöslich. In heißem Alkohol, Essigester, Benzol, Eisessig, Aceton, Chloroform löslich, in Äther ganz unlöslich. In heißem Wasser quillt es auf.

Darstellung. Fein verteiltes Schafsgehirn wird mit Alkohol ausgekocht. Der auf 0° abgekühlte Alkokolauszug läßt einen Niederschlag von Cerebrin ausfallen, der aus Eisessig umkrystallisiert wird (W. Koch).

Nachweis. Das auf diese Art dargestellte Cerebrin kann durch seine Löslichkeitsverhältnisse sowie durch seine Eigenschaft erkannt werden, beim Sieden mit verdünnten Mineralsäuren eine reduzierende Substanz zu geben. (Nach Thierfelder Galaktose).

Kephalin. (Nach Koch Dioxystearylmonomethyllecithin.) Harzige, hygroskopische Substanz von brauner Farbe. Löslich in kaltem Äther, Eisessig, Chloroform und Schwefelkohlenstoff. In Alkohol und Aceton ist es ganz unlöslich. In heißem Essigester ist es löslich und scheidet sich noch im Erkalten ab. Es quillt in Wasser und gibt wie die andern Lipoide haltbare Suspensionen.

Darstellung (W. Koch). Feingemahlenes Schafsgehirn wird mehrere Stunden mit Aceton gekocht, das Aceton abgegossen, die Gehirnsubstanz durch vorsichtiges Erhitzen auf 50° vom Reste des Acetons befreit. Darauf erfolgt wiederholte Extraktion mit kaltem Äther, Einengung des Ätherauszuges auf ein kleines Volumen, Filtration, Fällung mit Alkohol im Überschuß. Der durch Alkohol ausgefällte Niederschlag wird einigemale mit kochendem Alkohol gewaschen, in Äther gelöst, mit Aceton gefällt, wieder in Äther gelöst, filtriert. Das nach Verdunsten des Äthers erhaltene Kephalin kann noch aus heißem Essigester umkrystallisiert werden (W. Koch).

Nachweis. Das auf die beschriebene Weise dargestellte Kephalin ist durch seinen Phosphorgehalt und die Unlöslichkeit in Alkohol charakterisiert.

Jekorin. Erdige, poröse Substanz — löslich in Wasser, wasserhaltigem Äther, unlöslich in absol. Alkohol, Aceton. Von Dechsel zuerst aus Leber dargestellt, wurde es von späteren Untersuchern im Blut und fast in allen Organen gefunden. Eine ausreichende chemische Charakterisierung steht noch aus. Es enthält leicht abspaltbare Glukose sowie Lecithin. Von einer in vitro darstellbaren Zuckerlecithinverbindung (Bing) unterscheidet es sich durch seinen Schwefelgehalt. Wie P. Mayer vermutet, ist es keine chemische sondern eine Kolloidverbindung von Lecithin.

Darstellung. Leberbrei wird 24 Stunden mit Aceton digeriert (Meinertz), das vom Aceton Ungelöste mit 70 % Alkohol erschöpft, der Alkohol bei einer Temperatur unter 50° (am besten im Vakuum) verdunstet, der Rückstand mit wasserhaltigem Äther aufgenommen, die klare ätherische Lösung mit absolutem Alkohol versetzt, bis ein Niederschlag von Jekorin entsteht, der behufs Reinigung noch mehrmals in wasserhaltigem Äther gelöst und mit absolutem Alkohol gefällt wird.

Nachweis. Durch die Löslichkeitsverhältnisse, Reduktionsvermögen gegenüber Kupferoxyd, Nachweis von bleischwärzendem Schwefel.

Fette*), Seifen, gallensaure Alkalien.

Fette sind die Glyzerinester der sog. höheren Fettsäuren (Stearin-, Palmitin-, Ölsäure). Stearinsäureester hat einen Schmelzpunkt von 71,5°, Palmitinsäureester von 66,5°, Ölsäureester von —5°. Das thierische Fett ist ein Gemenge dieser Ester unn besitzt, je nachdem die schwerer oder leichter schmelzbaren Anteile vorwiegen, feste oder halbflüssige Konsistenz. Die Fette sind unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol, Aceton, leicht löslich in Äther, Chloroform, Petroläther, Benzol.

Durch Soda oder geringe Alkalimengen lassen sich die Fette in Wasser zu homogenen Suspensionen verteilen. Säuren, besonders aber Alkalien spalten die Fette (Verseifung). In letzterem Falle entstehen fettsaure Alkalien, Seifen.

Die Seifen sind in Wasser teils löslich (Kali-, Natronseifen), teils unlöslich (Kalk-, Magnesiaseifen etc.). Die wässerigen Lösungen besitzen Eigenschaften und Reaktionsfähigkeit von Kolloidlösungen. Die Seifen sind löslich in Alkohol, unlöslich in Äther, was zu ihrer Erkennung dient. Ihre wässerigen Lösungen trüben sich in Säuren, indem die wasserunlöslichen Fettsäuren frei werden.

Die Seifen sind im Organismus allgemein verbreitet, doch ist ihre Menge verhältnismäßig gering. Größere Konzentrationen erreichen sie in der Galle.

Die gallensauren Alkalien (Natron und Kalisalze der Glykocholsäure und Taurocholsäure) sind löslich in Wasser, Alkohol, unlöslich in Äther. Die wässerigen Lösungen sind stark elektrolytisch dissociiert (Bondi), so daß es fraglich erscheint, ob sie den echten oder kolloidalen Lösungen zuzurechnen sind, für letzteres spricht ihr biologisches Verhalten. Die käuflichen Präparate sind meist verunreinigt, so daß gelegentliche Angaben über Kolloidreaktionen wässeriger Lösungen solcher

*) Die chemischen Reaktionen der Fette sind für die Immunitätsforschung belanglos, sie sollen daher übergangen werden.

Präparate für die Eigenschaften der reinen Substanzen nicht beweiskräftig sind. Von den Seifen sind die gallensauren Alkalien durch die Unlöslichkeit der freien Säuren in Äther zu unterscheiden.

b) Spezielle Methodik.

Verwendung der isolierten Lipoide in der Immunitätslehre. Die diesbezügliche Versuchstechnik unterscheidet sich in keiner Weise von dem bei analogen Versuchen mit echten Antikörpern angewandten Verfahren, es sei daher auf die entsprechenden Abschnitte dieses Handbuches verwiesen*). Nur über die Anwendungsform der Lipoide ist einiges auszuführen. Die Lipoide entfalten ihre Wirkung im wässerigen Medium. Ihre Reaktionsfähigkeit ist an die Zustandsform einer kolloidalen Lösung oder Suspension geknüpft. Um eine Suspension herzustellen, dazu bedarf es beim Lecithin keines besonderen Kunstgriffes, es genügt, diese Substanz mit Wasser zu verreiben. Zwecks exakter Dosierung ist es jedoch empfehlenswerter, nach dem Vorgang von Kyes eine konzentrierte ätylalkoholische Lösung herzustellen und mit Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung auf den gewünschten Grad zu verdünnen, oder eine ätherische Lecithinlösung in Wasser einzutragen und mittels Luftdurchleitung den Äther zu entfernen. Schwierig ist es, eine homogene Cholesterinsuspension herzustellen. Nach dem Vorgange Ransoms kann man das Cholesterin mit Lecithin in Wasser zu einer haltbaren Suspension verreiben. Indessen ist es für viele Zwecke wünschenswert, die Gegenwart des Lecithins auszuschalten. Man kann, wie dies schon Ransom geübt hat, eine ätherische Cholesterinlösung direkt auf das betreffende Gift einwirken lassen, wobei man für die Verdunstung des Äthers zu sorgen hat (Aufenthalt im Brutschrank). Da aber der Äther für viele Substanzen nicht indifferent ist, so wird sich am besten das nachfolgende von Porges und Neubauer erprobte Verfahren, eine homogene, haltbare Cholesterinsuspension herzustellen, bewähren:

Eine geringe Menge einer Lösung von Cholesterin in Aceton wird in Wasser gegossen, das Aceton abgedunstet, hierauf eine neue Portion Cholesterinlösung eingetragen, das Aceton wieder entfernt usf., bis eine dichtmilchige Suspension erreicht ist. Das Aceton darf nur langsam abgedampft werden, was am besten aus einem Erlenmayerkolben im Wasserbad zu erreichen ist. Schließlich werden einzelne grobe Flocken, die sich auch bei noch so vorsichtigem Eindunsten bilden, mittels Filtration durch dünnes Filtrierpapier entfernt. Die resultierende Suspension läßt sich dann mit physiologischer Kochsalzlösung auf den gewünschten Grad verdünnen.

Die Lecithiddarstellung. Die Komplettierung durch Lipoide läßt sich in analoger Weise anordnen wie bei der Anwendung von echtem Komplement, es sei daher diesbezüglich auf die betreffenden Kapitel dieses Handbuches verwiesen. Kyes hat jedoch auch ein Verfahren ausgearbeitet, ein durch Lecithin komplettiertes, haltbares Gift herzustellen, das er Lecithid nennt.

---

*) Die Darstellung der Lipoide, siehe das Voranstehende. Auch käufliche Präparate sind anwendbar, nur empfiehlt es sich, Lecithin einer Reinigung zu unterziehen (nach Altmann, s. oben), da die käuflichen Präparate oft an sich beträchtlich blutlösend wirken.

Nach Kyes werden 40 cm einer 1 $^0/_0$igen Lösung des Kobragiftes in 0,85 $^0/_0$iger Kochsalzlösung mit 20 ccm einer 20 $^0/_0$igen Lecithinlösung in Chloroform in einer Arzneiflasche von ca. 100 ccm Inhalt im Schüttelapparat etwa 2 Stunden kräftig geschüttelt. Hierauf wird eine $^3/_4$ Stunde in einer elektrischen Zentrifuge, welche 3600 Umdrehungen pro Minute macht, zentrifugiert. Wenn der Prozeß gelungen ist, muß nach dem Zentrifugieren der wässerige Anteil von der Chloroformschicht scharf geschieden sein und an der Grenze beider nur eine ganz geringe, trübe Zwischenschicht bestehen. Ist das Lecithin nicht rein, so erfolgt diese Trennung nicht. (Reinigung nach Altmann durch Fällen mit Aceton und Wiederaufnahme mit Chloroform.) Nun wird die wässerige Schicht von der Chloroformschicht getrennt, indem man die erstere vorsichtig mit Hilfe einer feinen Pipette aufzieht. Die Chloroformschicht, die leicht in quantitativer Ausbeute, gewöhnlich in einer Menge von 19 ccm gewonnen werden kann, wird nun mit dem 3fachen Volumen chemisch reinen, über Natrium destillierten Äthers versetzt. Es entsteht eine Fällung, welche aus dem gesuchten Kobragiftlecithid besteht, während das Lecithin in Äther gelöst bleibt. Es wird mit Hilfe der Zentrifuge Flüssigkeit und Niederschlag getrennt, das ursprüngliche Volumen Äther hinzugefügt, geschüttelt und zentrifugiert und dies mindestens 10—20mal wiederholt, um das anhaftende Lecithin zu entfernen.

Wenn man wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung hat, kann man zur Orientierung auch eine andere Darstellungsweise versuchen (Kyes). Man fügt zu 1 ccm einer 4 $^0/_0$igen wässerigen Kobragiftlösung 1 ccm einer 20 $^0/_0$igen Lecithinlösung in Methylalkohol und läßt das Gemisch mehrere Stunden im Brutschrank stehen. Hierauf setzt man 10 ccm absoluten Äthylalkohol zu und filtriert von dem ausfallenden Niederschlag der Albuminoide ab. Bei der Fällung des klaren Filtrates mit Äther fällt dann das Lecithid aus.

Das Kobragiftlecithid unterscheidet sich durch seine Löslichkeitsverhältnisse sowohl vom Gift als auch vom Lecithin. Es ist löslich in Chloroform und Alkohol, ist ganz unlöslich in Äther. In Wasser löst es sich zunächst schon in der Kälte, nach längerer Aufbewahrung wird indessen ein Teil in kaltem Wasser unlöslich (sekundäres Lecithid), bleibt aber in warmem Wasser löslich.

In analoger Weise stellte Kyes die Lecithide anderer Schlangengifte und des Skorpiongiftes, Wohlgemut ein Pankreassaftlecithid her.

In jüngster Zeit hat Kyes sein Verfahren in einigen Punkten modifiziert, da die Darstellung nach der bisherigen Methode einigen mißlang. Die Ursache dieses Mißerfolges lag, wie er ermittelte, in der sauren Reaktion seiner Lösungen, die von einem aus dem Lecithin allmählich frei werdenden Fettsäurerest herrührte. Seine neue Methode, die zu einem Lecithid führt, dessen blutlösende Fähigkeit durch Lecithinzusatz nicht mehr verstärkt werden kann, beschreibt Kyes folgendermaßen:

400 ccm einer $^1/_2$ $^0/_0$igen Kobragiftlösung werden mit 400 ccm einer 20 $^0/_0$igen Lösung von Lecithin in Chloroform kräftig durchgeschüttelt; hierauf wird 5 ccm der Giftlösung mit $^1/_{10}$ Normalnatronlauge titriert und die auf diese Art ermittelte Acidität der Gesamtlösung durch Natronlauge abgestumpft. (Behufs Titration versetzt Kyes die 5 ccm Giftemulsion, mit 10 ccm Äthylalkohol, 10 ccm Amylalkohol und drei Tropfen gesättigter alkoholischer Phenolphtaleinlösung.) Nach zweistündigem Schütteln wird abermals in der beschriebenen Weise neutralisiert und dies alle zwei Stunden so lange wiederholt, als noch die Acidität eine Zunahme erfährt.

Schließlich wird scharf zentrifugiert, die Chloroformschichte abpipettiert (dieselbe muß jetzt das hämolysierende Agens vollständig aufgenommen haben), mit geglühtem Natriumsulfat vom Wasser befreit und mit dem 10fachen Volumen von wasserfreiem Äther behufs Fällung des Lecithids versetzt. Das abfiltrierte Lecithid wird wiederholt mit Äther gewaschen, schließlich über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet. Behufs weiterer Reinigung nimmt Kyes die getrocknete Substanz wieder mit der 10fachen Gewichtsmenge von Alkohol auf, fällt bei — 10° mit dem 10fachen Volumen Äther und wäscht den Niederschlag noch wiederholt auf der Zentrifuge mit Äther. Der schließlich resultierende, bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Körper ist ein weißes lockeres Pulver.

Das von Landsteiner und Jagic bereitete Kieselsäurelecithid unterscheidet sich von dem Kyesschen Lecithid durch seine Wasserunlöslichkeit. Näheres ist über seine Eigenschaften nicht mitgeteilt. Landsteiner und v. Jagic erhielten es als flockigen Niederschlag aus 10 ccm 0,1 %iger Lecithinsuspension, die mit 0,2 ccm 1 %iger Kieselsäure versetzt war.

Analyse von tierischen Flüssigkeiten und Organen mit Rücksicht auf den Nachweis „biologisch“ wirksamer Lipoide.

Die prinzipielle Aufgabe einer derartigen Analyse ist die Trennung von Proteinen und Lipoiden. Es empfiehlt sich, zunächst eine grobe Zerlegung durch starken Alkohol vorzunehmen. Zu diesem Zweck werden Organe möglichst fein in Wasser oder Salzlösung verteilt, tierische Flüssigkeiten in nativem Zustande mit dem 4—5fachen Volumen von Alkohol gefällt, der Niederschlag so rasch als möglich abzentrifugiert und mit Kochsalzlösung aufgenommen. Ist man entsprechend vorsichtig und rasch vorgegangen, so lassen sich die durch Alkohol gefällten Eiweißkörper noch vollständig lösen. Das Filtrat der Alkoholfällung wird bei niederer Temperatur (40—50°) eingedampft, der Rückstand ebenfalls mit Kochsalzlösung aufgenommen. Vergleicht man nun die „biologische“ Wirksamkeit dieser beiden Fraktionen miteinander und mit der Wirksamkeit des Ausgangsmaterials, so erhält man bereits eine Vorstellung über die Zugehörigkeit des wirksamen Agens, denn in den meisten Fällen läßt sich das aktive Prinzip seinem überwiegenden Anteil nach entweder in der alkoholunlöslichen oder der alkohollöslichen Fraktion nachweisen.

Weiter ist dann eine vollständige Trennung zwischen Proteinen und Lipoidsubstanzen durchzuführen. Zu diesem Zweck wird der alkoholunlösliche Anteil mit 50° warmem Alkohol erschöpft, die verunreinigten Alkoholauszüge unter 50° am besten im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit wasserfreiem Äther ausgezogen. (Das vom Äther Ungelöste sind der Koagulation entgangene Eiweißreste sowie Seifen. Eine dieser Fraktion anhaftende Wirksamkeit ist auf Seifen zu beziehen, deren Nachweis sich leicht durch die Darstellung ihrer Fettsäuren, die nach Behandlung mit Salzsäure sich durch Äther ausziehen lassen, erbringen läßt.) Der eingeengte Ätherauszug läßt sich dann durch Hinzufügung eines Überschusses von Aceton in die acetonunlöslichen Lipoide (Lecithin) und die acetonlöslichen Körper (Cholesterin usw.) zerlegen und nach den im Vorangehenden beschriebenen Methoden weiterverarbeiten.

Hat man wasserhaltigen Äther verwendet oder gar die Organe oder die nativen Flüssigkeiten direkt mit Äther extrahiert, so ist man nicht berechtigt, eine eventuell nachgewiesene Wirksamkeit des Ätherextraktes

auf Lipoide zu beziehen, denn der Ätherauszug kann in diesem Falle geringe Mengen von Eiweißsubstanzen aufgenommen haben. Andererseits sind aus proteinhaltigem Material Lipoide nur sehr unvollständig durch Äther extrahierbar, so daß eine biologische Wirksamkeit der mit Äther nicht entfernten Bestandteile noch nicht gegen deren Zugehörigkeit zu den Lipoiden spricht. Wie noch nicht veröffentlichte, in Gemeinschaft mit E. Neubauer ausgeführte Versuche ergeben haben, ist das Lecithin als hydrophiles Kolloid befähigt, große Mengen von Wasser zu binden und in Äther löslich zu machen, wodurch wieder sonst ätherunlösliche Substanzen in ätherische Lösung übergeführt werden können. Dabei wirken andererseits Proteine gegenüber Lipoiden als Schutzkolloide, so daß letztere scheinbar die Löslichkeitsverhältnisse der Proteine annehmen können.

Die biologische Wirksamkeit eines Chloroform- oder Alkoholauszuges läßt ebenso keine unbedingten Schlüsse auf die Lipoidnatur des wirksamen Agens zu, da nach den Versuchen von Michaelis und Rona Albumosen bei Gegenwart von Lecithin sich in großer Menge in Alkohol und Chloroform lösen. Die Ursache dieser Erscheinungen dürfte, wie in Gemeinschaft mit Neubauer ausgeführte, noch nicht publizierte Versuche ergeben haben, die Kolloidnatur des Lecithins sein, das in alkoholisch-wässeriger Lösung Kolloidreaktionen gibt, daher gewissermaßen als Schutzkolloid alkoholunlösliche Substanzen in Lösung halten kann.

Methode künstlicher Blutkörperchen nach Pascucci.

Pascucci versieht ein Röhrchen von 5—6 mm Durchmesser an dem einen Ende mit einem Diaphragma von feinem Seidenstoff, imprägniert hierauf die Seide mit Lipoid, indem er sie in vorsichtig geschmolzenes Cholesterin, in eine dicke Cholesterinlecithinmischung oder in einen Lecithinsyrup, der aus eingedunsteter alkoholischer Lecithinlösung darzustellen ist, eintaucht. Am Rande ist das Diaphragma mit Wachs zu verschließen. Die Röhrchen werden im Brutschrank getrocknet und über Schwefelsäure aufbewahrt. Das auf diese Art mit einer Lipoidmembran verschlossene Röhrchen wird in die zu untersuchende Giftlösung eingetaucht, das Innere bis zum Niveau der äußeren Flüssigkeit mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, die mit Cochenille oder Hämoglobin gefärbt ist. Die Lösungswirkung des Giftes wird an der Diffusion des Farbstoffes in die Außenflüssigkeit erkannt.

c) Technisches.

Das Extraktionsverfahren. Die zu verwendenden organischen Flüssigkeiten sind in verläßlicher Qualität, auch wasserfrei, käuflich zu haben (Merck, Kahlbaum)*).

Zur Extraktion mit Alkohol eignen sich feuchte Substanzen besser als trockene. Trockene Substanzen müssen behufs vollständiger Extraktion gründlich mit Alkohol verrieben werden.

---

*) Äther unbekannter Provenienz ist vor Gebrauch über Natrium zu destillieren, da dem Rückstande des gewöhnlichen Handelsproduktes blutlösende Eigenschaften zukommen.

Die Extraktion von wässeriger Lösung mit Äther geschieht am einfachsten im Scheidetrichter. Nach wiederholtem gründlichen Durchschütteln wird die zu extrahierende Flüssigkeit abgelassen, die Ätherschicht durch trockenes Filtrierpapier filtriert. Oft erfolgt keine Trennung des Äthers von der zu extrahierenden Flüssigkeit. In diesen Fällen kann ein größeres Volumen Äther noch eine Scheidung herbeiführen, oder es wird eine geringe Menge Alkohol hinzugefügt, worauf sich der Äther in der Regel klar absetzt. Der Äther muß dann wiederholt mit Wasser durchgeschüttelt werden, um den Alkohol wieder zu entfernen.

Trockene Substanzen werden mit Äther in fein gepulvertem Zustande am besten im SOXHLETschen Extraktionsapparate ausgezogen. Weitere technische Details siehe GATTERMANN „Die Praxis des organischen Chemikers". Leipzig 1907.

Literatur. (Abgeschlossen Anfang 1908.)

(Die mit * versehenen Schriften sind zusammenfassenden Inhaltes.)

ABDERHALDEN und LE COUNT, Zeitschr. für exper. Pathologie u. Therapie 1905, Bd. II, pag. 199.
ARRHENIUS und MADSEN, Zeitsch. für physikal. Chemie 1903, Bd. XLIV, Nr. 1.
*BANG, Ergebnisse der Physiologie von ASHER-SPIRO 1907, Bd. VI, pag. 131.
BANG und FORSSMANN, Hofmeisters Beiträge 1906, Bd. VIII pag. 238.
BASHFORD, Arch. internat. de Pharmak. 1901, Bd. XI, pap. 451.
BASSENGE, Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 4.
BELONOWSKI, Biochem. Zeitsch. 1907, Bd. V, pag. 65.
v. BEHRING und RANSOM, Deutsche med. Wochenschr. 1898, Nr. 5.
BERGELL, Ber. der Deutschen chem. Gesellschaft, Bd. XXXIII, pag. 2485.
BESREDKA, Ann. de l'Inst. Pasteur 1903, pag. 138.
BING, Skandinavisches Arch. für Physiol. 1899, Bd. IX, pag. 336.
BREDIG, Zeitschr. für Elektrochemie 1904, Bd. XIII, pag. 674.
BURKHARD, Inaug.-Diss. Rostock 1889.
CALMETTE, Compt. rend. de l'acad. de sc. 1902, Tome CXXXIV, Nr. 24.
DETRE und SELLEI, Wiener klin. Wochenschr. 1904, pag. 1195, 1234, 1315.
Dies., Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 30.
Dies., Wiener klin. Wochenschr. 1905, pag. 451, 807, 1089.
Dies., Wiener klin. Wochenschr. 1906, pag. 835.
v. DUNGERN, Berliner klin. Wochenschr. 1908, pag. 348.
v. DUNGERN und COCA, Münchener med. Wochenschr. 1907, pag. 317.
v. EISLER, Wiener klin. Wochenschr. 1905, pag. 721, 809.
Ders., Zeitschr. für exper. Path. u. Ther. 1906, Bd. III, pag. 296.
FLEXNER und NOGUCHI, Pennsylvania Med. Bull. 1902, Vol. XV, Nr. 9.
FRASER, British med. journ. 1897, 17. July.
FRIEDEMANN, Deutsche med. Wochenschr. 1907, pag. 585.
*FRÄNKEL, Deskriptive Biochemie. Wiesbaden 1907.
GOTTLIEB und LEFMANN, Med. Klin. 1907, Nr. 15.
HAHN, Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 16.
*HAMMARSTEN, Lehrbuch d. phys. Chemie. Wiesbaden 1905.
HAUSMANN, Hofmeisters Beitr. 1905, Bd. VI, pag. 567.
HECKER, Arbeiten aus dem kgl. Inst. für exper. Therapie in Frankfurt, 1907, Bd. I, pag. 39.
HOPPE-SEYLER, Med. chem. Untersuchungen 1867.
*HOPPE-SEYLER und THIERFELDER, Handbuch der phys. und path.-chem. Analyse. Berlin 1993.
KEMPNER und SCHEPILEWSKI, Zeitschr. für Hyg. u. Infektionskrankh. 1898, Bd. XXVII, pag. 213.
KOCH, Zeitschr. für phys. Chemie 1902, Bd. XXXVI, pag. 134.
Ders., Zeitschr. für phys. Chemie 1903, Bd. XXXVII, pag. 181.
KÖPPE, Pflügers Archiv 1903, Bd. IC, pag. 33.
KORSCHUN und MORGENROTH, Berliner klin. Wochenschr. 1902, pag. 870.

Kyes, Berliner klin. Wochenschr. 1902, pag. 886, 918.
Ders., Zeitschr. für phys. Chemie 1904, Bd. XLI, pag. 273.
Ders., Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 99.
Ders., Biochem. Zeitschr. 1908, Bd. VIII, pag. 42.
Kyes und Sachs, Berliner klin Wochenschr. 1903, pag. 21, 57, 82.
Lamb, Science mém. 1905, Nr. 17.
Landsteiner, Centralbl. für Bakt. Ref. 1906, Bd. XXXVIII, pag. 25.
Landsteiner und Botteri, Centralbl. für Bakt. Orig. 1906, Bd. XLII, pag. 562.
Landsteiner und Dautwitz Hofmeisters Beiträge 1907, Bd. IX, pag. 431.
Landsteiner und v. Eisler, Wiener klin. Wochenschr. 1904, pag. 676.
Dies., Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXIX, pag. 309. Orig.
Landsteiner und v. Jagič, Wiener klin. Wochenschr. 1904, pag. 63.
Landsteiner und Stankovic, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XLII, pag. 353. Original.
Landsteiner und Ehrlich, Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLV, pag. 247. Original.
Landsteiner und Raubitschek, Wiener klin. Rundschau 1907, Nr. 47; Centralbl. für Bakt. 1907, Bd. XLV, pag. 660. Orig.
Landsteiner, Müller und Pötzl, Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 50.
Lazar, Wiener klin. Wochenschr. 1905, pag. 1012; 1906, pag. 560.
Levaditi und Yamanouchi, Compt. rend. de Soc. de Biol. 1907, pag. 740.
Levaditi, Compt. rend. de Soc. de Biol. 1905, Tome LVIII.
Liebermann, Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 25.
Ders., Arch. für Hyg. 1907, Bd. LXII, pag. 328.
Löwi und Meyer, Arch. für exper. Path. u. Pharmak.
Lüdecke, Inaug.-Diss. München 1905.
Madsen, Centralbl. für Bakt. Ref., 1905, Bd. XXXVII, pag. 373.
Madsen und Noguchi, Centralbl. für Bakt. Ref., 1905, Bd. XXXVII, pag. 367.
Madsen und Walbum, Centralbl. für Bakt. 1906, Bd. XL, pag. 409. Orig.
Mayer, Biochem. Zeitschr. 1906, Bd. I, pag. 39 und 81.
Meyer, Arch. für exper. Path. u. Pharmak. 1899, Bd. XLII, pag. 109; 1901, Bd. XLVI, pag. 338; 1902, Bd. XLVII, pag. 431.
Meyer und Ransom, 1903, Bd. XLIX, pag. 369.
Meinertz, Zeitschr. für physiolog. Chemie 1905, Bd. XLVI, pag. 376.
Metschnikoff, L'immunité dans maladies infect., pag. 407.
Michaelis und Rona, Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 11.
Morgenroth, Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 50.
Ders., Arb. a. d. path. Inst. Berlin 1906.
Morgenroth und Pane, Biochem. Zeitschr. 1906, Bd. I, pag. 354.
Morgenroth und Rosenthal, Biochem. Zeitschr. 1906, Bd. II, pag. 383.
Morgenroth und Carpi, Berliner klin. Wochenschr. 1906, Nr. 44.
Dies., Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 248.
Müller, Centralbl. für Bakt. 1903, Bd. XXXIV, pag. 567. Orig.
Neuberg und Rauchwerger, Festschrift für Salkowski.
Neuberg und Rosenberg, Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 2.
Neuberg und Reicher, Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 281.
Dies., Münchener med. Wochenschr. 1907, pag. 1725.
Noguchi, Centralbl. für Bakt. 1902, Bd. XXXII, pag. 377. Orig.
Ders., Journ. of exper. Med. 1906, Vol. VIII, Nr. 1.
Ders., Proc. of the soc. f. exp. Biol. and Med. 1907, Bd. IV, Nr. 3.
Ders., Journ. of exper. Med. 1906, Bd. VIII, 6. Dez.
Ders., Journ. of exper. Med. 1907, Bd. IX, pag. 436.
Ders., Biochem. Zeitschr. 1907. Bd. VI, pag. 327.
Overton, Studien über die Narkose, Jena 1901.
Ottolenghi und Mori, Centralbl. für Bakt. 1905, Bd. XXXVIII, pag. 338, 468. Original.
Pascucci, Hofmeisters Beiträge, 1905, Bd. VI, pag. 543; 1906, Bd. VII, pag. 457.
Phisalix, Compt. rend. de Soc. de Biol 1897, pag. 1057, 1898, pag. 431.
Porges und Neubauer, Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. VII, pag. 152.
Porges, Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 51.
Porges und Meier, Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 15.
Pribram, Handb. d. path. Mikroorganism. Herausgeg. v. Kolle und Wassermann I. Suppl.-Bd. 1906.
Ransom, Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 13.
Ders., Zeitschr. für physiolog. Chemie.
Reis, Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr 17.

RUSS und RAUBITSCHEK, Wiener klin. Wochenschr. 1908, pag. 250.
SACHS, Centralbl. für Bakt. Orig. 1903, Bd. XXXIV, pag. 686; 1904, Bd. XXXVII, pag. 251.
Ders., Berliner klin. Wochenschr. 1904, Nr. 1.
Ders., Wiener klin. 1905, pag. 901.
SALKOWSKI, Pflügers Archiv 1872, Bd. VI, pag. 207.
SELIGMANN, Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 32.
STOUDENSKI, Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, Tome XIII, pag. 126.
*THUDICHUM, Die chemische Konstitution des Gehirns der Menschen und der Tiere. Tübingen 1901.
WASSERMANN und TAKAKI, Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 1.
WASSERMANN und CITRON, Zeitschr. für experim. Pathol. und Therapie 1907, Bd. IV, pag. 274.
WOHLGEMUT, Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. IV, pag. 271.
WILLSTÄTTER, Bericht der Deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XXXVII, pag. 3735.
WÖLFEL, Journ. of infect. dis. 1905.
ZÜLZER, Zeitschr. für physiolog. Chemie 1899, Bd. XXVII, pag. 255.

XXXVIII.

Technik und Methodik der Serodiagnostik der Lues mit Hilfe der Ausflockungsmethode.

Von

Dr. Otto Porges

in Wien.

Einleitung.

Die von Wassermann, Bruck und Neisser begründete und von Citron in die Klinik eingeführte Serodiagnose der Lues hat sich als ein äußerst wertvolles diagnostisches Hilfsmittel erwiesen. Daher erklärt es sich, daß man bald Mittel und Wege suchte, um das komplizierte und technisch mühevolle Wassermann-Bruck-Neissersche Verfahren durch eine einfachere Methode zu ersetzen. Da nun das Bordet-Gengousche Phänomen, das der Wassermannschen Reaktion zugrunde liegt, durch physikalisch-chemische Zustandsänderungen zweier aufeinander reagierender Kolloide bedingt ist, so war der Weg gegeben, mit direkter Beobachtung derartiger Veränderungen zu einer einfachen serodiagnostischen Methode zu gelangen.

Der erste Versuch, derartige Zustandsänderungen, die sich als Präzipitation dokumentieren, für die Serodiagnose der Lues nutzbar zu machen, rührt von Fornet und Schereschefski her. Auf Grund ihrer Annahme, daß sich im Frühstadium der Lues im Serum Antigene, im Spätstadium Antikörper befinden, haben diese Autoren Sera von sekundär Luetischen auf Sera von metaluetisch Erkrankten geschichtet und konnten in vielen Fällen ringförmige Trübungen nachweisen. Spätere Untersucher konnte jedoch dieses Phänomen nur in wenigen Fällen bestätigen.

Weiter hat L. Michaelis in einem Falle Präzipitatbildung zwischen Luesserum und Extrakt aus luetischen Fötuslebern beobachtet.

Die erste Präzipitationsmethode aber, die zu einigermaßen diagnostisch brauchbaren Resultaten führte, rührt von Porges und Meier her. Porges und Meier hatten gefunden (wie auch unabhängig von ihnen Landsteiner, Müller und Pötzl, sowie Levaditi und Yamanouchi), daß die wirksame Substanz der Luesextrakte alkohollöslich und durch Lecithin ersetzbar ist. Sie konnten nun weiter zeigen, daß Luessera bei bestimmten Mengenverhältnissen Lecithinsuspensionen auszu-

flocken imstande sind. Spätere Untersuchungen, an denen eine große Anzahl von Autoren beteiligt sind, ergaben jedoch, daß dieser Lecithinausflockungsreaktion nicht die hochgradige Spezifität der WASSERMANNschen Reaktion zukommt. Die Ursache dieser Divergenzen liegt wohl in der Veränderlichkeit der Lecithinsuspensionen, der ungleichen Beschaffenheit der einzelnen Präparate, hauptsächlich aber in dem für die Spezifität ungünstigen Mengenverhältnis, daß PORGES und MEIER gewählt hatten, da sie zwecks deutlicher Erkennbarkeit der Reaktion die Lecithinsuspension durch Serum fällten und nicht umgekehrt die spezifischere Ausflockung des Serums durch Lecithin in Anwendung brachten (ELIAS, NEUBAUER, PORGES und SALOMON).

Da es sich nun gezeigt hatte, daß nicht nur Lecithin, sondern auch andere hydrophile Kolloide mit Seris Ausflockung geben, so wählten ELIAS, NEUBAUER, PORGES und SALOMON das Natrium glykocholicum als Reagens für Luessera. (LEVADITI und YAMANOUCHI hatten diese Substanz bereits mit Erfolg für die Komplementbindungsreaktion angewendet.) Die genannten Autoren konnten an einem größeren Material feststellen, daß diese Methode hinsichtlich der Spezifizität der WASSERMANNschen Reaktion nicht nachsteht.

Schließlich hat KLAUSNER eine empirisch gefundene Fällungsreaktion angegeben. Er fügt zu den Seris ein mehrfaches von destilliertem Wasser. KLAUSNER findet seine Reaktion außer bei Lues auch bei fieberhaften Erkrankungen. Mehrfache Nachuntersuchungen von verschiedenen Seiten sprechen dieser Reaktion bisher die diagnostische Verwendbarkeit ab.

1. Lecithinausflockungsmethode.

a) Herstellung der Lecithinsuspension.

Es eignet sich hierfür nach unseren Erfahrungen nur das KAHLBAUMsche Präparat (Lecithin aus Eigelb). Das Agfalecithin gibt mit physiologischer NaCl-Lösung eine instabile Suspension, das MERCKsche Lecithin verhielt sich ungleich; während manche Präparate vollständig geeignet sind, lassen sich andere überhaupt nicht suspendieren.

Das Lecithin wird mit der 100fachen Gewichtsmenge von physiologischer (0,85%) Kochsalzlösung in der Reibschale verrieben, die unzerteilt gebliebenen Partikelchen hierauf durch andauerndes Schütteln in der Stöpselflasche aufgelöst. Ein geeignetes Präparat verteilt sich mit Leichtigkeit in der Flüssigkeit, die hydrophile Beschaffenheit dokumentiert sich durch sofortige Quellung und Auflösung.

Die resultierende Suspension muß vollständig homogen sein und bei Beobachtung im Lichtspalter keinerlei Teilchen erkennen lassen. Behufs Konservierung wird die Suspension mit $^1/_2$%iger konzentrierter Karbolsäure versetzt.

b) Ausführung des Versuches.

Gleiches Volumen. 1% Lecithinsuspension und von klar centrifugiertem inaktiviertem Serum wird mit 5 Volumen physiologischer NaCl-Lösung gemischt, nach 20stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur das Resultat verzeichnet. Positive Sera erzeugen eine Ausflockung, negative Sera lassen die Suspension unverändet homogen. Positive Reaktion ist nach den bisherigen Erfahrungen für Lues nur beweisend, wenn eine

schwerere Tbc.-Erkrankung (fieberhafte Tuberkulose, Lupus), Neubildungen, die zu Kachexie geführt haben, Typhus, Pneumonie, Sepsis u. a. konsumierende Erkrankungen auszuschließen sind. Als Kontrolle ist das Serum mit physiologischer NaCl-Lösung aufzustellen.

2. Ausflockungsmethode mit Natr. glykochol. Merck.

a) Herstellung der Lösung von Natr. glykochol.

Natr. glyk. Merck wird in der 100fachen Gewichtsmenge von destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung hält sich kaum einen Tag unverändert, ist daher immer frisch zu bereiten. Mit Karbolsäure versetzte Lösungen sind vorläufig nicht anwendbar (es müßten wohl die für eine brauchbare Diagnostik erforderlichen Mengenverhältnisse ermittelt werden), da sie sehr leicht auch mit nichtluetischen Seris ausflocken.

b) Ausführung des Versuches.

Gleiches Volumen von Natr. glykochol. und klar zentrifugiertem $^1/_2$ Stunde bei 56° inaktiviertem Serum wird gemischt. Nach 16 bis 20stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur ist ein positives Resultat als deutliche Flockung erkennbar, die meist infolge ihres geringen spezifischen Gewichtes an der Oberfläche der Flüssigkeit vereinigt ist. Bloße Trübungen sind nicht beweisend, ebensowenig Flockungen, die nach Ablauf von 20 Stunden auftreten. Als Kontrolle ist das Serum mit dem gleichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung aufzustellen, um event. Täuschungen durch spontane Flockenbildung im Serum zu vermeiden.

Für die Reaktion genügt je 0,2 ccm von Serum und Glykocholatlösung in Röhrchen von ca. 6 mm weitem Durchmesser.

3. Klausnersche Reaktion.

Zu 0,3 ccm Serum kommt 0,7 ccm destilliertes Wasser in enge Röhrchen. Nach mehrstündiger Verweildauer im Brutschrank hat sich in luetischen Seris ein gut abgesetzter Niederschlag von ca. 1 mm Höhe gebildet.

Literatur.

Citron, Deutsche med. Wochenschr. 1907, Nr. 29.
Elias, Neubauer, Porges und Salomon, Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 21. u. 23.
Fornet und Schereschefski, Münchener med. Wochenschr. 1907, Nr. 30.
Klausner, Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 7 und 11.
Michaelis, L., Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 46.
Porges und Meier, Berliner klin. Wochenschr. 1908, Nr. 15.
Wassermann, Bruck und Neisser, Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 19.

Sachregister*).

A.

*) Bearbeitet von Dr. Viktor K. Russ (Wien).

B.

C.

E.

F.

G.

H.

I.

J.

K.

L.

M.

Q.

R.

S.

T.

Druckfehlerberichtigung.

Band I.

pag.	Zeile	lies	statt
2	20 von oben	Indikator	Indikators
8	7 „ oben	bestimmten	bestimuten
19	5 „ unten	Kaninchen	Kaninehen
20	29 „ oben	Immunisierung	Immunierung
24	7 „ „	Wärmeeinwirkung	Wärmeinwirkung
27	5 „ unten	Tuberkelbazillen	Tuberkellbazillen
30	25 „ „	Kulturen	Kulture
42	15 „ „	findet man Schwankungen	findet Schwankungen
42	12 „ „	gewöhnlich	gewöhnliche
46	14 „ oben	Toxins;	Toxins,
58	26 „ „	Kochsalz. Die	Kochsalz Die
69	22 „ unten	stets, alle	stets. alle
72	12 „ oben	Smith	smith
97	18 „ unten	angegeben.	angegeben
103	6 u. 11 v. oben	Übertragung	Ubertragung
104	8 von oben	bacillus	Bacillus
111	11 „ unten	unfiltrierter	infiltrierter
112	14 „ oben	Tonteller	Tontellcr
114	22 „ „	Mitarbeitern.	Mitarbeitern,
116	19 „ „	Tetanusbouillon	Tatanusbouillon
117	11 „ unten	ameisensaures Äthyl	ameisensaures, Äthyl
118	18 „ „	Nach	Naeh
120	8 „ „	Trismus	Trimus
121	23 „ „	Applikationsweise	Applkationsweise
123	28 „ „	Kapillarrohres	Kapillarohres
123	26 „ „	Sporen einem	Sporeneinem
126	20 „ oben	aus	ans
128	19 „ unten	Tetanus	Te-
128	17 „ „	Neurons	Neuroms
128	12 „ „	Lumbal- bis	Lumbal bis
183	4 „ oben	Dysenterietoxin	Dysenterietoxie
183	1 „ unten	Tagen	Tsgen
192	7 „ oben	Blutmengen am	Blutmengen an
199	10 „ unten	intravenös	iutravenös
231	24 „ „	äußerungen	äußcrungen
237	6 „ „	Immunseris	Immuniseris
245	22 „ „	Isotonie	Isotomie
248	21 „ oben	starken	starkea
250	31 „ „	Hämotoxin	Hämatoxin
259	8 „ „	Daß	Das
284	5 „ „	Spermakopf	Spermakopt
288	28 „ „	auskommen	auskommnn

pag.	Zeile	lies	statt
289	8 von unten	Ziele	Zilee
311	15 „ „	mazeriert und das	mazeriert und und das
336	22 „ oben	erscheint	erscdeint
359	20 „ „	immunisierendes	immnuisierendes
370	22 „ unten	vorheriges	vorehriges
370	11 „ „	vor: In	vor. In
385	9 „ „	Verfahrens bedienten	Verfahre nsbedienten
386	26 „ oben	Gift	Gewicht
390	7 „ unten	Alkoholätherextrakt	Alkoholätherextrat
400	1 „ oben	antihämolytischen	natihämolytischen
407	8 „ unten	Äther	Ather
409	28 „ oben	HAMBURGER	HAMBURHER
410	11 „ „	chemotoxische	chemostische
411	37 u. 21 v. unten	Chemotaxis	Chemotoxis
411	8 von unten	Destilliertes	Desilliertes
416	23 „ oben	Schichte enthält	Schichteenthält
431	19 „ unten	Weise: Auf	Weise. Auf
434	4 „ „	können	kennen
440	9 „ oben	Kochsalz-, Oxalat-, Citrat- und	Kochsalz, Oxalat, Citrat und
468	13 „ unten	von	mit
682	23 „ „	von	vor
688	1 „ oben	grundlegend	grunlegend
688	11 „ unten	Nährboden für das	Nährboden das
697	9 u. 12 v. unten	Methylblau	Methylenblau
726	25 von oben	Typhusgift	Typhusgiff
774	5 „ unten	künstlichen	künstiichen
775	6 „ oben	günstige	günstigen
797	1 „ „	XXII	XII
816	4 „ „	läßt man sofort	sofort läßt man
825	1 „ unten	tuberkulöses	tuberkuloses
827	25 „ „	Weise: Es	Weise. Es
827	13 „ „	zur Last.	zur Last
828	5 „ „	Injektion	Infektion
833	19 „ oben	(1:10—1:20)	(1:10—1—20)
834	12 „ „	Gesunden	Gesundeu
835	18 „ unten	der	den
841	18 „ „	Reaktionen	Injektionen
841	3 „ „	durch	dnrch
879	20 „ „	Bakterienteilchen	Bakterienteilcheu
898	22 „ oben	Kaffeemühle	Kaffecmühle
898	7 „ unten	Laboratoriums-	Laboratoriums
908	12 „ „	Aichung	Eichung
914	8 „ oben	Über	Uber
914	19 „ „	auf Grund	aufgrund
929	2 „ unten	gleichzeitig	geichzeitig
935	26 „ „	verschieden-	verschieden
942	19 „ „	näheren weiter oben	näheren auf Seite 6 und 7 weiter
947	22 „ „	PERERS	PFERERS
949	27 „ „	sie, wie	sie wie
950	5 u. 13 v. oben	Geeignetheit	Geneigtheit
991	10 von unten	Es	Est
992	5 „ oben	defibriniert	defibrimiert
997	26 „ unten	Formollösung	Formallösung
999	2 „ „	Kochsalzlösung	Kochsalslösung
1026	6 „ „	schmerzen	schmerzn
1032	14 „ oben	schließen	schließcn
1038	5 „ unten	Ähnlichkeit	Ahnlichkeit
1039	11 „ „	Überempfind-	Uberempfind-
1050	16 „ „	Laboratoriumsarbeiter	Laboratorumsarbeiter
1051	11 „ „	ausgegangene	ausgeganene
1051	3 „ „	bestandenen	bestandeuen
1071	7 „ oben	Kohlehydraten, Salzen und	Kohlehydratensalzen und

pag.	Zeile	lies	statt
1075	23 von oben	Rötung	Rötuug
1076	8 „ „	kann	knnn
1077	9 „ „	vorstehende	nachfolgende
1093	8 „ unten	heterogene	hoterogene
1096	18 „ oben	Über	Uber
1100	14 „ unten	Malleins	Maleins
1102	24 „ oben	Messungen	Messungeu
1104	27 „ „	minimale	minime
1105	29 „ „	abweicht.	abweicht
1108	19 „ „	Malleïnisation	Maleïnisation

Band II.

pag.	Zeile	lies	statt
6	19 von oben	Überempfindlichkeit	Uberempfindlichkeit
10	20 „ „	des	dse
19	15 „ „	tragen, abgegeben	tragen abgegeben
47	17 u. 16 v. unten	nicht gleich	nicht von gleich
53	10 von unten	zwei Antigene in	zwei Antigen ein
63	10 „ oben	verschlossen	verschlosseen
73	15 „ unten	per rectum),	per rectum,
77	17 „ oben	einander	einer
96	3 „ „	je einem	je seinem
98	21 „ „	geaichten	geeichten
98	24 „ „	dem	den
111	10 „ unten	1—1,5,	1 à 1,5,
111	9 „ „	5—10 %	5 à 10 %
135	17 „ oben	des ebenso wirksamen Toxines	und ein ebenso wirksames Toxin
147	4 „ „	Intervallen	Interwallen
149	8 „ „	den	deu
197	11 „ „	Aichung	Eichung
198	19 „ unten	Kontrollaichung	Kontrolleichung
205	20 „ „	wird, dürfte	wird dürfte
213	4 „ „	0,5 El Tor n. sp. I	0,5 El Tor u. op. I
231	18 „ „	munantihämotoxine	muantihämotoxine
235	13 „ oben	Tetanushämotoxine	Tetanushämatoxine
241	8 „ unten	Ehrlich	Errlich
257	34 „ oben	wäßriger Rizinlösung	wäßriger, Rizinlösung
261	2 „ „	Antiagglutinin	Antiaglutinin
263	1 „ „	XVI.	XV.
281	6 „ unten	saurer	saaurer
289	17 „ „	Gesagten	gesagten
290	18 „ „	hämatopoetischen	hämatopoietischen
297	6 „ oben	(5 μ)	(5 mm)
298	4 „ unten	(ε = Granula Ehrlichs)	(ε = granula Ehrlichs)
299	13 „ oben	(kristalloide Granula)	(kristalloide Granulas)
308	21 „ „	Innern	Inneru
309	22 „ „	besagten	beregten
311	19 „ unten	Bakterieneinschlüssen	Bakterieneinschlüsse
314	5 „ oben	sorgfältig	sorglältig
331	23 „ „	entscheidenste	entschiedenste
353	30 „ „	Bac. sui-septicus	Bac. sui septicum
355	19 „ unten	nämlich der	nämlich den
369	25 „ „	überschreitet	überschreiten
372	25 „ oben	fixieren:	fixieren
376	22 „ „	Typhus-Paratyphusgruppe	Typhusparatyphusgruppe

pag.	Zeile	lies	statt
377	7 von oben	PFEIFFERschen	PEEIPERschen
382	7 „ unten	ein	eiu
408	1 „ „	l. c. nur teilweise wiedergegeben):	l. c.) nur teilweise wieder gegeben
428	6 „ oben	Frage	Erage
436	15 „ unten	auf	anf
440	23 „ „	Nachweis spezifischer	Nachweis speifischer
443	19 „ „	Komplementbindung	Komplementbildung
445	24 „ oben	nicht	nicnt
452	16 „ „	ihren	ikren
461	3 „ „	für die Taube	für das Kaninchen
464	5 „ „	Karbolmethylenblaulosung	Karbolmethylenlosung
464	2 u. 1 v. unten	Kahmhäutchen	Kammhäutchen
467	13 von unten	denen	den
468	4 „ oben	Agglutinationsprobe	Agglutinatiosprobe
469	20 „ „	gleichmäßigere	lgeichmäßigere
471	21 „ „	werden:	werden.
475	2 „ „	1:4) und ein kleines Wattekollodiumverbändchen	1:4 und ein kleines Wattekollodiumverbändchen)
476	1 „ unten	Anaphylaxie	Anaphylaxe
485	19 „ „	Streptokokkenstämmen	Streptokokkenstämmmen
486	7 „ oben	menschenpathogener	menschen pathogener
486	22 „ unten	ein Freiwerden	ein freiwerden
486	16 „ „	verändernd	verändernt
487	13 „ „	tierpathogenen	Tierpathogenen
488	4 „ oben	Immunisierung	Immunisierrung
489	21 „ „	daraus abzuleitende	sich daraus abzuleitende
492	12 „ unten	tierpathogenen	Tierpathogenen
495	21 „ „	KRUMBEIN	KRUMMBEIN
505	13 „ „	Über	Uber
543	8 „ oben	Über-	Uber
568	13 „ unten	wärmung	wärung
573	24 „ „	die Tiere	der Tiere
576	28 „ „	suisepticus, Coli usw.)	suisepticus Coli usw.)
581	11 „ oben	am 14.,	am 14,
581	12 „ „	am 18.	am 18
608	3 „ unten	Tropfen	Topfen
609	2 u. 3 v. oben	Immunisierung, Serumtherapie.	Immunisierung Serumtherapie. therapie
624	19 „ unten	entsprechenden	entsprechend
629	2 „ „	Agglutinations-	Agglutnations-
632	22 „ oben	Serumkonzentrationen	Serumkonzentratlonen
633	17,35,37 v. oben	begeißelte	gegeißelte
636	9 von oben	zustande gekommen	zugestande gekommen
640	16 „ „	(LEVY)	(LEYV)
640	17 „ unten	Kollodiumsäckchen	Kollodiumsäckchhen
643	13 „ oben	genuinem	geniunem
643	18 „ „	gewonnene, 100° —	gewonnene 100° —
644	23 „ „	Gegensatz	Gegegensatz
652	4 „ „	Chamberlandkerze	Chamberlainkerze
653	11 „ „	destillierten	destiliertem
657	8 „ „	Körpern	Körper
667	12 „ unten	inagglutinabeln	unagglutinabeln
669	22 „ oben	war; selbstverständlich	war, selbstverständlich
673	16 „ „	VELDE	VFLDE
673	11 „ unten	Täuschungen hüten	Täuschungenhüten
673	12 „ „	Dysenteriebazillen muß	Dysenteriebazillenmuß
675	1 „ „	Immunserum	Immuniserum
677	24 „ oben	Tuberkelbazillen	Tuberkelbazilen
691	14 „ „	Platiniridiumspitze	Platinirridiumspitze
692	11 „ „	Testobjekt;	Testobjekt,
694	1 „ „	vor: Je 1 Tropfen	vor. 1 Tropfen

pag.	Zeile	lies	statt
697	13 von unten	M. melitensis	Melittense
699	9 „ „	des opsonischen	desopsonischen
699	10 „ „	Blutuntersuchung,	Blutuntersuchung.
701	34 „ „	Staphylokokkus	staphylococcus
707	19 „ oben	Jochmann	Tochmann
707	28 „ „	unvollständig	unvollstäudig
711	4 „ unten	Verdünnungen	Verdünnungsn
734	12 „ „	hierbei	bierbei
735	7 „ „	bringt, da sonst . . . . wird	bringt da sonst, ... wird;
738	11 „ „	vor einen Spektralapparat	von einem Spektralpparat
740	16 „ „	Blutkörper-	Blutkörper
754	14 „ oben	Eiweißlösung	Eiweisßlösung
755	6 „ unten	gleichen	gleichem
761	21 „ oben	Verhältnissen	Verhältnissen.
765	4 „ „	ist. Durch	ist Durch
789	11 „ unten	(Hommel) Hämoglobin und	(Hommel) und Hämoglobin
792	15 „ „	ausgeführt:	ausgeführt.
813	13 „ oben	rückwärts	rückäwrts
835	2 „ „	reagierenden . . . . . zeigte	ragierenden . . . . . zeige
835	25 „ „	genügend	genügendem
836	22 „ unten	wurde	würde
836	20 „ „	gewinnen:	gewinnen.
837	2 „ oben	erhalten:	erhalten.
837	14 „ unten	benützt:	benützt.
837	10 „ „	Zimmertemperatur	Zimmertemperatua
838	4 „ oben	Behufs	Befufs
841	23 „ „	Lösung	Losung
841	29 „ „	wenn auch	wen nauch
842	22 „ unten	Ficker	Fickfr
845	15 „ oben	vität des	zität des
848	4 „ unten	daß selbst	der selbst
851	4 „ oben	Bonome	Bogme
851	16 „ „	Bouillonfiltraten	Bouiltonfiltraten
851	23 „ unten	in 0,75 bis 1 %iger	in neutraler 0,75 bis 1 %iger
851	18 „ „	die 0,5 %	die 0,5 %iges
853	21 „ „	Bouillonkultur	Bouilloukultur
857	4 „ „	behandelt	hehandelt
861	21 „ oben	Ödemen	Odemen
862	14 „ unten	finden.	finden
895	17 „ „	physiologischen	physiologische
896	11 „ „	sensibilisatrice	sensibiliratrice
898	23 „ „	im	ins
908	9 „ oben	Ambozeptor	Ambzoeptor
909	1 „ „	Ambozeptor	Amabozeptor
912	4 „ unten	Ambozeptor	Ambzoeptor
919	8 „ „	wird. Wir	wird Wir
919	6 „ „	Ambozeptor	Ambzoeptor
929	1 „ „	bleiben	beiben
930	14 „ oben	Stelle	Stelln
933	7 „ unten	analoger	anologer
937	19 „ oben	Ambozeptor	Ambzoeptor
941	20 „ unten	geeigneten	geigneten
944	15 „ oben	haben	hahen
950	2 „ unten	Mechanismus	Mechanismns
952	5 „ „	Thermolabilität	Thormolabilität
953	10 „ oben	Blutserum	Blutsereum
953	24 u. 26 von oben	Humor aqueus	Humor aquens
957	3 „ unten	destillierten	destilierten
959	13 „ oben	Bariumsalzen	Barniumsalzen
959	15 „ unten	Für kom-	Für die kom-
959	4 „ „	gewaschene	gewachsene
961	12 „ oben	Wirkungsmechanismus	Wirkunngsmechanismus

pag.	Zeile	lies	statt
965	26 von unten	ambozeptorbeladenen	ambozeptorbeladenem
966	30 „ oben	, daß das komplementzer-störende	, daß diese Sera das kom-plementzerstörende
970	26 „ „	Blutserums	Bfutserums
972	22 „ unten	hämolytische	hämoloytische
978	3 „ „	Reaktion	Beaktion
987	5 „ „	Phänomene	Phänomen
989	7 „ „	plementmenge bei	plemetmenge bei
997	24 „ „	hämolytischen	hämolytischeu
999	17 „ oben	dadurch	daduch
1004	3 „ unten	Blutzellen	Blutzelleu
1007	13 „ „	Blutkörperchenstromata	Bluskörperchen stromata
1013	10 „ oben	cytophilen	cytophylen
1043	1 „ unten	Antikörper	Anitikörpern
1045	18 „ oben	Milchdifferenzierung	Michdifferenzierung
1047	5 „ „	bestimmten	besimmten
1051	4 „ „	zu	zn
1144	13 „ „	Base	Basis
1144	28 „ „	Sitzung der Bunsengesell-schaft	Sitzung der der Bunsengesell-schaft
1145	18 „ „	Kolloidnatur	Kolloidantur
1151	18 „ unten	verändern	veräudern
1165	2 „ „	Liebermann	Liebebmann

Druck von Ant. Kämpfe in Jena.